

ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИИ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С НЕУДАЧАМИ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© В.Н. Абрамова, С.Н. Гайдуков, А.Н. Тайц

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

Для цитирования: Педиатр. – 2017. – Т. 8. – № 1. – С. 82–88. doi: 10.17816/PED8182-88

Поступила в редакцию: 21.12.2016

Принята к печати: 03.02.2017

Проблема бесплодия является одной из наиболее острых в современной репродуктологии. Тема исследования недостаточно проработана в современной медицинской литературе, что дополнительно обуславливает ее актуальность и научную значимость. Благодаря применению вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) стало возможным наступление беременности в бесплодном браке. В статье авторы уделяют большое внимание роли эндометрия в процессе имплантации. Для повышения эффективности оценки состояния эндометрия применяются следующие исследования: гистероскопия, биопсия эндометрия, морфологическое исследование биопсийного материала, иммуногистохимия. В статье описаны особенности каждого из вышеупомянутых методов исследования, их преимущества и недостатки. При анализе результатов иммуногистохимического исследования выявлено наличие как аутоиммунного хронического эндометрита, так и хронического эндометрита без аутоиммунного компонента. По итогам проведенного комплексного обследования и лечения приведена статистическая информация, демонстрирующая наступление беременности в 90 % случаев у женщин с неудачными попытками ВРТ в анамнезе. При этом в 60 % случаев беременность завершилась родами в срок 36–40 недель. Течение такой беременности имеет ряд специфических особенностей: повышенные риски невынашивания, пороки развития плода, экстрагенитальную патологию. Таким образом, репродуктология крайне заинтересована в поиске новых методик, способствующих положительному результату ВРТ у женщин с бесплодием.

Ключевые слова: иммуногистохимическое исследование; вспомогательные репродуктивные технологии; гиперплазия эндометрия; полип эндометрия; маточный фактор; бесплодие.

THE IMPORTANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATIONS FOR PATIENTS WITH FAILED IVF-METHODS

© V.N. Abramova, S.N. Gajdukov, A.N. Tajc

St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russia

For citation: *Pediatrician (St Petersburg)*, 2017;8(1):82-88

Received: 21.12.2016

Accepted: 03.02.2017

The problem of infertility is one of the most acute in modern reproductive science. The theme of research is poorly conceptualized in modern medical literature and this fact is an additional confirmation of relevance and scientific significance of this theme of research. Due to the use of assisted reproductive technology (art), it became possible the occurrence of pregnancy in infertile marriage. In the article the authors pay significant attention to the role of the endometrium in the implantation process. To better assess the status of the endometrium they apply following studies: hysteroscopy, endometrial biopsy, morphological study of biopsy material, immunohistochemistry. In this article there are features of every method of research and treatment, competitive advantages or disadvantages of them. Having analyzed the results of the immunohistochemical studies, the presence of autoimmune chronic endometritis and chronic endometritis without an autoimmune component was revealed. The result of a comprehensive examination and treatment is an demonstration of statistic information, which shows pregnancy in ninety percent of cases in women with failed IVF attempts in anamnesis. At the same time in sixty percent of cases the pregnancy resulted in the childbirth in terms of 36-40 weeks. During such pregnancies there are only a few specific features: high risks of miscarriage, defects of fetus, extragenital pathology. So, reproductology is very interested in search of new methods, which are able to improve positive results of IVF-methods.

Keywords: immunohistochemistry; assisted reproductive technology; endometrial hyperplasia; endometrial polyp; uterine factor; sterility.

Бесплодие — это серьезная проблема репродуктологии, при которой имеется сочетание социального, психического неблагополучия и практически всегда нездоровья в семье (ВОЗ, 1979). Вопросы бесплодия продолжают сохранять свою актуальность и статус наиболее приоритетных направлений в акушерстве и гинекологии в связи со стабильно высокой частотой в мировой популяции и значительной распространенностью [1, 2]. В настоящее время в России более 6 млн супружеских пар репродуктивного возраста, из них 3 млн нуждаются в лечении с применением вспомогательных репродуктивных технологий [6]. Количество женщин с бесплодием растет. Так, в 2007 г. на 100 тыс. женщин фертильного возраста приходилось 485,1 бесплодных, то в 2011 г. этот показатель уже составил 559,6 [7].

