

# Цитопротекция слизистой оболочки матки у женщин с невынашиванием беременности ранних сроков инфекционно–воспалительного генеза: лектиногистохимическое исследование

Е. Е. Воропаева, к. м. н.

Кафедра патологической анатомии с секционным курсом, акушерства и гинекологии № 1 ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Росздрава»

## Citoprotection of endometrium in women with syndrome of loss of pregnancy of early terms by infectionally–inflammatory genesis: lectin–histochemical research

E. E. Voropaeva

The Chelyabinsk state medical academy

### Резюме

**Цель исследования** — дать структурную характеристику мукопротективного аппарата слизистой оболочки матки у женщин с невынашиванием беременности ранних сроков инфекционно–воспалительного генеза.

Проведено лектиногистохимическое исследование аспирационных биоптатов эндометрия от 84 пациенток в возрасте 18–35 лет с невынашиванием беременности (НБ) ранних сроков инфекционно–воспалительного генеза. Контроль — биоптаты эндометрия от 15 соматически и гинекологически здоровых женщин репродуктивного возраста, при исследовании которых установлены селективные лектиновые маркеры некоторых компонентов мукоцилиарного аппарата неизмененного эндометрия. У всех женщин основной группы имелись структурные изменения слизистой оболочки матки, характерные для хронического эндометрита (ХЭ). При НБ, ассоциированном с ХЭ, отмечено повышение уровня связывания фукомуцинов и падение уровня сиаловых кислот (угнетение бактерицидных свойств маточной слизи). Это может способствовать застою слизи в полости матки, персистенции микроорганизмов, обуславливать развитие воспалительных, дистрофических и дисрегенераторных процессов в эндометрии, а также иметь значение в формировании местных иммунопатологических реакций, затрудняющих процесс имплантации плодного яйца в эндометрий.

**Ключевые слова:** синдром потери плода инфекционного генеза, лектиногистохимия эндометрия.

### Summary

**Aim of this research** is to give structural characteristic of mucoprotective apparatus of endometrium at female which were suffering from the loss of pregnancy early term with infection–inflammation genesis.

Lectinohistochemical research of aspiration biopsies of endometrium from 84 patients in age 18–35 years which were suffering from the loss of pregnancy early term with infection–inflammation genesis was performed. Control is biopsies of endometrium from 15 somatically and gynecologically healthy women of the reproductive age, at which research and had established selective lectine markers of some components of mucociliary apparatus of normal endometrium. All females of basic group have structural change of endometrium, wich characteristic for chronic endometritis. At the loss of pregnancy associated with chronic endometritis are noted increase level of connecting fucomucins and decrease level of sialic acid (depression of bactericidal property of uterine mucus). This can be promote stagnation of mucus in cavity of uteri, persistence of microorganisms, cause development of inflammatory, dystrophy and disregeneratory processes in endometrium, and also have significance in formation local immunopathologic reaction, wich complicate process of implantation of fetal ovum in endometrium.

**Key words:** syndrome foetal loss, infectious genesis: lectin–histochemical research of endometrium.

### Введение

Среди большого количества экзо- и эндогенных причин инфекционно–воспалительные поражения эндометрия являются ведущими в генезе невынашивания беременности (НБ). Они нередко являются дебютом большинства гинекологических заболеваний, нарушающих фун-

кцию репродуктивной системы, и ведущих к формированию синдрома привычной потери беременности. При этом своевременное квалифицированное морфологическое исследование слизистой оболочки матки имеет решающее значение для выяснения механизмов развития НБ и восстановления возможных нарушений репродуктивного здоровья [1].

Защитные свойства слизистой оболочки матки во многом определяются составом маточной

Е. Е. Воропаева — ассистент кафедры акушерства и гинекологии №1 Челябинской государственной медицинской академии, к. м. н.

