

Зильбер М.Ю., Сазонов С.В., Цыганенко С.В.

Состояние рецепторного аппарата эндометрия при неудачах после вспомогательных репродуктивных технологий

Гинекологическое отделение МБУ ЦГКБ №24, г.Екатеринбург; кафедра акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития РФ, г. Екатеринбург; лаборатория патоморфологии ГБУЗ СО «Института медицинских клеточных технологий», г.Екатеринбург

Zilber M. Y., Sazonov S. V., Tsiganenko S. V.

Receptive assessment in endometrial failure after assisted reproductive technologies

Резюме

Проспективное исследование, включающее 30 женщин с неудачными попытками ВРТ в анамнезе, которым проводилось иммуногистохимическое исследование эндометрия, полученного путем биопсии под контролем гистероскопии на 15-17 день менструального цикла: определялась экспрессия стероидных рецепторов, CD20 (клон L26), CD56 (клон 123C3), CD16 (клон 2H7), HLA-DR (клон TAL.1B5), Ki67. Определено 3 профиля состояния эндометрия: высокоэкспрессивный (экспрессия стероидных рецепторов в строме и железах +7, +8, повышенные значения HLA-DR и Ki 67), среднеэкспрессивный (экспрессия прогестероновых рецепторов в строме составила 5+, 6+, в железах 6+, 7+; эстрогеновых от 4+ до 6+ и в строме и в железах, высокий уровень CD16 и 56, HLA-DR, т.е., в данной группе мы можем предположить иммунный механизм бесплодия), низкоэкспрессивный (экспрессия рецепторов наиболее низкая, меньше 4+). Выделение данных профилей позволяют в клинике осуществить подбор адекватной патогенетической терапии патологии эндометрия.

Ключевые слова: иммуногистохимия, стероидные рецепторы, неудачи ВРТ

Summary

A prospective study involving 30 women with failed attempts in the history of ART, which was carried out immunohistochemical study of the endometrium obtained by biopsy under the control of hysteroscopy in the 15-17 day menstrual cycle was determined by the expression of steroid receptors, CD20 (clone L26), CD56 (clone 123C3), CD16 (clone 2H7), HLA-DR (clone TAL.1B5), Ki67. Defined 3 profiles the endometrium: higherexpressivity (steroid receptor expression in the stroma and glands 7, 8, higher values of HLA-DR and Ki 67), mediaexpressivity (progesterone receptor expression in the stroma was 5 + 6 + 6 + in the glands, 7 +, estrogen from 4 + to 6 + and in the stroma and glands, high levels of CD16 and 56, HLA-DR, ie, in this group, we can suggest an immune mechanism of infertility), lowexpressivity (lowest expression of the receptor, less than 4 +). solation of these profiles allow the clinic to carry out the selection of adequate pathogenetic therapy of endometrial pathology.

Keywords: immunohistochemistry, steroid receptors, unsuccessful attempts to ART

Введение

Как известно, адекватное морфофункциональное состояние эндометрия и достаточный уровень стероидных гормонов в крови являются одними из основных факторов, обеспечивающих успешную имплантацию оплодотворенной яйцеклетки и развитие эмбриона [3,6,12]. Однако, не менее важным фактором в процессе имплантации является рецептивность эндометрия [2,8,10], т.е. количество функционально полноценных рецепторов тканей эндометрия к соответствующим стероидным гормонам. При нарушении структуры и функции эндометрия (хронический эндометрит, гиперпластические процессы, полипоз) в

первую очередь повреждается рецепторный аппарат [1], реализуясь в нарушениях менструального цикла, невынашивании беременности, неудачных попытках ВРТ [4,5,7].

Цель исследования – оценить экспрессию стероидных рецепторов эндометрия и состояние локального иммунитета при неудачах вспомогательных репродуктивных технологий.

Материалы и методы

На базе гинекологического отделения МБУ ЦГКБ №24 г.Екатеринбурга и лаборатории патоморфологии ГБУЗ СО «Института медицинских клеточных техноло-

гий» нами было проведено проспективное исследование, включающее 30 женщин с неудачными попытками ВРТ в анамнезе.

