

Иммуногистохимические особенности коллаген и фибронектин – синтезирующей функции эндометрия при разных схемах поддержки лютеиновой фазы

*А. С. Луцкий, И. В. Сорокина

Kharkov National medical university, Ukraine

*Corresponding author. E-mail: lutskey.li10@gmail.com

Paper received 31.01.19; Accepted for publication 06.02.19.

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2019-193VII23-16>

Аннотация. Обследованы 50 женщин основной и 10 контрольной группы, которые участвовали в программе донорства ооцитов. Пациенткам основной группы были проведены схемы поддержки лютеиновой фазы различными прогестероновыми препаратами. Определяли иммуногистохимические маркеры наличия дефекта рецептивности эндометрия: коллагены III, IV типов и фибронектин. Определение коллаген и фибронектин- синтезирующей функции эндометрия способствует выбору оптимальной схемы поддержки лютеиновой фазы, что позволяет создать оптимальные условия для имплантации blastocysts в период «окна имплантации».

Ключевые слова: иммуногистохимические маркеры, прогестероновые препараты, имплантации blastocysts.

Эндометрий в естественном цикле претерпевает ряд морфологических и молекулярно-клеточных изменений. Весь процесс строго регулируется овариальными половыми стероидами – эстрадиолом и прогестероном. Одним из важнейших этапов нормального функционирования эндометрия является обширное ремоделирование тканей в ответ на повышение уровня прогестерона. Этот процесс включает секреторную трансформацию железистого эпителия с последующей децидуализацией стромальных клеток, которые в ответ экспрессируют так называемые маркеры децидуализации — пролактин, факторы роста, коллагены [1].

Децидуальные стромальные клетки активно участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса матки путем экспрессии разнообразных внеклеточных матриксных белков, таких как коллаген IV, фибронектин, ламинин и др. [2].

Любые отклонения в эндометрии способны повлечь за собой нарушения репродуктивной функции. Именно поэтому, по мнению многих исследователей, оценка состояния полости матки и эндометрия является необходимым этапом подготовки к программам вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [3].

В естественном менструальном цикле после овуляции формируется желтое тело, которое поддерживает гормональный фон женщины для наступления беременности. При экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) преовуляторные фолликулы аспирируют с целью получения ооцитов. Аспирируются также клетки гранулезы, которые должны формировать желтое тело. Мультифолликулярный рост при контролируемой стимуляции в циклах ЭКО приводит к высоким концентрациям прогестерона и эстрадиола, что приводит к снижению лютеинизирующего гормона (ЛГ). Дробящиеся эмбрионы попадают в полость матки и от того, какие там будут условия, зависит наступление беременности [4].

При ЭКО лютеиновая фаза требует поддержки, которая обеспечивается препаратами прогестеронового ряда. В настоящее время нет общепринятого стандарта в отношении дозирования и формы введения прогестерона. Стероидные гормоны и их ядерные рецеп-

торы играют ключевую роль в поддержании лютеиновой фазы и восстановления нормальной структуры, функции и рецептивности эндометрия [5]. В связи с этим, дальнейшие исследования в этом направлении являются актуальными.

Цель исследования. Установление иммуногистохимических особенностей коллаген и фибронектин - синтезирующей функции эндометрия при различных схемах поддержки лютеиновой фазы.

Материал и методы исследования. Для проведения сравнительной оценки эффективности препаратов, которые применялись для подготовки эндометрия к имплантации, нами обследованы 50 женщин, составившие основную группу наблюдения, которые участвовали в программе донорства ооцитов. В контрольную группу вошли 10 доноров находящиеся в естественном менструальном цикле, которым поддержка лютеиновой фазы не проводилась.

Всем пациенткам основной группы перед получением ооцитов проводилась стимуляция суперовуляции. В день аспирации фолликулов начиналась поддержка лютеиновой фазы. Исследование эндометрия у женщин основной группы проводилось на 5 сутки, у доноров контрольной группы - на 5 сутки после овуляции.

Пациентки основной группы были разделены на 5 групп (по 10 человек в каждой). Средний возраст обследованных женщин составил $30,2 \pm 0,5$ года, возраст менархе - $12,6 \pm 0,4$ года. По характеру становления менструальной функции значимых различий между группами не отмечалось. Менструальная функция в виде регулярных менструальных циклов продолжительностью от 21 до 35 дней отмечалась у 98,6 % женщин со средней периодичностью менструального цикла $28,3 \pm 0,21$ дня. Лишь у 1,4 % наблюдаемых пациенток 3,5 % были циклы по типу опсоменореи продолжительностью от 36 до 42 дней (в среднем $38,5 \pm 0,34$ дня, $p > 0,05$). Длительность менструальных кровотечений не превышала 7 дней у всех наблюдаемых женщин.