слизи [2, 3]. Это важнейший компонент мукоцилиарной системы эндометрия (гландулоциты и окружающие их реснитчатые эпителиоциты), который является надежным барьером на пути экзогенных факторов повреждения слизистой оболочки матки [4,5]. Протективные свойства секрета эндометриальных желез, как и мукопротективного аппарата других слизистых оболочек, обусловлены наличием в нем секреторных гликопротеинов — белков, содержащих концевые олиго- и моносахаридные цепи [6].

Традиционные методы гистохимии углеводсодержащих биополимеров при значительном разнообразии получаемой с их помощью информации не лишены ряда существенных недостатков. Главные из них — сравнительно низкая чувствительность (в частности, для положительного результата ШИК-реакции содержание углеводного компонента должно составлять 0,5-1,0% сухой массы ткани), недостаточная селективность к отдельным классам гликополимеров, неприемлемость ряда классических методов гистохимии углеводов для прижизненного изучения тканевых материалов.

В последние годы показана перспективность применения лектиногистохимических методов при анализе патологических процессов, сопровождающихся накоплением, перераспределением или извращением синтеза гликоконъюгатов в тканях [7-9]. С этой целью предложено использовать наборы лектинов различной углеводной специфичности, которые позволяют проводить избирательную идентификацию гликопротеинов. Насыщенность структур эндометрия углеводными детерминантами, а также отсутствие работ по сравнительному лектиногистохимическому исследованию слизеобразующего аппарата внутренней оболочки матки у здоровых женщин и больных хроническим эндометритом (ХЭ) послужили основанием для выполнения данной работы.

**Цель исследования** — дать структурную характеристику мукопротективного аппарата слизистой оболочки матки у женщин с невына-

шиванием беременности ранних сроков инфекционно-воспалительного генеза.

## Материалы и методы

Объектом изучения являлись аспирационные биоптаты эндометрия, полученные у 84 пациенток в возрасте 18-35 лет с НБ ранних сроков инфекционно-воспалительного генеза. Кроме того, контролем служили биоптаты слизистой оболочки матки от 15 соматически и гинекологически здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся для обследования перед планированием беременности или контрацепции, у которых при комплексном клиническом исследовании и морфологическом изучении тканевого материала внутренней оболочки матки были исключены воспалительные поражения внутренних половых органов. Все женщины дали информированное согласие на участие в исследовании.

Во всех случаях материал забирали во вторую фазу менструального цикла. Кусочки ткани фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 часов и заключали в парафин. Срезы помещали на каплю дистиллированной воды на предметное стекло и высушивали при температуре 42°C в течение 48 часов. После депарафинирования и проведения через спирты нисходящей концентрации они тщательно промывались в забуференном изотоническом растворе хлорида натрия при pH=7,4, затем обрабатывались 0,001% растворами конъюгатов лектинов и инкубировались в течение 12 часов при температуре 4°C. Микропрепараты изучали с помощью микроскопа «Ахиорфот 2» в проходящем свете.

Для визуализации углеводных детерминант гликопротеинов в биоптатах эндометрия применен набор лектинов различной специфичности, конъюгированных с пероксидазой хрена («Лектинотест», г. Львов, Украина). Для обработки срезов были использованы лектин завязей пшеницы (WGA), специфичный к N-ацетил-D-глюкозамину (NAcDGlc), конканавалин А (con A), специфичный к  $\alpha$ -D-маннозе

Таблица 1. Лектины, использованные для лектиногистохимического исследования

Название лектина	Обозначение*	Углеводная специфичность (аббревиатура)
Лектин завязей пшеницы	WGA	N-ацетил-D-глюкозамин (NAcDGlc)
Конканавалин А	con A	$\alpha$ -D-манноза ( $\alpha$ DMan)
Лектин сои	SBA	N-ацетил-D-галактозамин (NAcDGal)
Лектин клещевины	RCA	$\alpha$ -D-галактоза ( $\alpha$ DGal)
Лектин арахиса	PNA	$\beta$ -D-галактоза ( $\beta$ DGal)
Лектин бузины черной	SNA	N-ацетилнейраминавая (сиаловая) кислота (NAcNeu)
Лектин бобовника анагирилистного	LAL	L-фукоза (LFuc)

Примечание. \* — сокращения наименований лектинов и аббревиатура представлены в соответствии с Международной номенклатурой лектинов [10].