На каждую пациентку была заполнена специально разработанная стапистическая карта наблюдения, получено добровольное информированное согласие. Всем женщинам в группах проводились общеклинические, гормональные исследования, УЗИ на 5-7 день цикла, определение бактериально-вирусной инфекции в супружеской паре. Специфическим методом явилось иммуногистохимическое исследование эндометрия, полученного путем биопсии под контролем гистероскопии на 15-17 день менструального цикла, включающее определение экспрессии стероидных рецепторов, CD20 (клон L26), CD56 (клон 123C3), CD16 (клон 2H7), HLA-DR (клон TAL.1B5), Ki67. Определение экспрессии рецепторов Estrogen и Progesterone и Ki-67, осуществлялись в автоматизированной системе «ДАКО» (США) с использованием моноклональных мышиных антител (Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor, alpha Clone 1D5; Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636; Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1). Предварительно гистологические срезы обрабатывались в барокамере «Paskal DAKO Cytomation» в течение 10 минут при давлении 22Р и температуре 127° С. Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе «Zeiss Ymager M» (Германия). Уровень экспрессии рецепторов Estrogen и Progesterone определялся по шкале от 0 до 8+. Экспрессия белка Ki-67 оценивалась по проценту маркированных клеток.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакетов прикладных программ Microsoft® Excel 2007 и Stat Soft 6.0. Достоверность различий между группами оценивалась с помощью непараметрического критерия Мак-Нимара с поправкой Холмса.

Результаты и обсуждение

Характеризуя исследуемых женщин, мы отметили высокую отягощенность по соматическому здоровью и состоянию генеративной функции. Длительный бесплодный период, характерный для данных пациенток, приводит к тому, что упускается самый благоприятный возраст для наступления беременности, и она наступает в позднем репродуктивном периоде на фоне накопившихся соматических и гинекологических патологий. Более детальное изучение экстрагенитальной патологии показало, что ведущее место занимают заболевания сердечно-сосудистой системы в виде нейро-циркуляторной дистонии различных типов 11(36,7%) и гипертонической болезни 5(16,7%) и пищеварительной систем (до 36%). В анамнезе у женщин после ВРТ с высокой частотой встречалась эндокринная патология, особенно гиперандрогения различного генеза 9(30%) и гипотиреоз 4(13,3%).

Начало менструаций осуществилось в срок, средний возраст 12,5(0,4). Нами была проведена более подробная характеристика менструального цикла у исследуемых женщин. Так, продолжительность цикла составила 21-35 дней, а у 50% женщин более 35 дней. Средняя длитель-

ность менструации 4-5 дней. Менструации были обильными, болезненными и нерегулярными у 50% женщин. Анализ гинекологической заболеваемости свидетельствовал о высокой частоте воспалительной патологии гениталий (хронический аднексит, эндометрит) 17(56,7%); на этапе подготовки к ВРТ у 24% пациенток были пролечены доброкачественные опухоли и опухолевидные заболевания яичников, гиперпластический процесс эндометрия (16%), нередко носивший рецидивирующий характер. На этапе прегравидарной подготовки и в анамнезе у большого количества женщин после ВРТ проводилась хирургическая коррекция различных патологий половых органов. Наиболее частыми явились операции на матке и придатках. Так, миомэктомии проводились в 18,67% соответственно, операции на яичниках встречались в более чем 30% случаев, что может наталкивать на мысль о снижении фолликулярного запаса у данной категории пациенток, усугубляя проблему их бесплодия и ухудшая шансы наступления беременности с помощью ВРТ. Также высок процент диагностических лапароскопий в сочетании с гистероскопией до 20%. Репродуктивные потери в анамнезе (неразвивающиеся беременности, выкидыши, аборты, внематочные беременности) зафиксированы в 63,3%, причем 24% из них составили внематочные беременности.

В структуре бесплодия преобладали трубно-перитонеальный (44%) и мужской факторы (34%). Общая длительность бесплодия колебалась от 1 до 22 лет, у 16,7% (5) пациенток длительность бесплодия превышала 10 лет. Частота встречаемости первичного бесплодия была выше 19(63,3%). Число циклов, которые потребовались для достижения беременности от 1 до 7. Беременность наступила с первой попытки ВРТ у 64% женщин, а 6-7 циклов потребовалось лишь 8% пациенток. ЭКО ИКСИ проводилось 34,6% пар. Перенос в матку криоэмбрионов осуществлен лишь у 9,6%.

