

Казачков Е.Л., Казачкова Э.А., Воропаева Е.Е., Хелашвили И.Г., Мирошниченко Л.Е.

Структурная характеристика рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск

Kazachkov E.L., Kazachkova E.A., Voropayeva E.E., Khelashvili I.G., Miroshnichenko L.E.

Structural characteristics of endometrial receptivity at chronic endometritis

Резюме

Цель – оценка рецептивности эндометрия у женщин с хроническим эн-дометритом на основании изучения структурных особенностей поверхностного эпителия, характера экспрессии к стероидным гормонам и лейкокемия-ингибирующему фактору в период «окна имплантации». Проведен анализ морфологического состояния эндометрия у 76 пациенток (основная группа) с хроническим эндометритом и 20 гинекологически здоровых женщин (группа сравнения). Установлено, что у пациенток с хроническим эндометритом наблюдается расстройство рецептивности эндометрия, включающее повреждение поверхностного эпителия слизистой оболочки матки, нарушение созревания пиноподий к моменту «окна имплантации», снижение экспрессии лейкокемия-ингибирующего фактора и гиперэкспрессию рецепторов к эстрогенам. Это может лежать в основе нарушения репродуктивной функции у женщин с хроническим эндометритом.

Ключевые слова: рецептивность эндометрия, хронический эндометрит

Summary

Purpose - evaluation of endometrial receptivity in women with chronic endometritis based on the study of structural features of the surface epithelium, the expression pattern of steroid hormones and leukemia-inhibitory factor in the "implantation window." The analysis of the morphological status of the endometrium in 76 patients (study group) with chronic endometritis and 20 gynecologically healthy women (control group) was carried out. It was established that patients with chronic endometritis observed disorder endometrial receptivity, including damage to the surface epithelium of the mucous membrane of the uterus, impaired maturation pinopodes the time "implantation window", decreased expression of leukemia-inhibitory factor, and this hyperexpression estrogen receptors. This could be the basis of violations of reproductive function in women with chronic endometritis.

Keywords: endometrial receptivity, chronic endometritis

Введение

В последние годы в литературе стало широко применяться понятие «рецептивность эндометрия». Рецептивность эндометрия (англ. receptivity - восприимчивость, чувствительность) – комплекс структурно-функциональных характеристик слизистой оболочки матки, определяющий способность её к имплантации [1,2]. Это процесс сложной интеграции и многоуровневого «диалога» между эндометрием и эмбрионом в специфический период «окна имплантации» [3,4]. Потеря эндометрием рецептивности влечёт за собой срыв имплантации или развитие её патологических вариантов. Так, неадекватная рецептивность эндометрия обуславливает около 2-3 неудачных имплантаций, в то время как «эмбриональный фактор» ответственен лишь за 1/3 [5,6].

Продолжительность «окна имплантации» у человека составляет в среднем 4 дня: с 6 по 8-10 день по-

сле пика секреции лютеинизирующего гормона, или 20-24 день цикла (при 28-дневном менструальном цикле) [7,8].

Среди протеомных маркёров, связанных с рецептивностью эндометрия, выделяют различные молекулы адгезии, факторы роста, цитокины и рецепторы: семейство IL-1, LIF и LIF-R, $\alpha\text{V}\beta 3$, TNF- α , IFN- γ и др. Из них наиболее изученным является лейкокемия-ингибирующий фактор (LIF) – член семейства интерлейкина-6. Максимальная его экспрессия в эндометрии наблюдается на 20-й день цикла [9,10].

«Окно имплантации» в эндометрии соответствует средняя стадия фазы секреции. Эндометрий может обладать рецептивными свойствами только в том случае, если молекулярные маркёры рецептивности выявляются точно в среднюю стадию фазы секреции менструального цикла [11-13].