По структуре гинекологической и экстрагенитальной патологии существенных различий в группах выявлено не было.

В связи с тем, что иммуногистохимическими мар-

керами наличия дефекта рецептивности эндометрия являются увеличение содержания интерстициального коллагена III и коллагена базальных мембран IV типа, мы решили исследовать содержание коллагенов III, IV типов, а также фибронектина у наблюдаемых женщин.

У всех пациенток основной группы после получения ооцитов применялись различные медицинские препараты прогестеронового ряда, которые используются в репродуктологии для поддержки лютеиновой фазы.

В 1-ю группу вошли женщины, которые получали Дидрогестерон по 10 мг 3 раза в день перорально, во 2-й группе использовался высокоочищенный прогестерон для подкожного применения, который вводился по 25 мг (1 мл) 1 раз в сутки и 90 мг внутривлагалищного прогестерона в виде геля, в 3-й группе - микронизированный прогестерон в капсулах по 200 мг 3 раза в сутки *per os*, в 4-й группе - использовали внутривагинальный гель, содержащий 90 мг прогестерона, ежедневно 2 раза в сутки, в пятой группе женщины получали 1 мл 2,5% прогестерона дважды в день внутримышечно (в/м).

На 5 сутки от начала прогестероновой поддержки при помощи аспирационной пайпель-биопсии у всех пациенток получали эндометрий для иммуногистохимического исследования и определения содержания в нем коллагена III и IV типов, а также фибронектина. У доноров контрольной группы эндометрий исследовали по тем же параметрам на 5 сутки после овуляции.

От каждого донора было получено информированное добровольное письменное согласие на использование биоматериала в научных целях.

Имуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах, толщиной 5-6 мкм непрямым методом Кунса по методике Brosman (1979). Коллагены III и IV типов, а также фибронектин типировали моноклональными антителами (МКА) к коллагенам III, IV типов и к фибронектину (Novocastra Laboratories Ltd.). В качестве люминесцентной метки использовали F(ab) - 2 (фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных ФИТЦ). Препараты изучали в люминесцентном микроскопе "Axioskop 40". Оптическую плотность иммунофлюоресценции коллагенов и фибронектина определяли по методу Губиной-Вакулик Г.И. и соавт., 2009 с помощью микроскопа "Axioskop 40" и программного обеспечения Biostat.exe.

Цифровые данные обработаны методами вариационной статистики. Статистический анализ проведен с помощью стандартного пакета программ Statgraphics.

Результаты и их обсуждение. При исследовании препаратов эндометрия, обработанных МКА к коллагену III типа во всех наблюдениях вне зависимости от групповой принадлежности, выявлялось специфическое свечение коллагена III типа в стромальном компоненте эндометрия. Несмотря на то, что локализация этого интерстициального коллагена не отличалась в зависимости от группы исследования, интенсивность флюоресценции стромы, где локализовался коллаген III типа в эндометрии женщин, получавших различные препараты, значительно варьировала (Табл. 1).

Как следует из таблицы 1, максимальная оптическая плотность коллагена III типа наблюдалась в строме эндометрия у женщин 1 группы, получавших Дидрогестерон по 10 мг 3 раза в день перорально ($0,134 \pm 0,008$ усл. ед.о.пл.). При этом микроскопически выявлялось в стромальном компоненте эндометрия специфическое свечение неравномерной интенсивности линейного и очагового характера. Участки яркого свечения чередовались с зонами умеренного и даже слабого свечения (Рис. 1). Оптическая плотность свечения коллагена III типа, после проведения поддержки лютеиновой фазы прогестероновыми препаратами, повышалась у всех пациенток основной группы наблюдения, по сравнению с контролем ($0,101 \pm 0,006$), однако, оказалась минимальной в эндометрии женщин 2 группы женщин ($0,104 \pm 0,006$, $p > 0,05$), получавших высокоочищенный прогестерон для подкожного применения, который вводился по 25 мг (1 мл) 1 раз в сутки и 90 мг внутривлагалищного прогестерона в виде геля.