Успешная имплантация требует наличия рецептивного эндометрия и нормального взаимодействия между ним и зародышем [12]. Роль эндометрия в процессе имплантации часто недооценивается. В настоящее время было доказано вовлечение в хронический воспалительный процесс не только функционального, но и неотторгающегося базального слоя эндометрия [4]. Известно, что хронический эндометрит формируется в условиях иммунодефицита на фоне перенесенных ранее инфекций, передающихся половым путем, в связи с их длительной персистенцией, а также при наличии хронической соматической патологии [8]. Крайне важна при данной патологии роль и функциональная активность иммунной системы, особенно факторов местного иммунитета: провоспалительных и регуляторных цитокинов, факторов роста, молекул адгезии, матриксных металлопротеиназ, регуляторов апоптоза. При этом иммунологические изменения в эндометрии являются в ряде случаев самостоятельной причиной бесплодия и невынашивания беременности.

Хронический эндометрит сопровождается множественными морфофункциональными изменениями в виде нарушения клеточной пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и фиброза. При этом происходит резкая активация клеточных и гуморальных факторов воспаления на локальном уровне. Следует отметить, что в патогенезе хронического эндометрита имеет место несостоятельность иммунных механизмов регуляции, проявляющаяся аутоиммунным характером иммунного ответа, повышенным содержанием в эндометрии CD16, NK- и В-клеток [10]. Длительная стимуляция иммунокомпетентных клеток эндометрия инфекционным возбудителем приводит к декомпенсации регуляторных механизмов локального гомеостаза, что поддерживает персистенцию инфекционного процесса.

Так называемый «маточный фактор» бесплодия встречается более чем у половины женщин репродуктивного возраста. Максимальная распространенность хронического эндометрита (96,7 %) приходится на возрастной интервал 26–35 лет, наиболее важный в реализации репродуктивной функции [10].

Целью работы являлась оценка эффективности дополнительных методов исследования, в том числе УЗИ малого таза, гистероскопии, биопсии эндометрия, морфологического исследования биопсийного материала, иммуногистохимии у женщин с бесплодием и неудачами в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе гинекологического отделения Перинатального центра СПбГПМУ за 2014–2015 гг. проводилось обследование и лечение 50 женщин в возрасте от 26 до 43 лет с диагнозом «бесплодие», имевших неудачные попытки ЭКО в анамнезе. В исследовании участвовали 20 пациенток, поступивших в стационар с целью подготовки их к повторной попытке ЭКО после неудач ВРТ.

У десяти пациенток в анамнезе отмечались воспалительные заболевания органов малого таза бактериального и вирусного характера, перенесенные внутриматочные вмешательства. Проведено лечение антибиотиками и противовирусными препаратами, к протоколу ВРТ поступили с отрицательными ПЦР-исследованиями бактериальных и вирусных инфекций, однако беременность не наступила.

Всем женщинам планировалось ЭКО в ближайшее время, поэтому необходимость верификации маточного фактора бесплодия стала столь актуальной. Исследуемые пациентки были разделены на две группы. В первую группу вошли женщины с патологией эндометрия по УЗИ малого таза с неудачами ВРТ; во вторую — женщины без видимой патологии по УЗИ малого таза с неудачами ВРТ. Пациенткам проведено ультразвуковое исследование с последующей гистероскопией, биопсией эндометрия, гистоанализом соскоба полости матки, иммуногистохимическим исследованием. Гистероскопия в сочетании с биопсией эндометрия, морфологическим исследованием эндометрия и ИГХ проводилась на 23-й день менструального цикла. Сочетание вышеназванных методов позволило установить правильный диагноз и назначить лечение в случае патологии эндометрия.