Гистероскопия проводилась в плановом порядке на 15-17 день цикла под внутривенным обезболиванием. Под контролем гистероскопа производилась биопсия эндометрия, который направлялся на гистологическое (таблица 1) и иммуногистохимическое исследования. В результате мы обнаружили интересную особенность: женщины разделились на 3 профиля по силе экспрессии прогестероновых и эстрогеновых рецепторов в эндометрии и локального иммунитета – высокоэкспрессивный, среднеэкспрессивный и низкоэкспрессивный.

В высокоэкспрессивный профиль (I группа) вошли женщины, которые имели склонность к гиперпластическому синдрому в виде доброкачественных опухолей матки и яичников, железистой гиперплазии эндометрия с дисменореей. По результатам иммуногистохимии была отмечена высокая экспрессия и прогестероновых и эстрогеновых рецепторов, как в строме, так и в железах +7, +8. Кроме того, были отмечены повышенные значения HLA-DR и Ki 67.

Среднеэкспрессивный профиль (II группа): это были более молодые женщины с неотягощенным соматическим анамнезом, с нормальным менструальным

Таблица 1. Итоги гистологического исследования эндометрия (* $p < 0,001$)

Гистологический диагноз	I группа		II группа		III группа	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Хр. неактивный эндометрит	1	10	1	10	8	80*
Железистая гиперплазия	5	50*	1	10	1	10
Полипоз эндометрия	4	40*	1	10	1	10
Нормальный эндометрий фазы секрети	3	30	7	70*	0	0

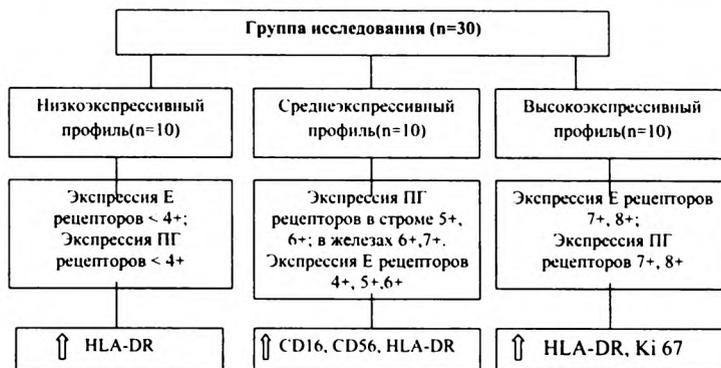


Рис.1. Распределение женщин по профилям эндометрия

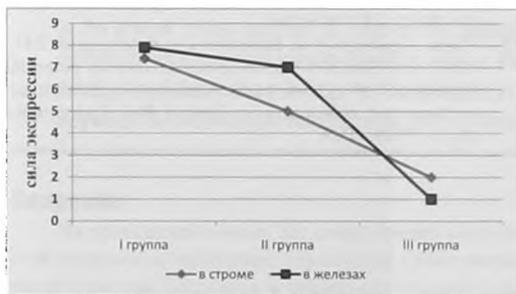


Рис.2. Экспрессия прогестероновых рецепторов в группах ($p < 0,05$)

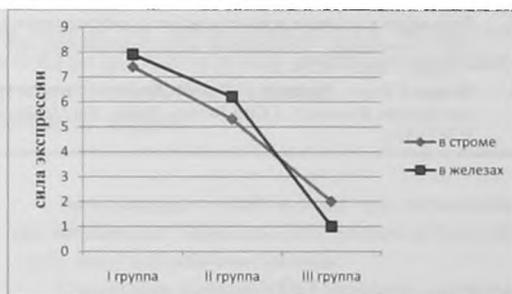


Рис.3. Экспрессия эстрогеновых рецепторов в группах ($p < 0,05$)

циклом. По результатам иммуногистохимии экспрессия прогестероновых рецепторов в строме составила 5+, 6+, в железах 6+, 7+; эстрогеновых от 4+ до 6+ и в строме и в железах, т.е. экспрессия прогестероновых рецепторов несколько выше, чем эстрогеновых. Кроме того, был отмечен высокий уровень CD16 и 56, HLA-DR. Т.е., в данной группе мы можем предположить иммунный механизм бесплодия.

