

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИПОПЛАСТИЧНОГО ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ В АНАМНЕЗЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ИММУНОЦИТОХИМИИ

О.С. Зиновьева, Т.М. Мотовилова, Т.С. Качалина, С.В. Зиновьев,
С.С. Кузнецов, И.А. Круглова, О.В. Уткин,
ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия»

Зиновьева Ольга Сергеевна – e-mail: Zamashkina87@mail.ru

Дата поступления
25.08.2017

Данная статья посвящена малоизученной проблеме «тонкого эндометрия» как основной причине репродуктивных потерь. Внимание автора акцентировано на современных подходах и трудностях диагностики и лечения «тонкого эндометрия», наиболее частой причиной которого является хронический эндометрит. Оценка пролиферативного потенциала и рецепции эндометрия, учитывая тенденцию современной медицины к мало инвазивным методам диагностики, проводилась с помощью использования флуоресцентной иммуноцитохимии (ФИЦХ) с применением тест-системы «Биочип». В данном исследовании проанализирован материал от 29 больных с хроническим эндометритом. Дана сравнительная характеристика пролиферативного потенциала эндометрия в разных группах пациенток методом ФИЦХ с параллельным ИГХ исследованием.

Ключевые слова: «тонкий эндометрий», малоинвазивная диагностика, пролиферативный потенциал эндометрия, флуоресцентная иммуноцитохимия.

This article is devoted to the poorly studied problem of «low endometrium» as the main cause of reproductive loss. The author's attention is focused on modern approaches and difficulties in the diagnosis and treatment of «low endometrium», the most common cause of which is chronic endometritis. Evaluation of the proliferative potential and receptivity of the endometrium, taking into account the trend of modern medicine to the less invasive methods of diagnosis, was carried out using fluorescent immunocytochemistry (FICC) using the «Biochip» test system. In this study, the material from 29 patients with chronic endometritis was analyzed. The proliferative potential of the endometrium in different groups of patients using the FIC method with a parallel IHC study.

Key words: «low endometrium», minimally invasive diagnostics, proliferative potential of endometrium, fluorescent ICX.

Введение

В большинстве случаев «тонкий эндометрий» в репродуктивном возрасте является проявлением гипопластического варианта хронического эндометрита, реже связан с эндокринопатией эндометрия. Тонким является эндометрий не более 7 мм в перивультарную фазу по данным УЗИ малого таза. По данным различных авторов частота заболеваемости хроническим эндометритом доходит до 67%. В структуре женского бесплодия эндометрит занимает лидирующие позиции (до 68%), как и в структуре невынашивания (до 85%), что ассоциировано преимущественно с гипопластическим вариантом [1]. В результате длительного поражения эндометрия инфекционными агентами происходит нарушение его рецептивности и циклической трансформации эндометрия, нарушение кровоснабжения, трофики, регенерации, замещения функциональной ткани на фиброзную, ведущие к его истончению, и формированию неполноценного «окна имплантации» и последующему невынашиванию.

Современная тенденция сводится к поиску новых методов диагностики, максимально информативных и минимально инвазивных, для более глубокого изучения механизмов развития и прогрессирования эндометриопатии при «тонком эндометрии», и повышение эффективности лечения и прогнозирования восстановления репродуктивных функций для повышения шансов к наступлению беременности и дальнейшему ее пролонгированию [2, 3, 4].

«Золотым стандартом» в комплексной оценке состояния эндометрия остается морфологическая диагно-

стика биоптата эндометрия в среднюю фазу пролиферации на 7–10-й день менструального цикла с последующим исследованием его рецепторного аппарата при помощи иммуногистохимического исследования (ИГХ) [5]. Оценка экспрессии рецепторов к стероидным гормонам важна для повышения эффективности диагностики и лечения тонкого эндометрия, в частности перед дифференцированным назначением гормонотерапии, дает возможность динамического контроля и клинического прогнозирования для осуществления репродуктивной функции [6]. Зачастую у пациенток с гипопластическим вариантом течения эндометрита ожидаемый эффект от терапии стероидными гормонами не наблюдается, т. к. в основном экспрессии как эстрогеновых, так и прогестероновых рецепторов снижены и в строме, и в железистом компоненте, что патогенетически объясняет его истончение и неполноценную циклическую перестройку.