Ультразвуковая диагностика органов малого таза проводилась с помощью высокотехнологичного оборудования: аппарата Philips эксперт-класса, оснащенного датчиками для всех видов исследо-

вания, включая 3/4D. Аппарат УЗД имеет функции доплеровского исследования и эластографии. Для операции гистероскопии использовался гистерорезектоскоп фирмы Wolf. Иммуногистохимические реакции (ИГХ) проводили в парафиновых срезах пероксидазно-антипероксидазным методом с демаскировкой антигенов в СВЧ-печи. Использовали мышинные моноклональные антитела к эстрогеновым рецепторам (ER) и прогестероновым рецепторам (PR).

С помощью ИГХ-метода в эндометриальной ткани определяли показатели местного иммунитета: количество лимфоцитов экспрессирующих маркеры естественных киллерных клеток CD56⁺, CD16⁺ и маркеры активации HLA-DR(II)⁺ [5]. Параметры местного иммунитета (CD56⁺, CD16⁺ и HLA-DR(II)⁺) оценивали количественным способом, просматривая в световом микроскопе соскоб эндометрия при увеличении $\times 400$ в трех полях зрения [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При обследовании было установлено, что 8 пациенток страдали первичным бесплодием и 12 — вторичным. Число попыток ЭКО в группе обследуемых женщин составляло от 1 до 4. Поступившие пациентки имели отягощенный гинекологический анамнез (табл. 1).

Среди сопутствующих заболеваний встречались сахарный диабет 2-го типа, ожирение, аутоиммунный тиреоидит, фиброаденома молочных желез.

По результатам ультразвуковой диагностики пациентки были разбиты на группы по наличию/отсутствию патологии эндометрия. При этом установлено, что у 13 женщин из 20 (65 %) обнаружены полипы и гиперплазия эндометрия. При ультразвуковом исследовании определялись изменения в эндо- и миометрии, свойственные воспалительным процессам. Так, были обнаружены мелкие гиперэхогенные включения в проекции базального

слоя, которые сохранялись вне зависимости от фазы менструального цикла; в миометрии наблюдались диффузно-очаговые и кистозные изменения в субэндометриальной зоне, расширенные вены миометрия; нечеткая линия смыкания листков слизистой. При цветовой доплерографии часто определялась относительно скудная васкуляризация функционального слоя в секреторную фазу менструального цикла, нарушение гемодинамики в сосудах матки и в сосудистом бассейне малого таза; несимметричность васкуляризации миометрия (в 49 % случаев); снижение конечной диастолической скорости в маточных артериях; повышение углозависимых индексов кривых скоростей кровотока на всех уровнях сосудистого дерева матки, что совпадает с данными литературы [13].

Всем пациенткам из обследуемой группы были проведены дополнительные методы исследования: диагностическая гистероскопия, биопсия эндометрия, морфологическое исследование соскоба полости матки, иммуногистохимическое исследование.

При гистероскопии наблюдались неравномерная толщина эндометрия, полиповидные разрастания, точечные кровоизлияния, очаговая гипертрофия слизистой оболочки, синехии в полости матки. Следует отметить, что при подозрении на хронический эндометрит гистероскопия крайне важна для исключения всего спектра внутриматочной патологии. При этом для верификации диагноза во всех случаях проводилась биопсия эндометрия с морфологическим исследованием.

Морфологическим исследованием определялось наличие в базальном и функциональном слоях эндометрия очаговых или диффузных перигландулярных и периваскулярных лимфогистиоцитарных воспалительных инфильтратов; наличие в инфильтратах плазматических клеток; очаговое фиброзирование стромы и склеротические изменения стенок спиральных артерий эндометрия, что совпадает с данными литературы [3].