Одним из ключевых ультраструктурных образований, участвующих в формировании рецептивности, являются пиноподии [14], представляющие собой «структуры адаптации эндометрия к имплантации» [2]. Это микроскопические выпячивания в апикальной части поверхностного эпителия эндометрия, образующиеся на месте микроворсинок в «окно имплантации» и выступающие в полость матки. Предполагают, что основные рецепторы для прикрепления бластоциты располагаются на поверхности пиноподий, где также концентрированно экспрессируется LIF [10].

Эстрадиол и прогестерон регулируют большинство идентифицированных маркеров «окна имплантации» (пиноподии, LIF и др.) [11,15]. Поскольку действие стероидных гормонов осуществляется путём связывания со специфическими ядерными рецепторами, любой дисбаланс в экспрессии стероидных рецепторов может привести к нарушению морфофункциональных свойств эндометрия, его рецептивности. Поэтому определение уровня эстрогеновых (ER) и прогестероновых (PR) рецепторов в среднюю стадию фазы секреции позволяет дополнить морфологическое исследование эндометрия, оценить его рецептивность. В норме показатель соотношения PR/ER в строме колеблется от 2 до 4 [16].

В настоящее время активно обсуждается роль различных патологических процессов, способных повлиять на рецептивность эндометрия. Среди них следует особо выделить хронический эндометрит (ХЭ). Это клинкоморфологический синдром, при котором в результате повреждения эндометрия инфекционным агентом возникают множественные вторичные морфофункциональные изменения, нарушающие циклическую биотрансформацию слизистой оболочки матки, что приводит к стойкому нарушению менструальной и генеративной функций [17]. Частота встречаемости ХЭ в популяции составляет 2,6-51%. Причём среди этих женщин бесплодны 60,4%, а неудачные попытки ЭКО и переноса эмбрионов отмечены у 37%. В 2006 г. FIGO уравнила понятия «неразвивающаяся беременность» и «хронический эндометрит». При этом влияние ХЭ на рецептивность эндометрия изучено недостаточно. В этой ситуации своевременное квалифицированное морфологическое исследование слизистой оболочки матки может иметь решающее значение для выяснения механизмов нарушения рецептивности эндометрия и восстановления возможных нарушений репродуктивного здоровья [18,19].

Целью исследования явилась оценка рецептивности эндометрия у женщин с хроническим эндометритом на основании изучения характера секреторных преобразований, количества зрелых пиноподий в поверхностном эпителии, уровня экспрессии рецепторов к стероидным гормонам и лейкоингибирующему фактору (LIF).

Материалы и методы

Осуществлён анализ морфологического состояния эндометрия у 76 пациенток, страдающих ХЭ (основная группа), и 20 гинекологически здоровых женщин (группа сравнения), обратившихся по вопросам планирования семьи.

Критерий исключения: прием гормональных препаратов в течение последних двух месяцев перед исследованием.

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, а также специальные методы исследования. Последние включали комплекс методов диагностики генитальной инфекции (ПЦР, микроскопия, культуральный метод), морфологические методы исследования эндометрия, полученного путем пайпель-биопсии на 7-8 день после овуляции (20-21 день менструального цикла). Все пациентки находились в репродуктивном возрасте, имели овуляторный менструальный цикл, нормальный уровень гормонов гипоталамо-гипофизарной системы, стероидных гормонов яичников, гормонов надпочечников, щитовидной железы в сыворотке крови.

Эндометрий подвергали комплексному морфологическому и морфометрическому исследованию. Гистологическое изучение парафиновых срезов эндометрия проводили при окраске материала гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону и метиловым зеленым-пиронином по Браше. При этом обращали внимание на степень активности ХЭ [20].

В биоптатах эндометрия, окрашенных гематоксилином и эозином, при увеличении светового микроскопа $\times 600$ подсчитывали процент покровных эпителиоцитов, имеющих пиноподии в 10 полях зрения.