Исследование эндометрия чаще всего подразумевает cureтаж полости матки с последующим морфологическим и иммуногистохимическим исследованием. Во время инвазивной манипуляции происходит дополнительная травма гипотрофического эндометрия, что может усилить активность воспаления и ухудшить прогноз [7]. Альтернативой выскабливанию полости матки является пайпель-биопсия – метод, позволяющий получить адекватный материал для исследования, при этом минимально травмирующий эндометрий.

Имеются основания полагать, что рецепторный статус пайпель-биоптата также возможно исследовать с помощью иммуноцитохимии (ИЦХ) [8]. Преимуществами являются: малая инвазивность, небольшой объем достаточного для исследования материала, т. к. материал оценивается цитологически, доступность, всего три этапа подготовки, высокая скорость, а также высокая информативность метода. Согласно данным литературы, совпадение результатов ИГХ и ИЦХ при опухолевых процессах составляет для рецепторов эстрогена 98%, для рецепторов прогестерона – 97%, Ki67 – 100% – биомаркер пролиферации [8]. Одной из разновидностей ИЦХ является прямая флуоресцентная иммуноцитохимия (ФИЦХ), отличающаяся от классической только наличием флуоресцентной метки как системы детекции и позволяющая проводить исследование в течении 60 минут [9]. Однако в доступной литературе мы не встречали данные по изучению возможностей прямой ФИЦХ для оценки пролиферативного потенциала эндометрия.

Цель работы: изучить возможность применения флуоресцентной иммуноцитохимии для оценки пролиферативного потенциала «тонкого эндометрия как малоинвазивного метода диагностики.

Материал и методы

В исследование были включены 29 пациенток с гистологически подтвержденным хроническим эндометритом, группу с «тонким эндометрием» составили 19 человек и 10 человек с нормальной величиной эндометрия соответствующей фазе цикла. В анамнезе у них наблюдались неразвивающиеся беременности (35%), бесплодие (98%) и привычное невынашивание (25%). Средний возраст пациенток составил 34 ± 5 лет. Критерии исключения из исследования: пациентки, не заинтересованные в беременности, в период беременности или лактации, с психическими расстройствами, в менопаузальном возрасте, с неопластическими процессами половых органов, с гепатитами и ВИЧ-инфекцией, получающие гормональную терапию в течении последних четырех месяцев. Все больные были разделены на две группы: пациентки с «тонким эндометрием», пациентки с нормальной толщиной эндометрия и хроническим эндометритом.

Все пациентки прошли стандартное обследование, включающее в себя: УЗИ органов малого таза, микробио-

логическое исследование мазка из цервикального канала, посев из цервикального канала и полости матки, ПЦР фемофлор скрин влагалища и полости матки, а также пайпель-биопсия на 7–10-й день менструального цикла. При отсутствии сопутствующей внутриматочной патологии материал был забран с помощью стерильного урогенитального зонда для пайпель-биопсии «Юнона», без расширения цервикального канала, атравматично. Часть столбца полученного материала отправлялась на гистологическое исследование с ИГХ, часть – для исследования методом ИЦХ в пробирку типа Эппендорф со специальной транспортно-питательной средой 199. Для иммуногистохимического исследования использовались моноклональные антитела производства фирмы «Abcam» (Великобритания). Для ФИЦХ применялись те же антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Cy3, сорбированные на тест-системе для проведения иммуноцитохимического исследования – «биочип», содержащего антитела к рецептору эстрогена, рецептору прогестерона и Ki67. Один «биочип» предназначен на пять исследований каждого антигена (рис. 1).