Пациенток низкоэкспрессивного профиля (III группа) характеризовала высокая частота гражданских браков, раннее начало половой жизни, частая смена половых партнеров, болезненные, нерегулярные менструации. Высокий уровень воспалительных заболеваний органов малого таза, хронической внутриматочной инфекции. Для них было характерно чаще первичное бесплодие длительностью от 2 до 10 лет. В данном профиле экспрессия рецепторов была наиболее низкая (меньше 4+),

причем в двух случаях рецепторы отсутствовали совсем.

Принципы формирования профилей эндометрия и уровни экспрессии прогестероновых и эстрогеновых рецепторов в железах и строме эндометрия изображены на рисунках 1, 2, 3. Для каждого из выявленных профилей требуется определенный вид гормональной поддержки, длительности и способа ее применения.

Заключение

Таким образом, выделение трех профилей состояния эндометрия: высокоэкспрессивный, среднеэкспрессивный и низкоэкспрессивный по результатам анализа силы экспрессии стероидных рецепторов и концентрации специфических иммунологических маркеров в эндометрии - позволяют в клинике осуществить подбор адекватной патогенетической терапии при неудачных попытках ВРТ. ■

Зильбер М.Ю. - д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии УГМА Минздравоохранения РФ, зам. главного врача по акушерству и гинекологии МБУ ЦГКБ №24, г. Екатеринбург; *Сазонов С.В.* - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО УГМА Минздравоохранения РФ, заведующий лабораторией патоморфологии ГБУЗ СО «Института медицинских клеточных технологий», г.Екатеринбург; *Цыганенко С.В.* - аспирант кафедры акушерства и гинекологии УГМА, врач акушер-гинеколог МБУ ЦГКБ №24, г.Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку – Цыганенко Светлана Владимировна, 620144 г.Екатеринбург, ул.Сурикова 37-21, e-mail: tsiganenko@el.ru

Литература:

1. Амирова А.Ф. Особенности повторной попытки экстракорпорального оплодотворения у пациенток с предыдущей неудачей/ Проблемы репродукции, 2010.- №4.- С.35-38.
2. Котиков А.Р. Экспрессия рецепторов эндометрия к эстрогенам и прогестерону при бесплодии, обусловленном хроническим эндометритом/ Проблемы репродукции, 2006.- № 2. - С.7-10.
3. Самойлова А.В., Кострова Е.В. Особенности экспрессии рецепторов к эстрадиолу и прогестерону при гиперплазиях эндометрия у женщин с эндокринным бесплодием/ Журнал акушерства и женских болезней.- 2009.- Т. LVIII выпуск 1.- С.38-41.
4. Самойлова А.В., Кострова Е.В. Рецепторный аппарат эндометрия у женщин репродуктивного возраста с яичниковой недостаточностью/ Журнал акушерства и женских болезней.- 2008.- Т. LVII выпуск 4.- С.103-107.
5. Самойлов М.В., Серебрянникова К.Г., Бессмертная В.С. и др. Алгоритм клинико-морфологического обследования эндометрия при подготовке к лечению бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий / Российский медицинский журнал. - 2009 - №2 - С.29-32.
6. Bonnie J. Deroo, Kenneth S. Korach. Estrogen receptors and human disease// J Clin Invest.- 2006.- Vol.116(3).- P.561-570.
7. Gabriela F Meresman. Apoptosis is increased and cell proliferation is decreased in out-of-phase endometria from infertile and recurrent abortion patients// Reprod Biol Endocrinol.- 2010.- Vol.8.- P.126.
8. Gimenes C et al The progins progesterone receptor gene polymorphism is not related to endometriosisassociated infertility or to idiopathic infertility// Clinics (Sao Paulo).-2010.- Vol.65(11).- P.1073-1076.
9. Hany Abdel-Hafiz et al. Mechanisms Underlying the Control of Progesterone Receptor Transcriptional Activity by SUMOylation// Biol Chem.- 2009.- Vol.284(14).- P.9099-9108.
10. Katherine M. Scarpin, J. Dinny Graham. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression// Nucl Recept Signal. - 2009.-Vol.7.- P.33-35.
11. Kathryn B. Horwitz. Estrogen receptor related beta is expressed in human endometrium throughout the normal menstrual cycle// Hum Reprod. - 2008.- Vol.23(12).- P.2782-2790.
12. Tapia Alejandro et al. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity// Reprod Biol Endocrinol.- 2011.- Vol.9.- P.14