Тканевые образцы для иммуногистохимического исследования готовили по общепринятой методике. Используемые моноклональные антитела были предназначены для работы с парафиновыми срезами по общепринятым протоколам (Novocastra protocols). Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему «Novostain Universal Detection Kit» («Novocastra», UK). Использование каждого вида антител сопровождалось постановкой реакции положительного контроля на тех же самых срезах согласно оригинальным инструкциям по их использованию.

Для суждения о состоянии стероидной рецепции эндометрия определяли процент клеток поверхностного эпителия, желёз и стромы, экспрессирующих ER α и PR (ER α – clone 6F11, r.t.u.; PR – clone 1A6, r.t.u.; «Novocastra», UK) с помощью метода гистологического счёта HISTO Score с вычислением прогестерон-эстрогенового индекса (PR/ER α). Для этого использовали формулу: $HS = 1a + 2b + 3c$, где a - % слабо окрашенных клеток, b - % умеренно окрашенных клеток, c - % выражено окрашенных клеток. 1, 2, 3 – степень выраженности экспрессии, выраженная в баллах. Степень выраженности экспрессии ER α и PR оценивали в баллах следующим образом: 0-10 баллов – отсутствие экспрессии, 11-100 – слабая экспрессия, 101-200 – умеренная экспрессия, 201-300 – выраженная экспрессия.

Исследование уровня экспрессии LIF проводили, используя поликлональные кроличьи антитела системы «Eritomics Inc.» (USA). Результаты иммуногистохимических реакций для LIF анализировали с помощью количественного метода, подсчитывая баллы по следующей методике: отсутствие иммуноокрашенных клеток (-) – 0 баллов, менее 5% иммуноокрашенных клеток (\pm) – 0,5 балла, менее 20% иммуноокрашенных клеток (+) – 2 балла, от 20 до 40% иммуноокрашенных клеток (++) – 4 балла, более 40% иммуноокрашенных клеток (+++) – 6 баллов

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

Сравнение между группами проводили непараметрическими статистическими методами с использованием критерия Манна-Уитни. Применялись методы вариационного, регрессионного анализа. Пороговую величину вероятности ошибки устанавливали традиционно на уровне, равном 0,05. Достоверность различий величин 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 [21]. Расчеты выполнены с помощью персонального компьютера с использованием программы «Биостатистика» и статистического пакета «Microsoft Excel-97» для операционной системы «Windows-98».

Результаты и обсуждение

Группы обследованных женщин были сопоставимы по характеру менструальной функции, сексуальному дебиюту, количеству родов и аборт, характеру контрацептивного поведения.

Каждая третья пациентка основной группы имела те или иные гинекологические заболевания в анамнезе, преимущественно, осложненную эктопию цилиндрического эпителия шейки матки и хронический цервицит, сальпингофорит, инфекции, передающиеся половым путем.

Морфологическое исследование биоптатов эндометрия показало, что у всех женщин основной группы имеются структурные изменения слизистой оболочки матки, характерные для ХЭ. Основными структурными компонентами воспаления в слизистой оболочке матки были значительные дистрофические изменения покровных эпителиоцитов и клеток желез, различно выраженная полиморфноклеточная инфильтрация с преобладанием лимфоплазмозитарных элементов, фибробластическая перестройка стромы и сосудов эндометрия. При этом степень активности воспалительного процесса наиболее часто была низкой либо умеренной.

Наличие различных микроорганизмов в ткани эндометрия у женщин основной группы выявлено в 100% случаев. Хламидийная инфекция зарегистрирована в эндометрии у 23,7% пациенток, микоплазменная – у 50%, вирусная инфекция – у 49%, аэробные и неспорообра-

зующие анаэробные бактерии обнаружены у 31,6% женщин. Следует отметить, что в эндометрии микроорганизмы выявлялись чаще, чем в цервикальном канале, что свидетельствует о необходимости идентификации возбудителей непосредственно в слизистой оболочке матки. Моноинфекция в эндометрии была зарегистрирована у 44,7% женщин основной группы.