Результаты реакции оценивали с помощью микроскопа «Axio Imager», фирмы «Carl Zeiss». Методика постановки ФИЦХ выглядела следующим образом.

Первым этапом материал пайпель-биопсии помещался в пробирку типа Эппендорф и центрифугировался на центрифуге CM-6M при 1500 оборотах в течении 5 мин. Осадок оценивается микроскопически для определения точности и принятия решения о возможности постановки ФИЦХ. При достаточном количестве клеток проводилось ФИЦХ на биочипах.

С поверхности «биочипа» удалялась защитная пленка. Далее в пробирке проводили преамбилизацию клеток 0,05% раствором «Тритона» с целью перфорирования мембраны клеток и обеспечения доступа антител к ядрам клеток. Далее дозатором в каждую ячейку биочипа вносили по 20 мкл клеточной взвеси. Затем, не накрывая пленкой, «биочип» помещали в термостат и инкубировали при 37 градусах в течении 30 минут. После высушивания поверхности ячеек «биочип» ополаскивали трис-буфером с целью отмывки не связавшихся антител и проводили исследования каждой ячейки под флуоресцентным микроскопом (рис. 2, 3, 4).

Оценивали количество флуоресцирующих клеток в трех полях зрения. Затем Биочип окрашивали по Май-Грюнвальду-Гимзе и проводили подсчет общего количества клеток в ячейке (рис. 5, 6). Результатом исследования являлся процент прореагировавших клеток к 100 клеткам.

Результаты и их обсуждение

При ИГХ-исследовании пациенток с «тонким эндометрием» экспрессии гормонов неравномерно распределенные по строю и железам при сложении имели средние значения по РЭ $153,2 \pm 12,3$, РП $147,58 \pm 14,85$ в строю и железах, у пациенток с нормопластическим вариантом эндометрита РЭ $159,5 \pm 2,6$, РП $156,8 \pm 17,16$. На наш взгляд, было целесообразно применить сложение экспрессий, т. к. при ИЦХ нельзя определить принадлежность материала к стромальному или железистому компоненту эндометрия.

В результате исследования в группе с «тонким эндометрием» процент экспрессии рецепторов эстрогена,



РИС. 1.
Фото «биочипа» тест-системы.

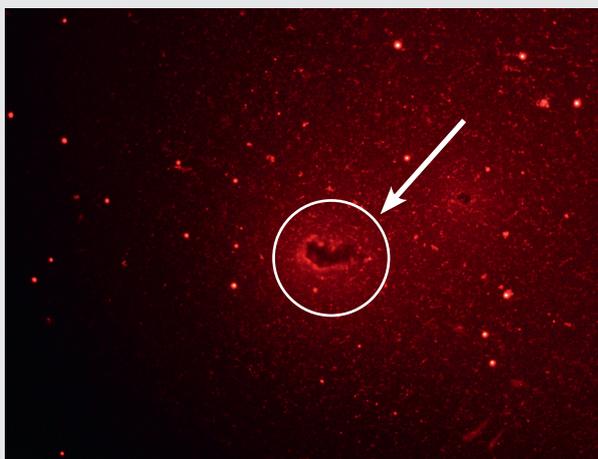


РИС. 2.
Отрицательная реакция рецепторов эстрогена. Увеличение x100.

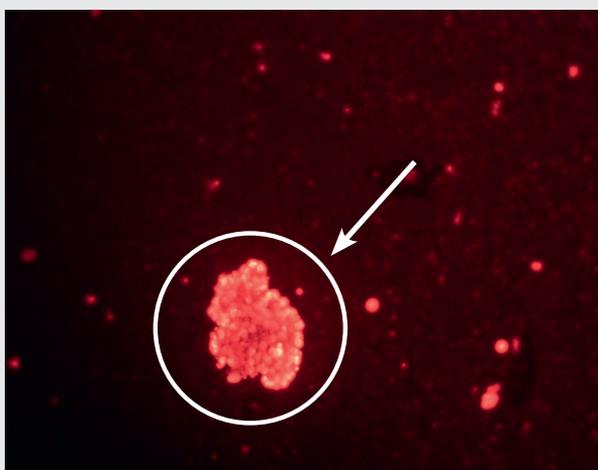


РИС. 3.
Положительная реакция рецепторов эстрогена. Увеличение x200.