Таблица 1

Структура гинекологических заболеваний обследованных женщин

Гинекологическая патология	Количество случаев
Аномалия развития матки (двурогая, седловидная, неполная внутриматочная перегородка)	1
Опухоли яичников	2
Эндометрионидная болезнь	2
Миома матки	1
Хронический сальпингит. Оофорит	10
Носительство вируса папилломы человека. Патология шейки матки	3
Хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, цитомегаловирусная инфекция	12
Полип эндометрия	3

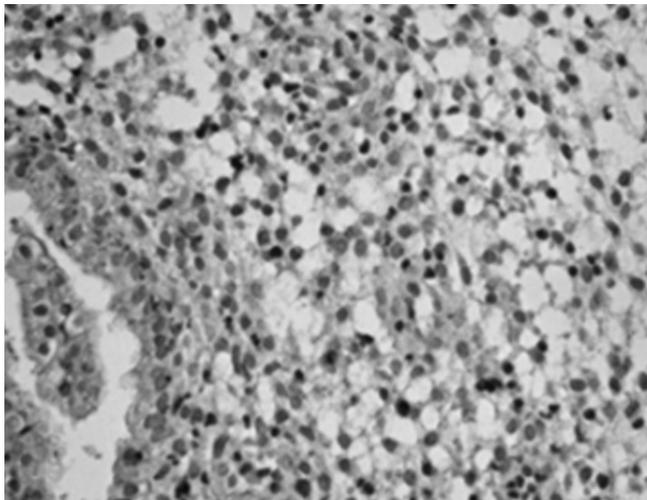


Рис. 1. ER-рецепторы

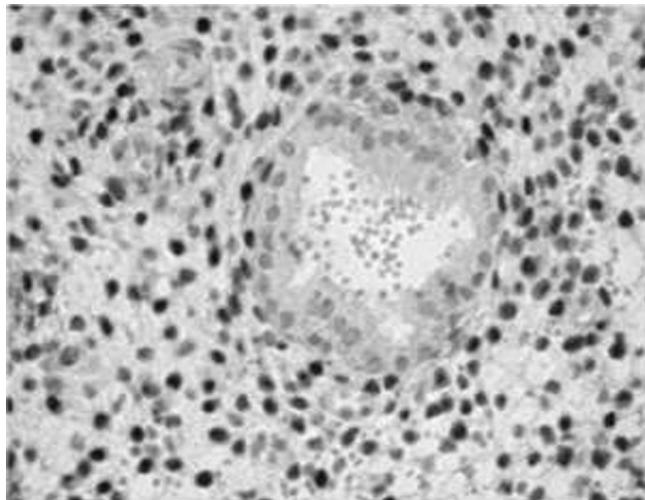


Рис. 2. PR-рецепторы

Установлено, что патология эндометрия в виде полипов и гиперплазии эндометрия отмечена у 15 пациенток (75 %). Так, железистые, железисто-фиброзные полипы обнаружены у 8 женщин, а железистая гиперплазия эндометрия — у 7. Как видно из представленных данных, УЗИ как метод диагностики в данном аспекте не обладает высокой информативностью, однако является инструментом скрининга для выявления патологии. В то же время применение дополнительных методов исследования позволяет поставить окончательный диагноз «хронический эндометрит».

Завершающим этапом исследования стала иммуногистохимия (ИГХ). Обоснованием предлагаемого способа диагностики является факт того, что воспаление нередко развивается только локально, вызывая нарушение функции органа, и всегда сопровождается изменениями параметров системного и локального иммунитета.

При анализе результатов иммуногистохимического исследования выявлено наличие как аутоиммунного хронического эндометрита, так и хронического эндометрита без аутоиммунного компонента. При исследовании рецепторного статуса эндометрия у женщин с бесплодием обнаружено, что хронический эндометрит сопровождается снижением экспрессии эстрогеновых рецепторов в железах как в фазе пролиферации, так и в фазе секреции, в строме — преимущественно в фазе секреции (рис. 1). Экспрессия прогестероновых рецепторов в железах и строме эндометрия снижается в фазе секреции (рис. 2).