В группе сравнения во всех биоптатах эндометрий соответствовал средней стадии фазы секреции менструального цикла. Число поверхностных эпителиоцитов, имеющих апикальные выпячивания цитоплазмы (пиноподии), колебалось от 65 до 80% (в среднем – $69,3 \pm 2,1$) (рис 1, а, б – *эти и другие рисунки к статье см. на специальной цветной вкладке журнала – прим. ред.*). Мы, как и Е.А. Коган и соавт. [7], различали среди пиноподий созревающие, зрелые и увядающие их варианты. Созревающие пиноподии имели вид сливающихся апикальных реснитчатых цитоплазматических выростов. Зрелые пиноподии представляли собой булловидные выпячивания апикальной части эпителиоцитов с вакуолизацией цитоплазмы и смещением в эту зону клеточного ядра. Увядающие пиноподии выглядели спавшимися, разрушенными, напоминая структурные характеристики апокриновой секреции.

Среднее значение уровня PR в поверхностном и железистом эпителии составило $124,8 \pm 8,3$ балла, в клетках стромы – $212,3 \pm 14,5$ балла. Одноименные значения параметров экспрессии ER α оказались равными $60,8 \pm 4,5$ и $96,4 \pm 5,3$ балла соответственно (рис. 1, в, г). Соотношение PR/ER α во всех наблюдениях группы сравнения было больше двух: для поверхностных эпителиоцитов и клеток желез средний показатель PR/ER α -индекса составил $2,1 \pm 0,1$, для клеток стромы – $2,2 \pm 0,1$.

У женщин с ХЭ эндометрий находился преимущественно в ранней стадии фазы секреции, реже – в средней стадии. Уровень поверхностных эпителиоцитов с пиноподиями (рис. 2, а) был достоверно ниже, чем в группе сравнения (средний показатель $37,5 \pm 2,1$; $p < 0,01$), что мы связываем с альтеративными изменениями покровных клеток различной степени выраженности, обусловленными активным ХЭ. При этом обнаружено уменьшение высоты покровного эпителия и его объемной плотности ниже контрольных значений, а также нарушение дифференцировки эпителиоцитов в виде резкого снижения числа реснитчатых клеток и повышения количества активно секретирующих эпителиальных элементов. Наблюдалось увеличение уровня экспрессии ER α в покровном и железистом эпителии (в среднем $102,5 \pm 6,8$ балла; $p < 0,01$), а также в клетках стромы ($110,2 \pm 8,3$ балла; $p > 0,05$) (рис. 2, б). Интенсивность экспрессии PR, напротив, была достоверно ниже относительно одноименных показателей группы сравнения как в покровном эпителии и glandулоцитах желез (в среднем $104,7 \pm 5,5$ балла; $p < 0,01$), так и в клетках стромы ($178,5 \pm 11,3$ балла; $p < 0,01$) (рис. 2, в). Соотношение PR/ER α в наблюдениях основной группы во всех случаях было меньше двух: средний показатель PR/ER α -индекса для поверхностных эпителиоцитов и клеток желез составил $1,1 \pm 0,09$, для клеток стромы – $1,6 \pm 0,1$.

Известно [5,22], что уменьшение интенсивности экспрессии ERα осва-бождает от подавления определённые гены, запускающие внутриматочную рецептивность. Напротив, гиперэкспрессия ERα и снижение представительства PR, обнаруженное нами и другими авторами [23], трактуется как нарушение экспрессии биологических маркёров имплантации. При этом отсутствие физиологического снижения ERα в средне-секреторную фазу менструального цикла может быть связано с неадекватным уровнем прогестерона в сыворотке крови, чрезмерной экспрессией коактиваторов стероидных рецепторов и некоторых провоспалительных цитокинов, что зачастую наблюдается при ХЭ.