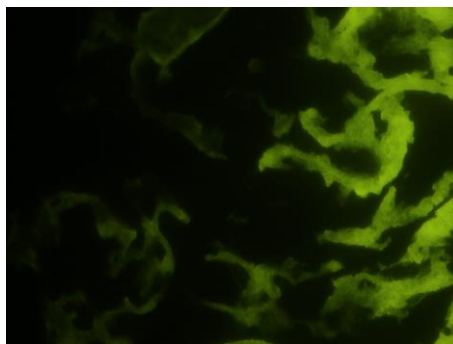


Рис. 1. Специфическое свечение неравномерной интенсивности коллагена III типа в стромальном компоненте эндометрия. Наблюдение 1-й группы. Непрямой метод Кунса с МКА к коллагену III типа $\times 650$.

В стромальном компоненте эндометрия интенсивность иммунофлюоресценции коллагена III типа женщин 2-й группы, в люминесцентном микроскопе выявлялось преимущественно слабой интенсивности очагового характера свечения (Рис.2).

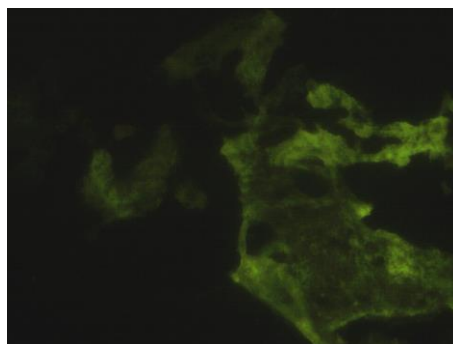


Рис. 2. Слабое специфическое свечение коллагена III типа в стромальном компоненте эндометрия. Наблюдение 2-й группы. Непрямой метод Кунса с МКА к коллагену III типа $\times 650$.

Анализируя оптическую плотность свечения коллагена III типа в 1-й, 3-й, 4-й и 5-й группах мы обратили внимание на то, что этот показатель оказался у них достоверно выше, по сравнению с 2-й и контрольной группами ($P < 0,05$). При этом микроскопически выявлялось во всех вышеуказанных группах

свечение линейного или очагового характера неравномерной интенсивности, когда участки слабого свечения чередовались с умеренным (Рис.3).

При исследовании микропрепаратов эндометрия, обработанных МКА к фибронектину выявлялась неоднородная картина, зависящая от групповой принадлежности изучаемого материала. Специфическое свечение фибронектина в эндометрии всех изученных групп чаще всего было очаговым, реже имело линейный прерывистый характер, а его интенсивность была неравномерной - от слабой до яркой (Рис. 4, 5). Количественные показатели оптической плотности иммунофлюоресценции фибронектина представлены в табл. 1.

Максимальный показатель оптической плотности оказался в эндометрии женщин 1 группы ($0,129 \pm 0,008$), а минимальный – в эндометрии женщин контрольной ($0,104 \pm 0,007$) и 2-й группы ($0,100 \pm 0,009$). В остальных группах наблюдения, где женщины получали Дидрогестерон по 10 мг 3 раза в день перорально (1 группа), микронизированный прогестерон в капсулах по 200 мг 3 раза в сутки per os (3 группа), внутривагинальный гель, содержащий 90 мг прогестерона ежедневно 2 раза в сутки в (4 группа) и 1 мл 2,5% прогестерона дважды день в/м (5 группа) оптическая плотность иммунофлюоресценции фибронектина также оказалась достоверно повышенной, по сравнению с контрольной группой ($P < 0,05$).

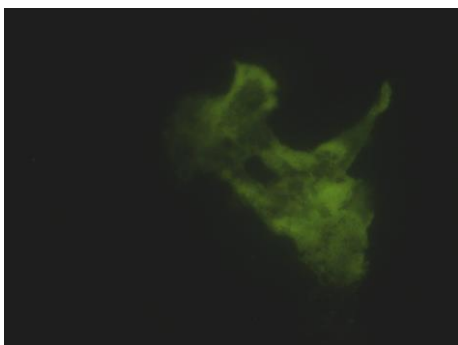


Рис. 3. Слабое и умеренной интенсивности специфическое свечение коллагена III типа в стромальном компоненте эндометрия. Наблюдение 4-й группы. Непрямой метод Кунса с МКА к коллагену III типа x 650

При исследовании микропрепаратов эндометрия, женщин, относящихся к разным группам исследования, обработанных МКА к коллагену IY типа выявлялась более однородная картина.