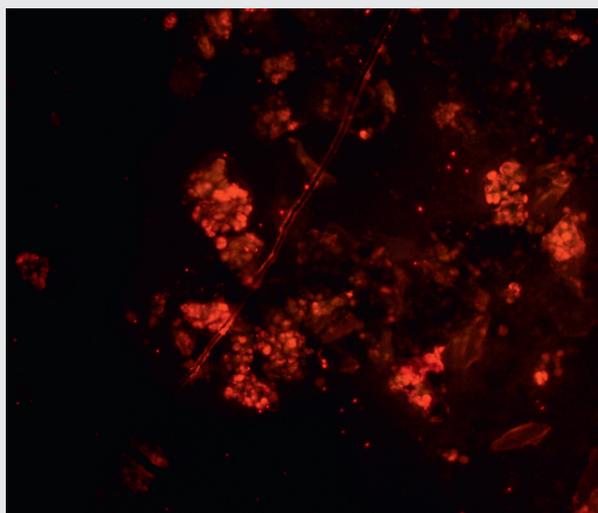


РИС. 4.
Множественные положительные реакции рецепторов прогестерона. Увеличение x100.

ТАБЛИЦА 1.
Сравнительное исследование рецепторного аппарата эндометрия с помощью ИГХ при хроническом эндометрите

Антиген	Тонкий эндометрий		Толщина эндометрия соответствует фазе цикла	
	интервал	среднее	интервал	среднее
Рецептор эстрогена	106-182	153,21±12,3	131-178	159,5±12,6
Рецептор прогестерона	103-169	147,58±14,85	138-187	156,8±17,16

ТАБЛИЦА 2.
Сравнительное исследование пролиферативного потенциала эндометрия с помощью ИЦХ при тонком эндометрии

Антиген	Тонкий эндометрий		Толщина эндометрия соответствует фазе цикла	
	интервал	среднее	интервал	среднее
Рецептор эстрогена	19-42%	32±6,2	26-48%	36,7±8,04
Рецептор прогестерона	20-40%	31,2±5,3	21-55%	37±7,6
Белок Ki67	1-13%	7,7±3,2	4-21%	10,5±4,9

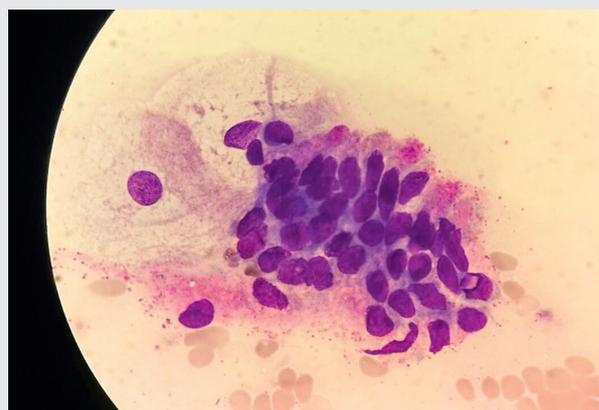


РИС. 5.
Клетки эндометрия. Увеличение x200.

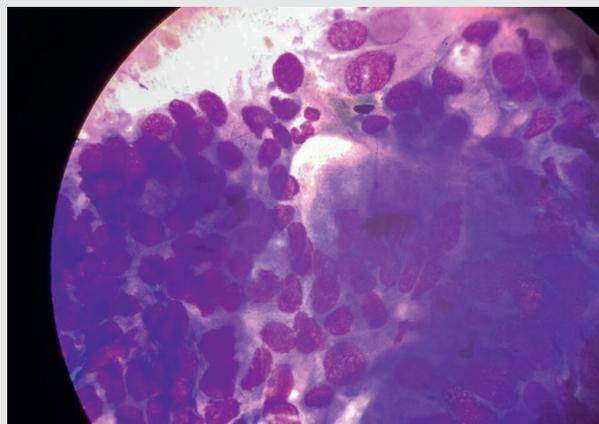


РИС. 6.
Клетки эндометрия. Увеличение x200.