Маркёр рецептивности эндометрия (LIF) регистрировался в цитоплазме покровных эпителиоцитов и glanduloцитов маточных желёз (рис. 1, д). Наибольшая экспрессия этого маркёра отмечалась в апикальных зонах эпителиальных клеток, особенно в проекции пиноподий, на что указывали и другие авторы [9,12]. Показатели экспрессии LIF в биоптатах группы сравнения составили $4,01 \pm 1,3$ балла. При ХЭ интенсивность экспрессии этого маркёра рецептивности была резко снижена (рис. 2, г) и оказалась равной $0,95 \pm 1,3$ балла ($p < 0,01$).

Выявленные закономерности свидетельствуют о том, что ХЭ сопровождается почти четырёхкратным снижением уровня экспрессии LIF, что указывает на значительное угнетение рецептивности эндометрия и может рассматриваться как прогностический маркёр неудачной имплантации.

Заключение

У пациенток с ХЭ наблюдается расстройство рецептивности эндометрия, включающее повреждение поверхностного эпителия слизистой оболочки матки, нарушение созревания пиноподий к моменту «окна имплантации», снижение экспрессии LIF и гиперэкспрессию ERα. Это может лежать в основе нарушения репродуктивной функции у женщин с ХЭ. ■

Е.Л. Казачков, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО Южно-Уральский ГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Э.А. Казачкова, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский ГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Е.Е. Воропаева, д-р мед. наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский ГМУ Минздрава России, г. Челябинск; И.Г. Хелашвили, заочный аспирант кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО Южно-Уральский ГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Л.Е. Мирошниченко, заочный аспирант кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Южно-Уральский ГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку - Е.Л. Казачков, 454052, г. Челябинск, а/я 6123, тел. 8(351)2320145; моб. +79123232974; e-mail: doctorkel@narod.ru

Литература:

1. Gautray J.P. Uterine diseases of receptivity of central origin. Rev. Fr. Gynecol. 1959; 29(1): 46-53.
2. 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; 272: 2723-25.
3. Шуршалина А.В., Демура Т.А. Морфофункциональные перестройки эндометрия в «окно имплантации». Акуш. и гинекол. 2011; 7-2: 9-13.
4. Bercovici J.P. Receptiveness to sexual steroids. Phys. Aspects Rev. Med. Int. 1983; 4(4): 335-42.
5. Дюжева Е.В., Коган Е.А., Калинина Е.А., Кузьмичев А.Н. Принципы индивидуальной гормональной подготовки эндометрия у пациенток с неэффективными попытками ЭКО. Акуш. и гинекол. 2011; 7-2: 39-45.
6. Simon C., Moreno C., Remohi J., Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. J. Reprod. Immunol. 1998; 39: 117-31.
7. Коган Е.А., Демура Т.А., Водяной В.Я., Шуршалина А.В. Молекулярные и морфологические аспекты нарушений рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите. Архив патологии 2012; 74 (3): 15-27.
8. Mercader A., Garcia-Velasco J.A., Escudero E. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. Fertil. and Steril. 2003; 80 (5): 1162-68.
9. Steck T., Giess R. Leukemia inhibitor factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2004; 112: 69-73.
10. 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; 14(2): 179-92.
11. Kadaman P.H., Taylor H.S. Hormonal regulation of implantation. Obstet. Gynecol. Clin. N. Am. 2004; 31: 745-66.
12. Acache H., Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum. Reprod. Update 2006; 12: 731-46.
13. Haouzi D., Mahmoud K., Fourar M. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. Hum. Reprod. 2009; 24 (1): 198-205.
14. Quinn C., Casper R. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. Hum. Reprod. Update 2009; 15: 229-36.
15. Creus M., Ordi J. The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study. Hum. Reprod. 2003; 18: 683-93.
16. Ola B., Li T.-C. Implantation failure following in-vitro fertilization. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2006; 18: 440-5.
17. Казачкова Э.А. Патогенез, клинко-морфологическая характеристика и лечение воспалительных заболеваний матки и придатков [диссертация]. Челябинск: ЧелГМА 2000; 1-303.
18. Радзинский В.Е., Оразмурадов А.А. (ред.) Ранние сроки беременности: М, 2009.
19. Левинашвили М.М., Демура Т.А., Мишиева Н.Г., Файзуллина Н.М., Назаренко Т.А., Коган Е.А. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального

- оплодотворения в анамнезе. *Акуш. и гинекол.* 2012; 4-1: 65-9.
20. Воропаева Е.Е. Самопроизвольный аборт: патоморфоз, этиология, патогенез, клинко-морфологическая характеристика, реабилитация [диссертация]. Челябинск: ЧелГМА 2011; 1-449.
21. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М: изд-во РАМН; 2000.
22. Talbi S, Hamilton A.E, Vo K.C. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normoovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097-121.
23. Donaghy M., Lessey B.A. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. *Semin. Reprod. Med.* 2007; 25: 461-75.

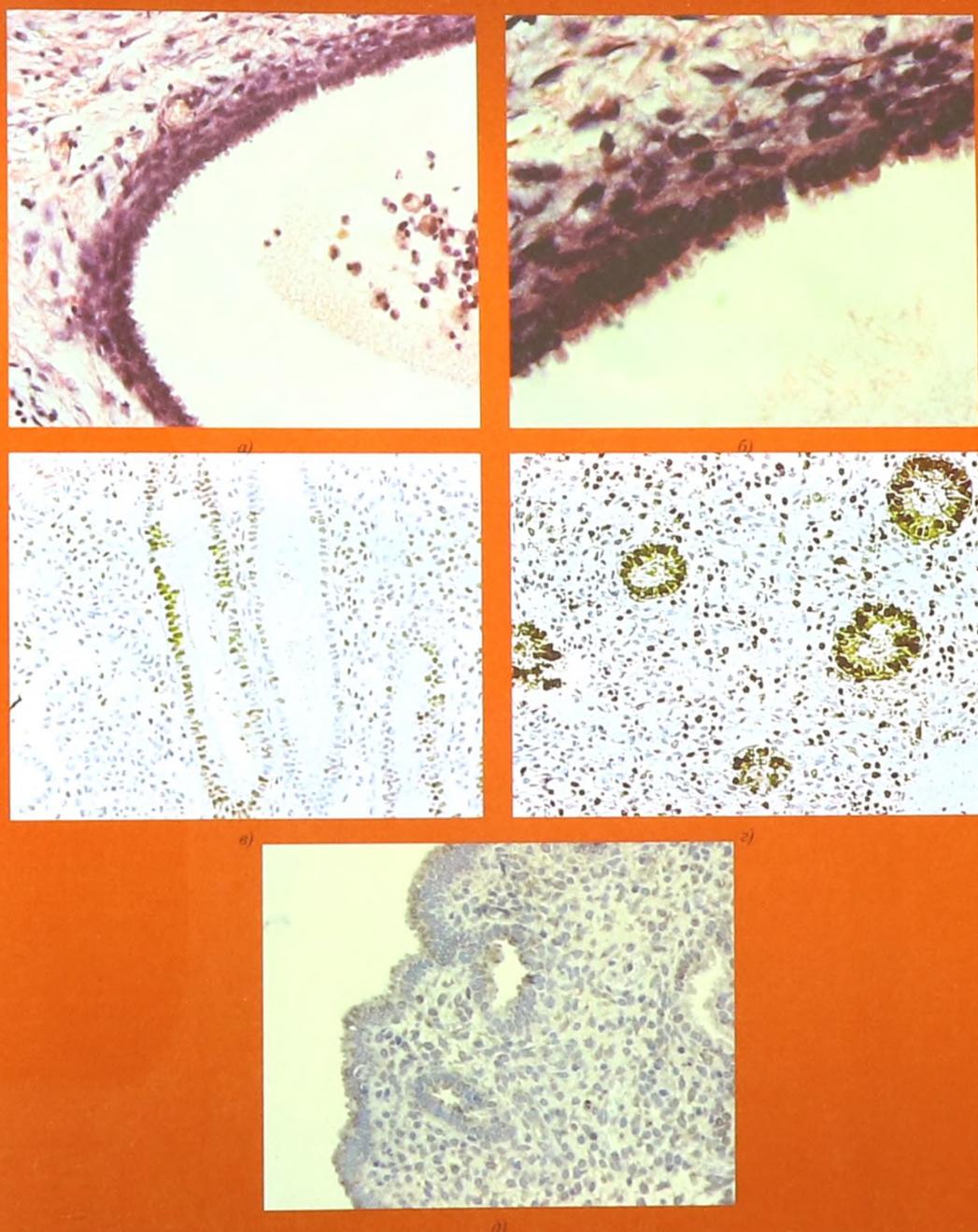
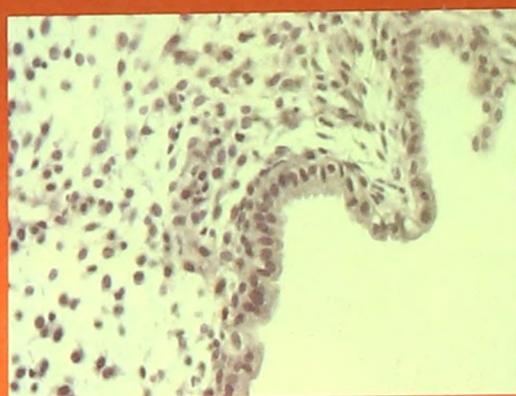