Коллаген IY типа во всех исследованных наблюдениях эндометрия локализовался в базальных мембранах сосудов (Рис. 6) и эпителии желез и выявлялся в виде линейного свечения неравномерной интенсивности, преимущественно яркой и умеренной (Рис.7).

При этом во всех наблюдениях отсутствовали зоны, характеризующиеся слабым свечением. О чем свидетельствуют достаточно высокие, по сравнению с таковыми для коллагена III типа, показатели оптической плотности иммунофлюоресценции коллагена IY типа (Табл. 1).

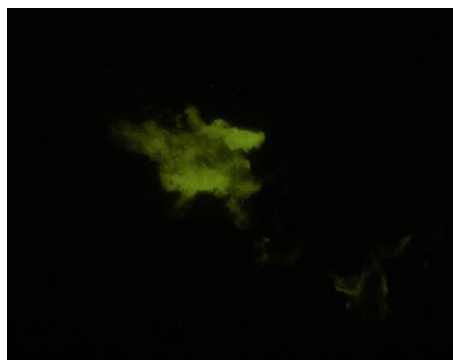


Рис. 4. Очаговое слабой и умеренной интенсивности свечение фибронектина в эндометрии наблюдения 5-й группы. Непрямой метод Кунса с МКА к фибронектину, x 650.

Однако, при анализе показателей оптической плотности свечения коллагена IY типа в зависимости от групповой принадлежности, мы обнаружили достоверные различия. Так, максимальным оказался этот показатель в наблюдениях 1-й группы ($0,192 \pm 0,007$, $P < 0,05$), минимальным – в наблюдениях 2-й группы ($0,168 \pm 0,004$, $P > 0,05$). Та же закономерность характерна и для интерстициального коллагена III типа. В остальных группах показатели оптической плотности коллагена IY типа так же были выше такового в контрольной группе. При этом оптическая плотность свечения коллагена IY типа в между показателями 3-й, 4-й и 5-й групп была практически одинаковой и достоверно была повышенной по сравнению с контролем ($P < 0,05$).

Известно, что в эндометрии женщин с бесплодием, в частности обусловленным хроническим эндометритом, выявляется повышение содержания коллагена III типа в 2 раза, а коллагена IY типа на 7,2% по сравнению с нормой [6]. В течение пролиферативной фазы менструального цикла коллаген III типа, наряду с другими интерстициальными коллагенами, (например, V и V1), а также фибронектин являются основными компонентами интерстициальной ткани эндометрия. Однако, по мере приближения «окна имплантации» коллагеновые волокна рассасываются, при этом межклеточное вещество становится менее вязким, что способствует успешной имплантации.

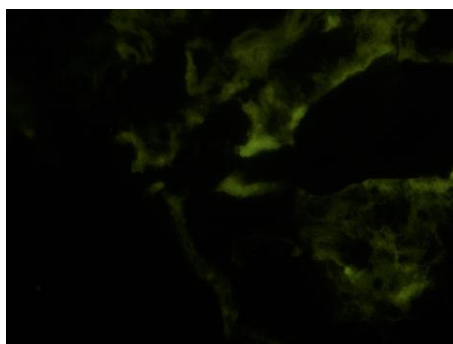


Рис. 5. Линейное свечение слабой и неоднородной интенсивности фибронектина в эндометрии наблюдения 2 группы. Непрямой метод Кунса с МКА к фибронектину, x 400

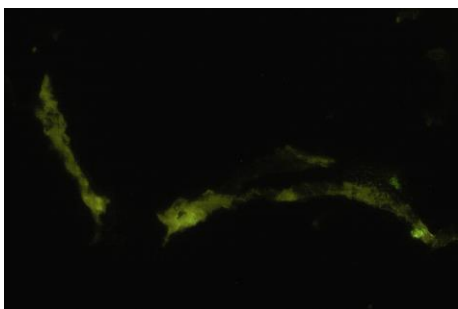


Рис. 6. Яркое специфическое свечение коллагена 1У типа в базальных сосудистых мембранах эндометрия. Наблюдение 2-й группы. Непрямой метод Кунса с МКА к коллагену 1У типа x 650