выявленных с помощью иммуноцитохимии, варьировал от 19 до 42%, среднее значение $32 \pm 6,2\%$, а рецепторов прогестерона от 20 до 40%, со средним значением $31,2 \pm 5,3$, что говорит о небольшом превалировании рецепторов эстрогенов соответственно фазе пролиферации, что в свою очередь сопоставимо с данными ИГХ. В группе с толщиной эндометрия, соответствующей фазе цикла 26–48%, при среднем значении $36,7 \pm 8,04$, и 21–55% (среднее $37 \pm 7,6$), было, соответственно, выше, как и при оценке рецепторного аппарата ИГХ, что объясняет адекватную толщину эндометрия, т. к. была более выражена восприимчивость к гормональному воздействию. В группе с тонким эндометрием экспрессия Ki67 варьировалась от 4 до 12% (среднее значение $7,7 \pm 3,2$), с нормальным – от 4 до 21% (среднее значение $10,5 \pm 4,9$). Показатели Ki67 в большинстве превышают норму (не более $3,5 \pm 0,6$) [10], отображая активность процессов пролиферации, связанных с воспалением в эндометрии. Экспрессии Ki67 в группах сравнении не имели существенных различий. Среднее значение экспрессии Ki67 в группе с адекватной толщиной эндометрия незначительно превосходило среднее значение в группе с тонким эндометрием. Отсутствие значимых корреляционных связей между стероидными рецепторами и экспрессией Ki67 при ИЦХ-исследовании пациенток с эндометритом указывает на дисбаланс стероидной рецепции и пролиферативной активности при хроническом эндометрите, соответственно данным литературы [10]. Отсутствие связи между H-core и Ki67 указывает на дисбаланс этих показателей при эндометрите и бесплодии.

Также следует отметить, что 48% пациенток имели первичное, а 52% вторичное бесплодие. При ИГХ общая картина показателей в целом схожа по коэффициенту экспрессии гормонов. Уровень эстрогеновых рецепторов в железах более высокий, в строме более низкий как при первичном, так и при вторичном бесплодии. При этом значительных различий между первичным и вторичным бесплодием в экспрессии гормонов и Ki67 при ИЦХ выявлено не было, что объясняется разнородностью групп пациенток, сформированных лишь на клинической основе.

Для сравнения ИГХ и ИЦХ использовался критерий Фишера ($p=0,05$), гипотеза о равенстве двух дисперсий применима.

Выводы

В результате исследования был выявлен высокий процент совпадений с ИГХ, что наряду с «золотым стандартом» позволяет использовать ИЦХ как дополнительный метод диагностики пролиферативного потенциала эндометрия в случае его неадекватной толщины. Иммуноцитохимическим методом получены новые данные о рецептивности «тонкого эндометрия» малоинвазивным методом, что дополняет данные, полученные традиционным методом. Простота, небольшое количество материала для анализа, малоинвазивность и высокая скорость получения данных открывают новые возможности для диагностики, динамического наблюдения, применения персонализированного подхода к лечению, в том числе и для назначения схем гормональной терапии при подготовке к беременности. Метод имеет большое клиническое значение, но необходимы более широкие исследования перед внедрением его в практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев В.А., Пашков В.М., Клиндухов И.А. Современные принципы терапии больных с хроническим эндометритом. Трудный пациент. 2012. № 5. С. 38-40.