Рис. 1. Структурная характеристика рецептивности эндометрия в «окно имплантации» у гинекологически здоровой женщины группы сравнения

а – значительное представительство апикальных выпячиваний цитоплазмы (зрелых пиноподий) на поверхностных эпителиоцитах; б – деталь рис. 1,а; в – умеренная экспрессия ERα glandулоцитами желез; г – интенсивная экспрессия PR эпителием маточных желез и клетками стромы эндометрия; д – значительная экспрессия рецепторов LIF в цитоплазме покровных эпителиоцитов и glandулоцитов маточных желез. Окраска: а,б – гематоксилином и эозином; в-д – стрептавидин-биотинный иммунопероксидазный метод, докраска гематоксилином а,в-д – $\times 200$; б – $\times 600$.



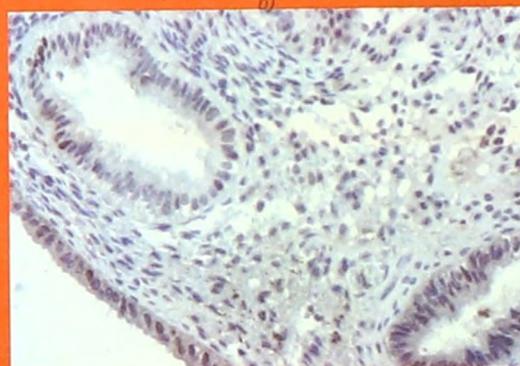
а)



б)



в)



г)

Рис. 2. Структурная характеристика рецептивности эндометрия в «окно имплантации» при хроническом эндометрите

а – снижение уровня апикальных выростов цитоплазмы (созревающих пиноподий) на поверхностных эпителиоцитах; б – резкое усиление экспрессии ERα glandулоцитами желёз; в – низкий уровень экспрессии PR эпителием маточных желёз; г – значительное снижение интенсивности экспрессии рецепторов к LIF в покровных эпителиоцитах и glandулоцитах эндометриальных желёз. Окраска: а – гематоксилином и эозином, б-г – стрептавидин-биотинный иммунопероксидазный метод, докраска гематоксилином, а – х400, б-г – х200.