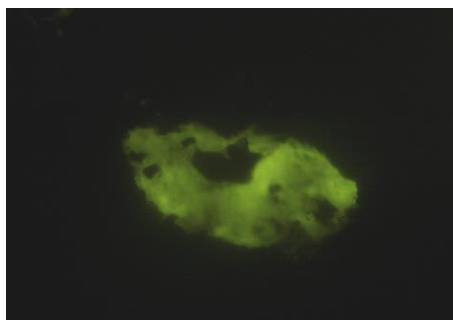


Рис. 7. Специфическое свечение коллагена 1У типа в железистой базальной мембране эндометрия. Наблюдение 4-й группы. Непрямой метод Кунса с МКА к коллагену 1У типа x 1000

Таблица 1. Показатели иммунофлюоресценции фибронектина, коллагена III и коллагена 1У типов в эндометрии в зависимости от группы наблюдения (усл. ед. оптической плотности)

Группы	Фибронектин	Коллаген III типа	Коллаген 1У типа
Контрольная	0,104±0,007	0,101±0,06	0,160±0,004
1 группа	0,129±0,008*	0,134±0,008*	0,192±0,007*
2 группа	0,100±0,009	0,104±0,006	0,168±0,004
3 группа	0,115±0,007*	0,111±0,004*	0,172±0,006*
4 группа	0,118±0,004*	0,114±0,008*	0,181±0,005*
5 группа	0,121±0,009*	0,117±0,008*	0,174±0,009*

*P < 0,05 по сравнению с контрольной группой

Анализируя полученные результаты нашего исследования можно отметить следующее: при использовании высокоочищенного прогестерона для подкожного введения и 90 мг прогестерона в виде геля для влагалищного исследования (2 группа), содержание коллагена III типа в строме эндометрия уменьшается максимально, по сравнению с другими группами наблюдения. Это может свидетельствовать о том, что данный вид гормональной поддержки благоприятно воздействует на процесс подготовки эндометрия к имплантации, а именно способствует рассасыванию коллагена III типа. Коллаген 1У типа уже давно является общепризнанным коллагеном базальных мембран, благодаря которому сосудистые и эпителиальные базальные мембраны характеризуются нерастворимостью и стабильностью, что очень важно для поддержания васкуляризации на определенном уровне с одной стороны, и трофики эпителия с другой. Эти процессы могут нарушаться как при дефиците, так и при избыточном накоплении коллагена 1У типа в составе базальных мембран [7].

Коллаген 1У типа не является интерстициальным коллагеном и для него не характерно рассасывание по мере приближения эндометрия к периоду готовности к имплантации. В наших наблюдениях содержание коллагена 1У типа в базальных мембранах сосудов и эпителия оказалось более высоким, чем коллагена III типа в строме эндометрия во всех группах наблюдения. При этом минимальным содержанием коллагена 1У типа отличался эндометрий женщин 2-й группы, значения оптической плотности которого практически не отличались от параметров контрольной группы наблюдения (P > 0,05).

Учитывая тот факт, что в остальных группах - 1-й, 3-й, 4-й и 5-й содержание коллагена 1У типа в сосудистых и эпителиальных базальных мембранах выше, чем в контрольной и 2-й группах, так же, как и колла-

гена III типа, действие препаратов в виде высокоочищенного прогестерона для подкожного применения, который вводился по 25 мг (1 мл) 1 раз в сутки и 90 мг внутривлагалищного прогестерона в виде геля, следует признать более благоприятными, по сравнению с другими схемами поддержки лютеиновой фазы прогестероновыми препаратами. Снижение содержания коллагена 1У типа в базальных сосудистых мембранах способствует этому процессу.

Из доступной литературы известно, что в нормальной эндометрии экспрессия фибронектина минимальна и равномерно выражена в фазе пролиферации. То же самое авторы отмечают при простой и сложной гиперплазии, тогда как при атипической гиперплазии экспрессия фибронектина была местами умеренной, а при гиперплазии на фоне хронического эндометрита - повышенной особенно в зонах склероза [8].