Lebedev V.A., Pashkov V.M., Klindukhov I.A. *Sovremennyye printsipy terapii bol'nykh s khronicheskim endometritom. Trudnyy patsiyent. 2012. № 5. S. 38-40.*

2. Гомболевская Н.А., Марченко Л.А. Современные критерии диагностики хронического эндометрита (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2012. Т. 18. № 1. С. 42-46.

Gombolevskaya N.A., Marchenko L.A. *Sovremennyye metody diagnostiki khronicheskogo endometrita (obzor literatury). Problemy reprodukcii. 2012. T. 18. № 1. S. 42-46.*

3. Волкова Е.Ю. Предгравидарная подготовка женщин с нарушением репродуктивной функции и «тонким» эндометрием: Автореф. дис. ... к. м. н. Москва, 2014. 22 с.

Volkova E.Y. *Pregravidarnaya podgotovka zhenshin s narusheniem reproduktivnoy funktsii i «tonkim» endometriem: Avtoref. dis. ... k. m. n. Moskva, 2014. 22 s.*

4. Петров Ю.А. Хронический эндометрит в репродуктивном возрасте: этиология, патогенез, диагностика, лечение и профилактика: Автореф. дис. ... д. м. н. Москва, 2012. 289 с.

Petrov Y.A. *Hronicheskiy endometrit v reproduktivnom vozraste: etiologiya, patogenez, diagnostika, lechenie i profilaktika: Avtoref. diss. ... d. m. n. Moskva, 2012. 289 s.*

5. Ахметов Х.Б. Морфологические критерии диагностики хронического эндометрита. Вестник КАЗГМУ. 2012. С. 1-4.

Akhmetov X.B. *Morfologicheskiye kriterii diagnostiki khronicheskogo endometrita. Vestnik KAZGMU. 2012. S. 1-4.*

6. Дубницкая Л.В., Назаренко Т.А. Хронический эндометрит: современные подходы к терапии. Медицинский альманах. 2010. № 2 (11). С. 182-184.

Dubnickay L.V., Nazarenko T.A. *Hronicheskiy endometrit: sovremennyye podhody k terapii. Medicinskiy almonah. 2010. № 2 (11). S. 182-184.*

7. Шуршалина А.В. Хронический эндометрит: современные взгляды на проблему. Женское здоровье. 2011. Т. 13. № 6. С. 36-39.

Shurshalina A.V. *Hronicheskiy endometrit: sovremennyye vzglyady na problemu. Zhenskoye zdorov'ye. 2011. T. 13. № 6. S. 36-39.*

8. Савостикова М.В. Иммуноцитохимическое исследование в диагностике и оценке важнейших факторов прогноза злокачественных и доброкачественных образований: Автореф. дис. ... к. м. н. Москва, 2007. С. 119-135.

Savostikova M.V. *Immunotsitokhimicheskoye issledovaniye v diagnostike i otsenke vazhneyshikh faktorov prognoza zlokachestvennykh i dobrokachestvennykh obrazovaniy: Avtoref. dis. ... k. m. n. Moskva, 2007. S. 119-135.*

9. Kumar G.L., Lurdbek L. Иммуногистохимические методы: руководство / пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. С. 97-105.

Kumar G.L., Lurdbek L. *Immunogistokhimicheskiye metody: rukovodstvo / per. s angl. pod red. G.A. Franka, P.G. Mal'kova. S. 97-105.*

10. Бессмертная В.С., Серебренникова К.Г., Самойлов М.В., Бабиченко И.И., Мусаева М.Г. Экспрессия эндометриальных рецепторов к эстрогенам и прогестерону у женщин с первичным и вторичным бесплодием // Мат-лы XIV Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». Москва, 2007. С. 534.

Bessmertnaya V.S., Serebrennikova K.G., Samoylov M.V., Babichenko I.I., Musayeva M.G. *Ekspressiya endometrial'nykh retseptorov k estrogenam i progesteronu u zhenshin s pervichnym i vtorichnym besplodiyem // Mat-ly XIV Ros. nats. kongr. «Chelovek i lekarstvo». Moskva, 2007. S. 534.*