Результаты применения иммуногистохимического исследования представлены в табл. 2.

Проанализируем результаты ИГХ-исследования на примере пациентки 29 лет, поступившей с диагнозом «первичное бесплодие». У женщины морфологически подтвержден железисто-фиброзный полип эндометрия, ранее выявленный по УЗИ.

Таблица 2

Результаты иммуногистохимического исследования

Данные иммуногистохимического исследования	Количество случаев
Экспрессия эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в эндометрии не соответствует фазам менструального цикла	8
Экспрессия эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в эндометрии соответствует фазам менструального цикла	12
Аутоиммунный хронический эндометрит:	11
первичных;	2
без активности	9
Хронический эндометрит без аутоиммунного компонента:	8
с обострением;	3
без обострения	5
Отсутствие эндометрита	1

Согласно иммуногистохимическому заключению экспрессия эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в эндометрии соответствует фазе менструального цикла (рис. 3). Выявляются признаки хронического воспаления (хронический эндометрит) со слабым аутоиммунным компонентом (рис. 4–10).

После постановки окончательного диагноза «хронический эндометрит» 19 женщинам проведено лечение соответственно результатам обследования. Пациенткам с гиперплазией эндометрия осуществлялось лечение гестагенами (линдинет-30, жанин, ярина) в течение трех менструальных циклов с последующим ультразвуковым мониторингом. Женщинам с полипом эндометрия специального гормонального лечения не проводилось.

Лечение состояло из двух этапов. На первом — проводилась антимикробная терапия в виде комбинаций фторхинолонов и нитроимидазолов, макролидов и нитроимидазолов, противовирусная терапия препаратами валтрекс таблетированно и виферон вагинально по схеме. Для повышения эффективности противоинфекционной терапии использовались иммуномодуляторы — галавит и иммуномакс. Также назначалась лонгидаза. На втором — проводилась метаболическая и системная энзимотерапия препаратами актовегин, вобэнзим.

Итогом комплексного обследования и лечения стало наступление беременности у 18 пациенток (90 %). Следует отметить, что в 12 случаях беременность завершилась родами в срок 36–40 недель беременности, из них в 2 случаях были двойни. Все дети родились в удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале Апгар более 7 баллов. В 4 случаях имели место преждевременные роды в срок 23–29 недель беременности (22,2 %). В одном случае имела место постнатальная гибель плода. Несостоявшийся выкидыш отмечен в 2 случаях (11,1 %) в срок 7/8 недель беременности, потребовавший выскабливания полости матки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов позволяет нам сделать вывод, что применение комплексного исследования и лечения у женщин с бесплодием и внутриматочной патологией является необходимым условием на этапе подготовки к последующим протоколам ВРТ. Обязательным пунктом в обследовании женщин с патологией эндометрия является ИГХ как достоверный и доступный метод оценки состояния эндометрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Башмакова Н.В., Мелкозерова О.А., Винокурова Е.А., Пепеляева Н.А. Состояние здоровья новорожден-

ных, рожденных от матерей с угрозой прерывания беременности // Проблемы репродуктологии. – 2004. – Т. 6. – № 2. – С. 28–29. [Bashmakova NV, Melkozerova OA, Vinokurova EA, Pepeljaeva NA. The State of health of the infants born to mothers with threatened abortion. *Problemy reproduktologii*. 2004;6(2):28-29. (In Russ.)]