Анализируя содержание фибронектина в интерстициальном компоненте изученного нами эндометрия отметим следующее. В контрольной и 2-й группах наблюдения оптическая плотность свечения фибронектина оказалась минимальной, по сравнению с остальными группами (0,104±0,007 и 0,100±0,009 соответственно). Как известно, фибронектин относится к адгезивным белкам межклеточного матрикса, связывается с рецепторами клеток, а также с коллагенами, что позволяет называть его «молекулярным клеем». Нарушение адгезивных свойств межклеточного матрикса чревато развитием различной патологии. Очевидно, что для эндометрия контрольной и 2-й групп характерно снижение адгезивных свойств стромального компонента. В 1-й, 3-й, 4-й и 5-й группах показатели оптической плотности свечения коллагена III типа и фибронектина оказались максимальным и достоверно отличались от показателей контрольной и 2-й групп. Это свидетельствует о недоста-

точно эффективных проведенных схемах поддержки лютеиновой фазы у пациенток данных групп, что по-видимому, связано с достаточно высокими адгезивными свойствами стромального компонента эндометрия у этих женщин. Известно, что физиологическая имплантация обеспечивается в том числе и адгезивными свойствами фибронектина, а именно $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ — рецепторами [9].

Выводы. Иммуногистохимические исследования свидетельствуют о том, что оптимальной схемой подготовки эндометрия было сочетание высокоочищенного прогестерона для подкожного введения в дозе 25

мг и 90 мг прогестерона в виде геля (2 группа). Это подтверждается иммуногистохимическими признаками рассасывания коллагена III типа в строме эндометрия (достоверное снижение оптической плотности его свечения ($P \leq 0,05$), высокой степенью экспрессии фибронектина и достоверно невысоким содержанием коллагена IV типа в сосудистых базальных мембранах, которые практически не отличались от показателей контрольной группы. Данная схема поддержки лютеиновой фазы будет способствовать оптимальным условиям для имплантации blastocysty в период «окна имплантации».

ЛИТЕРАТУРА

1. Sansilvestri–Morel, P. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins / P. Sansilvestri–Morel, A. Rupin, P. Kern // J Vasc Res. – 2001. – V. 38. P. 560 – 568.
2. Puchtler, H. Light microscopic distinction between elastin, pseudoelastic (type III collagen) and interstitial collagen / H. Puchtler, S. Meloan, G. Pollard // Histochemistry. – 1976. – V. 49. P. 1 – 14.
3. Mohammadi Sh. Maternal Nicotine Induces Collagen Type IV Changes in the Mice Lung Parenchyma and its Vessels // Tanaffos. – 2011. – Vol. 10. – № 2. P. 32-37.
4. Nikravesh M.R. Pattern of collagen IV expression in glomerular and mesangial basement membrane during fetal and postnatal period of BALB/c mice // Journal of Cell and Molecular Research. – 2009. – Vol. 1. – № 2. P. 90-95.
5. Achache H., Revel A. Endometrial receptivity markers the journey to successful embryo implantation // Hum. Reprod. Update., 2006. - Vol. 12, № 6. P. 731-746.
6. Perin P.M., Maluf M., Czeresnia C.E., Sousa P.D. The effect of recombinant human luteinizing hormone on oocyte/embryo quality and treatment outcome in down-regulated women undergoing in vitro fertilization // Fertil. Steril. - 2003. - Vol. 80 (Suppl. 3), P. 76-77.
7. Jie Yu, Sarah L. Berga, Erika B. Johnston-MacAnanny, Neil Sidell, Indrani C. Bagchi, Milan K. Bagchi, and Robert N. Taylor. Endometrial Stromal Decidualization Responds Reversibly to Hormone Stimulation and Withdrawal // Endocrinology. 2016 Jun; 157(6), P. 2432–2446.
8. Ottani V., Raspanti M., Ruggeri A. Collagen structure and functional implications // Micron. – 2001. – № 32 – P. 251 - 260.
9. Silva R., D'Amico G., Hodivala-Dilk e K.M., Reynolds L.E. Integrins: the keys to unlocking angiogenesis // Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2008; 28 (10). P. 1703–1713.

Immunohistochemical features of collagen and fibronectin - the synthesizing endometry function at different schemes to support lute phase

A. S. Lutsky, I. V. Sorokina

Abstract. Fifty women of the main and 10 control groups who participated in the oocyte donation program were examined. Patients of the main group were given regimens for supporting the luteal phase with various progesterone preparations. Immunohistochemical markers for the presence of a defect in endometrial receptivity were determined: type III and type IV collagens and fibronectin. The definition of collagen and fibronectin-synthesizing function of the endometrium contributes to the choice of the optimal scheme for supporting the luteal phase, which allows creating optimal conditions for the implantation of the blastocyst during the "implantation window".

Keywords: immunohistochemical markers, progesterone preparations, blastocyst implantation.