Таблица 2. Интенсивность связывания лектинов рецепторами эпителиоцитов эндометрия в норме (n=15) и при невынашивании беременности, ассоциированном с хрон. эндометритом (n=84)

Углеводная специфичность	WGA (NAcDGlc)	con A ( $\alpha$ DMan)	SBA (NAcDGal)	RCA ( $\alpha$ DGal)	PNA ( $\beta$ DGal)	SNA (NAcNeu)	LAL (LFuc)
Покровные призматические реснитчатые эпителиоциты	++/100	+ -/60	+/80	+ -/50	--/0	+ -/30	+/70
	- -/0*	+ -/65	+80	+ -/55	--/0	--/0*	+75
Покровные призматические безреснитчатые эпителиоциты	+/40	+ -/45	+50	+50	--/0	+ -/60	+/80
	+ -/35	+ -/35*	+ -/40*	+ -/55	--/0	+ -/40*	+100*
Эпителиоциты желез	+/90	+ -/90	+50	+ -/45	--/0	+/100	+/65
	+ -/75*	+ -/85	+ -/45	+ -/65*	--/0	--/0*	+ -/90

Примечание. В числителе — результаты исследования неизмененного эндометрия, в знаменателе — результаты исследования эндометрия при НБ, ассоциированном с ХЭ; арабские цифры — процент положительных результатов при использовании определенных лектинов; \* — различия достоверны по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

( $\alpha$ DMan), лектин сои (SBA), специфичный к N-ацетил-D-галактозамину (NAcDGal), лектин клещевины (RCA), специфичный к  $\alpha$ -D-галактозе ( $\alpha$ DGal), лектин арахиса (PNA), специфичный к  $\beta$ -D-галактозе ( $\beta$ DGal), лектин бузины черной (SNA), специфичный к N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоте (NAcNeu) и лектин бобовника анагириолитного (LAL), специфичный к L-фукозе (LFuc) [10] (табл. 1). Активность пероксидазы в конъюгате определяли с помощью диаминобензидаина тетрагидрохлорида («Sigma», US) в присутствии  $H_2O_2$ .

Оценка результатов лектиногистохимического исследования полуколичественным методом при сравнении с контрольными показателями: «++» — очень интенсивное связывание лектина, «+» — значительное связывание лектина, «+-» — незначительное связывание лектина, «-» — связывание лектина отсутствует.

Общую морфологию биоптатов эндометрия исследовали после окраски серийных тканевых срезов гематоксилином и эозином, коллагеновые волокна идентифицировали по методу ван Гизона, эластические структуры — с помощью реакции Вейгерта, нейтральные мукополисахариды — ШИК-реакции, гликозаминогликаны — альцианового синего с ферментативными контролями. Выявленные изменения анализировали с учетом основных критериев морфологической диагностики ХЭ, разработанных нами ранее [11-13].

## Результаты

Морфологическое исследование биоптатов эндометрия показало, что у всех женщин основной группы имеются структурные изменения слизистой оболочки матки, характерные для ХЭ. При этом в 15 наблюдениях диагностирована стадия выраженной активности воспаления, в 47 — умеренной активности, а в 22 — низкой степени активности воспалительного процесса.