2. Гайдуков С.Н., Резник В.А., Антоненко В.С. Характеристика соматизированных расстройств пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия в позднем репродуктивном возрасте // Педиатр. – 2011. – Т. 2. – № 4. – С. 82–84. [Gaydukov SN, Reznik VA, Antonenko VS. Kharakteristika somatizirovannykh rasstroystv patsientok s giperplasticheskimi protsessami endometriya v pozdnem reproduktivnom vozraste. *Pediatr*. 2011;2(4):82-84. (In Russ.)]
3. Добротворцева О.А. Морфологические исследования эндометрия при различных формах бесплодия // Акушерство и гинекология. – 1987. – Т. 11. – № 12. – С. 25–29. [Dobrotvorceva OA. Morphological study of the endometrium with different forms of infertility. *Akusherstvo i ginekologija*. 1987;11(12):25-29. (In Russ.)]
4. Ковалева Ю.В. Этиология хронического эндометрита. Хронический эндометрит. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – С. 73. [Kovaljova JuV. Etiology of chronic endometritis. *Chronic endometritis*. Saint Petersburg: Izd-vo Politehn. un-ta; 2010. P. 73. (In Russ.)]
5. Колмык В.А., Насыров Р.А., Кутушева Г.Ф. Преимущества иммуногистохимического метода в диагностике хронического эндометрита // Педиатр. – 2015. – Т. 6. – № 1. – С. 11–15. [Kolmyk VA, Nasyrov RA, Kutusheva GF. Advantages of immunohistochemistry in the diagnosis of chronic endometritis. *Pediatr*. 2015;6(1):11-15. (In Russ.)]
6. Корнеева И.Е. Современная концепция диагностики и лечения бесплодия в браке: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2003. [Korneeva IE. The modern concept of diagnosis and treatment of infertility. [dissertation] Moscow; 2003. (In Russ.)]
7. Корнеева И.Е. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. [Korneeva IE. Barren marriage. Modern approaches to diagnostics and treatment. Moscow: GleOTAR-Media; 2010. (In Russ.)]
8. Лаура Н.Б., Воронова О.В., Ковалева А.В., Хаджиева М.Х. Роль эндометрия в невынашивании беременности. Материалы IV Съезда акушеров-гинекологов России. – М., 2008. – С. 142. [Laura NB, Voronova OV, Kovaljova AV, Hadzhieva MH. The role of the endometrium in miscarriage. (Conference proceedings) *Materialy IV S'ezda akusherov-ginekologov Rossii*. Moscow; 2008. P. 142. (In Russ.)]

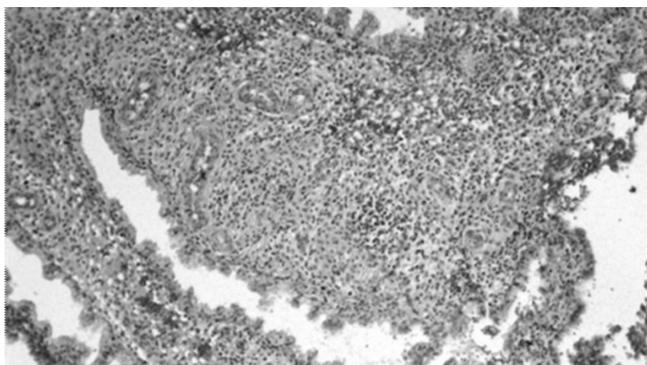


Рис. 3. Соскоб эндометрия поздней фазы секреции при увеличении объектива $\times 100$

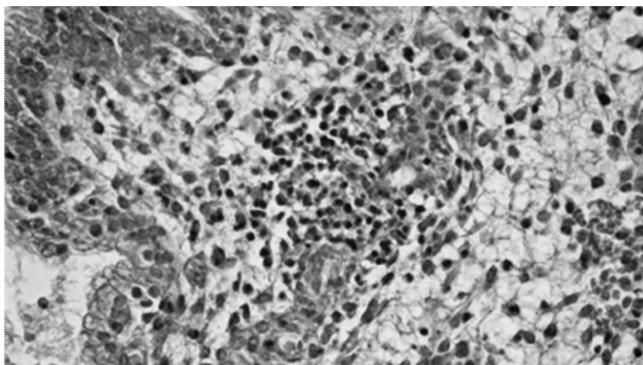


Рис. 4. Очаговая лимфоцитарная и нейтрофильная инфильтрация стромы эндометрия при увеличении объектива $\times 400$

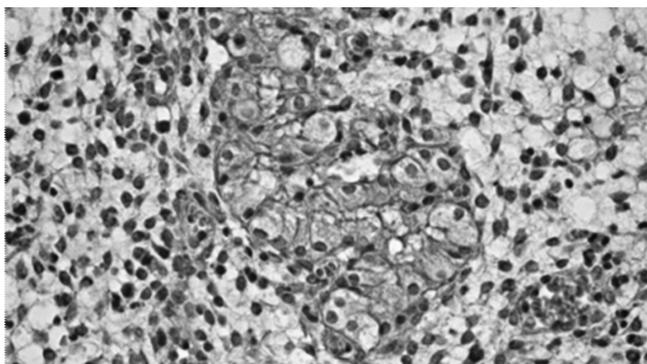


Рис. 5. Вакуольная дистрофия эпителия желез и стромы эндометрия при увеличении объектива $\times 1000$

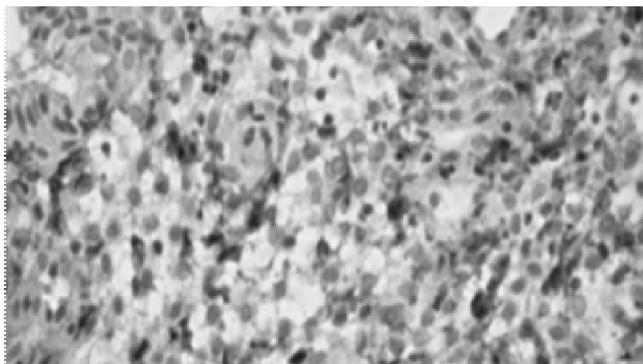


Рис. 6. Экспрессия CD16-рецепторов

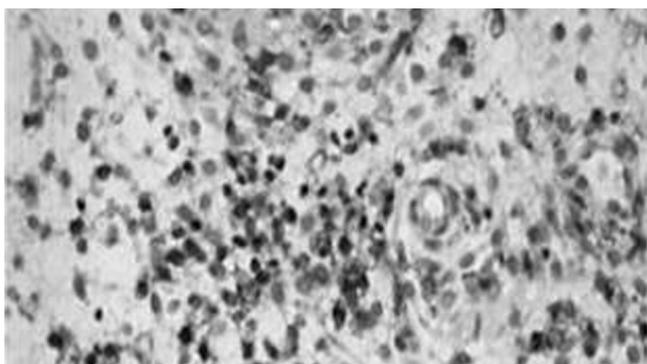


Рис. 7. Экспрессия CD56-рецепторов

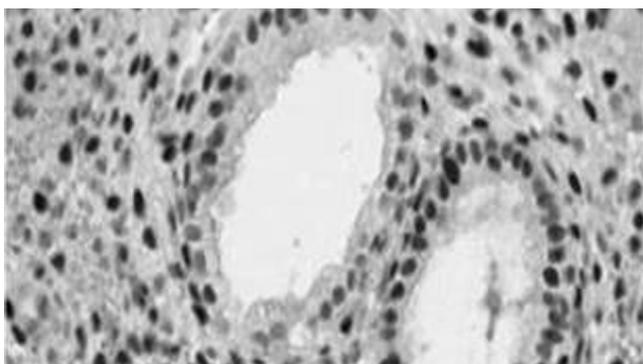


Рис. 8. HLA-DR(II)-рецепторы

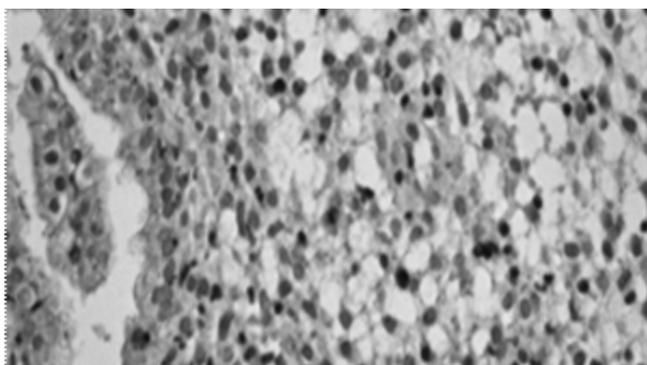


Рис. 9. ER-рецепторы

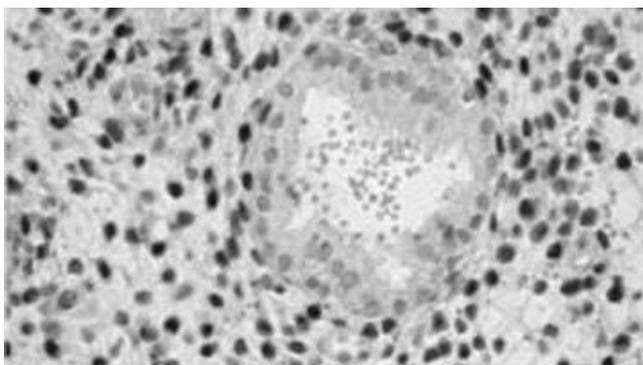


Рис. 10. PR-рецепторы

9. Лунева И.С., Хуцишвили О.С., Иванова Т.С. Хронический эндометрит и привычное невынашивание беременности. Материалы XI Всероссийского научного форума «Мать и дитя». – М., 2010. – С. 128. [Luneva IS, Hucishvili OS, Ivanova TS. Chronic endometritis and habitual miscarriage pregnancy. (Conference proceedings) Materialy XI Vserossijskogo nauchnogo foruma "Mat' i ditja". Moscow; 2010. P. 128. (In Russ.)]
10. Михнина Е.А., Давыдова Н.И., Комаров Е.К., Орлова О.О. Предгравидарная подготовка эндометрия у женщин с неспецифическим хроническим эндометритом и нарушением репродуктивной функции. Всероссийский конгресс «Амбулаторно-поликлиническая практика – новые горизонты»: сборник тезисов. – М., 2010. – С. 227–228. [Mihlina EA, Davydova NI, Komarov EK, Orlova OO. Predgravidarnaja preparation of the endometrium in women with nonspecific chronic jendometritom and violation of the reproductive function. (Conference proceedings) Vserossijskij kongress "Ambulatorno-poliklinicheseskaja praktika – novye gorizonty". Moscow; 2010. P. 227-228. (In Russ.)]