Исследование биоптатов группы контроля позволило установить селективные лектиновые маркеры некоторых компонентов мукоцилиарно-

го аппарата неизмененного эндометрия (табл. 2). Высокое сродство к терминальным углеводным детерминантам гликопротеинов покровных реснитчатых эпителиоцитов проявляли WGA, SBA и LAL. Причем более выраженная селективность отмечена у WGA, а представительство рецепторов к LAL регистрировали лишь в аликальной зоне реснитчатых клеток. Покровные безреснитчатые эпителиоциты избирательно реагировали с LAL и реже с SNA. В glanduloцитах желез отмечено высокое содержание рецепторов к WGA, con A, LAL и особенно SNA. Вместе с тем, слизь продуцирующая и слизьсодержащие эпителиальные элементы эндометрия практически были лишены рецепторов к PNA, то есть не содержали  $\beta$ -D-галактозу. При этом все эпителиоциты слизистой оболочки матки в большей или меньшей степени реагировали с RCA, специфичным к  $\alpha$ -D-галактозе. Следовательно, процесс сборки углеводной цепи гликопротеинов в клетках слизиобразующего аппарата эндометрия характеризовался последовательным включение моносахаров в олигосахаридную цепь, начинающуюся маннозой и кончающуюся сиаловыми кислотами или фукозой.

Любопытен тот факт, что гликопротеины в эпителиальных компонентах эндометрия имели различные качественные и количественные характеристики. Так, в слизи реснитчатых клеток закономерно выявлялись рецепторы к WGA, что иллюстрирует насыщенность этих эпителиоцитов NAcDGlc и, вероятно, объясняется их функциональными особенностями (колебательные движения ресничек). Безреснитчатые клетки избирательно связывали LAL, а glanduloциты желез — SNA. В связи с этим, полагаем, что безреснитчатые эпителиоциты вырабатывают нейтральную слизь, которая играет роль в механической защите эндометрия, а наибольшим цитопротективным действием обладают гликоконъюгаты эпителия маточных желез в связи с максимальной продукцией ими сиаловых кислот, обуславливающих бактерицидный эффект слизи.

Анализ лектиногистохимических реакций в тканевых образцах пациенток основной группы показал, что при ХЭ возникает перераспределение рецепторов к лектинам, указывающее на глубокие структурные изменения в углеводной цепочке гликопротеинов (табл. 2). Так, отмечено полное отсутствие связывания WGA рецепторами реснитчатых клеток, что указывает на исчезновение NAcDGlс и, в связи с этим, резкое угнетение двигательной активности реснитчатых выростов цитоплазмы glanduloцитов маточных желез. Вместе с тем, достоверно нарастала интенсивность связывания безреснитчатыми клетками LAL, что связано с повышением содержания в этих эпителиоцитах гликоконъюгатов, богатых терминальной фукозой.

Наконец, зарегистрировано резкое ослабление связывания рецепторами клеток эндометриальных желез SNA вплоть до полного исчезновения N-ацетилнейраминовых (сиаловых) кислот из этих эпителиоцитов. Следует отметить, что выявленные особенности слизеобразования при ХЭ были в большей степени выражены в стадии значительной активности воспалительного процесса.

Таким образом, проведенным исследованием установлено неравномерное распределение рецепторов к лектинам в эпителиальных структурах неизмененного эндометрия. Селективными маркерами призматических покровных реснитчатых клеток следует считать WGA, SBA и LAL, безреснитчатых эпителиоцитов — LAL и SNA, glanduloцитов желез — WGA, con A, SNA и LAL. Кинетическая активность реснитчатых клеток неизмененного эндометрия обусловлена высоким содержанием NAcDGlс, что документируется связыванием рецепторов к WGA высокой степени интенсивности. Бактерицидные свойства эндометриальной слизи в норме связаны, главным образом, с гликоконъюгатами клеток желез, поскольку другие эпителиальные компоненты внутренней оболочки матки продуцируют сиаломуцины в гораздо меньшей степени. Безреснитчатые клетки наиболее интенсивно вырабатывают гликопротеины, богатые терминальной фукозой и, тем самым, «ответственны» за продукцию нейтральной слизи и механическую защиту эндометрия.