11. Озерская И.А. Эхография в гинекологии. – М.: Медика, 2005. – С. 179–184. [Ozerskaja IA. Ultrasound in Gynecology. Moscow: Medika; 2005. P. 179-184. (In Russ.)]
12. Побединский Н.М., Балтуцкая О.И., Омеляненко А.И. Стероидные рецепторы нормального эндометрия // Акушерство и гинекология. – 2000. – Т. 12. – № 3. – С. 56. [Pobedinskij NM, Baltuckaja OI, Omel'janenko AI. Steroid receptors of normal endometrium. *Akusherstvo i ginekologija*. 2000;3(12):56. (In Russ.)]

◆ Информация об авторах

Виктория Николаевна Абрамова – врач акушер-гинеколог, гинекологическое отделение Перинатального центра. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: grantabramov@mail.ru.

Сергей Николаевич Гайдуков – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой, кафедра акушерства и гинекологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: gaiducovsn@rambler.ru.

Анна Николаевна Тайц – канд. мед. наук, ассистент, кафедра акушерства и гинекологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: annataits1@rambler.ru.

◆ Information about the authors

Viktorija N. Abramova – gynecologist, Gynecology Department. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: grantabramov@mail.ru.

Sergej N. Gajdukov – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: gaiducovsn@rambler.ru.

Anna N. Tajc – MD, PhD, Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: annataits1@rambler.ru.