При НБ, ассоциированном с ХЭ, выявлено существенное перераспределение рецепторов к лектинам. Это проявляется, прежде всего, в повышении уровня связывания всеми эпителиальными клетками эндометрия лектинов, имеющих сродство к фукомуцинам, что свидетельствует о гиперпродукции нейтральной слизи. Вместе с тем, в эпителии желез практически не регистрируются рецепторы к лектинам, селективно реагирующим с сиаловыми кислотами (резкое угнетение бактерицидных свойств маточной

слизи). При этом существенно страдает двигательная активность реснитчатых эпителиоцитов, что иллюстрируется при ХЭ отсутствием у этих клеток рецепторов к WGA. Зарегистрированные изменения защитных свойств слизевого покрытия эндометрия могут способствовать застою слизи в полости матки, персистенции микроорганизмов в структурах ее внутренней оболочки, обуславливать развитие и выраженность воспалительных, дистрофических и дисрегенераторных процессов в эндометрии, а также могут иметь значение в нарушении синтеза секреторного компонента иммуноглобулина А и формировании местных иммунопатологических реакций, существенно затрудняющих процесс имплантации плодного яйца в эндометрий [14-16]. Выявленные расстройства в продукции и распределении гликопротеинов в эпителиальных структурах слизистой оболочки матки при ХЭ позволяют обоснованно рекомендовать мероприятия по улучшению дренирования избытка нейтральной маточной слизи из половых путей и включать в комплексную терапию этого страдания, обуславливающего НБ, препараты-мукорегуляторы.

## Литература

1. Глуховец Б. И., Глуховец Н. Г. Патоморфол. диагностика ранних самопроизв. выкидышей. СПб: Грааль; 1999.
2. Бодяжина В. И. Хронич. неспецифические воспалительные заболев. женских половых органов. М: Мед; 1978.
3. Хмельницкий О. К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. СПб: ; 1994.
4. Топчиева О. И., Пранишников В. А., Жемкова З. П. Биопсии эндометрия. М: Медицина; 1978.
5. Sweet R. L. Pelvic inflammatory disease. Update in Obstetric and Gynecology. Russia. Moscow: 1994; 26.
6. Мари Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М: Медицина; 1993.
7. Казачков Е. Л., Коваленко В. Л. Содержание и распределение гликопротеинов в эпителиоцитах бронхов при хроническом бронхите (лектиногистохимическое исследование). Пульмонология. 1994; 2: 67-71.
8. Луцки А. Д., Детюк Е. С., Луцки М. Д. Лектины в гистохимии. Львов: Вища школа; 1989.
9. Sharon N., Lis H. Lectins. NY; 1989.
10. Bob-Hansen T. S., Breborowich J. Lectins biology, biochemistry, clinical biochemistry. Proc.VI lectin meeting. Berlin: 1985; 4:126-380.
11. Казачкова Э. А. Введение лекарст. препаратов в слизистую оболочку матки при хрон. неспециф. эндометритах и сальпингофоритах [дис. к. м. н.]. Члб.: 1984; 1-196.
12. Медведев Б. И., Коваленко В. Л., Мальшева К. Р., Казачкова Э. А. (составители) Диагностика и лечение хрон. неспециф. эндометрита. Метод. реком.: Члб.; 1986.
13. Алимова О. А., Воропаева Е. Е., Казачкова Э. А., Казачков Е. Л. Полуколичественная морфолог. оценка активности воспалительного процесса при хронич. эндометрите. Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы патологоанатомической службы муницип. учреждений здравоохранения». Члб.: 2008; 198-201.
14. Сидельникова В. М. Привычная потеря беременности. М: Триада-Х; 2002.
15. Сидельникова В. М. Проблема ранних потерь беременности VIII Всерос. науч. фор. «Мать и дитя». М: 2006; 239-40.
16. Тетраушвили Н. К. Клинико-патогенет. обоснование использ. различных методов иммунотерапии при привычном выкидыше. Акушерство и гинекол. 2008; 5:7-12.