

Алгоритм морфологического исследования биопсии эндометрия у женщин, вступающих в программу вспомогательных репродуктивных технологий

А. А. Сыантович – врач-патологоанатом иммуногистохимической лаборатории УЗ «ГКПБ»

Е. А. Анфиногенова – доцент кафедры патологической анатомии УО «БГМУ», к.м.н.

Т. А. Летковская – заведующий кафедрой патологической анатомии УО «БГМУ», доцент, к.м.н.

Дефиниции

Бесплодие определяется как неспособность пары добиться беременности в течение одного года регулярной половой жизни без контрацепции (ВОЗ).

Первичное бесплодие – неспособность женщины родить ребенка из-за ее неспособности либо забеременеть, либо доносить и родить живого ребенка".

Вторичное бесплодие – неспособность женщины родить ребенка из-за ее неспособности либо забеременеть, либо доносить и родить живого ребенка" уже после того, как у нее либо была предыдущая беременность, либо она смогла ранее доносить и родить живого ребенка.

Рецептивность эндометрия – это комплекс структурно-функциональных характеристик эндометрия, определяющих способность эндометрия к имплантации.

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – медицинские технологии, включающие методы лечения и процедуры, направленные на достижение беременности пациенткой.

Актуальность

Бесплодие является медицинской проблемой и имеет большую социально-демографическую значимость в системе здравоохранения развитых стран мира. По состоянию на 2015 год эксперты ВОЗ оценили бесплодной каждую десятую супружескую пару в экономически развитых странах.

Критическим значением распространенности бесплодия, по данным ВОЗ, является показатель 15%. По данным отдела медицинской помощи матерям и детям Министерства здравоохранения удельный вес бесплодных пар в Республике Беларусь достигает 16%.

В настоящее время принято считать, что причина имплантационных потерь в 30% случаев связана с эмбрионом и в 70% – с нарушениями имплантационных возможностей эндометрия (его рецептивностью).

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) в большинстве случаев помогают реализовать репродуктивную функцию субфертильным парам. Частота наступления беременности в расчете на один цикл составляет около 30-40% и не имеет тенденции к увеличению.

Актуальность проблемы определяется тем, что в настоящее время недостаточно четко определены основные критерии диагностики патологических состояний эндометрия у женщин, вступающих в программу ВРТ. Использование разработанного в ходе исследования алгоритма морфологического исследования эндометрия позволит диагностировать различные формы нарушения рецептивности, что будет способствовать персонализированному подходу к каждой женщине и повысит эффективность применения вспомогательных репродуктивных технологий.

Цель исследования

Оценить морфологические особенности эндометрия у женщин, вступающих в программу вспомогательных репродуктивных технологий, с применением иммуногистохимического метода исследования и электронной микроскопии. Разработать алгоритм морфологического исследования эндометрия в программе **вспомогательных репродуктивных технологий**.

Материал исследования

Исследование проведено на основе проспективного анализа биопсий эндометрия, полученных при раздельном диагностическом выскабливании и пайпель-биопсии от 10 женщин с клинически установленным диагнозом «бесплодие». Сырой материал, фиксированный в 10% формалине, поступал на исследование на кафедру патологической анатомии «БГМУ» в период с 01.01.2020 г. по 31.12.2020 г.

Методы исследования

- Световая микроскопия с применением иммуногистохимического метода
- Электронная микроскопия

Первичные антитела, клон, форма выпуска и разведение	Производитель, страна происхождения	Демаскировка антигенов	Инкубация первичных антител	Система визуализации комплекса антиген-антитело, протокол
Моноклональные мышинные антитела к человеческим CD3, клон F7.2.38, готовый к использованию раствор	Dako Denmark A/S, ДАНИЯ.	Высокотемпературная демаскировка в TRS pH 9 (3-in-1) 20 минут при 97-98°C	30 мин	EnVision FLEX+, Mouse, High pH, Согласно инструкции производителя
Моноклональные мышинные антитела к человеческим CD20, клон L26, готовый к использованию раствор	Dako Denmark A/S, ДАНИЯ.	Высокотемпературная демаскировка в TRS pH 9 (3-in-1) 20 минут при 97-98°C	30 мин	EnVision FLEX+, Mouse, High pH, Согласно инструкции производителя
Моноклональные мышинные антитела к человеческим альфа-рецепторам эстрогена, клон 1D5, готовый к использованию раствор	Dako Denmark A/S, ДАНИЯ.	Высокотемпературная демаскировка в TRS pH 9 (3-in-1) 20 минут при 97-98°C	30 мин	EnVision FLEX+, Mouse, High pH, Согласно инструкции производителя
Моноклональные мышинные антитела к человеческим рецепторам прогестерона, клон PgR 636, готовый к использованию раствор	Dako Denmark A/S, ДАНИЯ.	Высокотемпературная демаскировка в TRS pH 9 (3-in-1) 20 минут при 97-98°C	30 мин	EnVision FLEX+, Mouse, High pH, Согласно инструкции производителя

Методы исследования

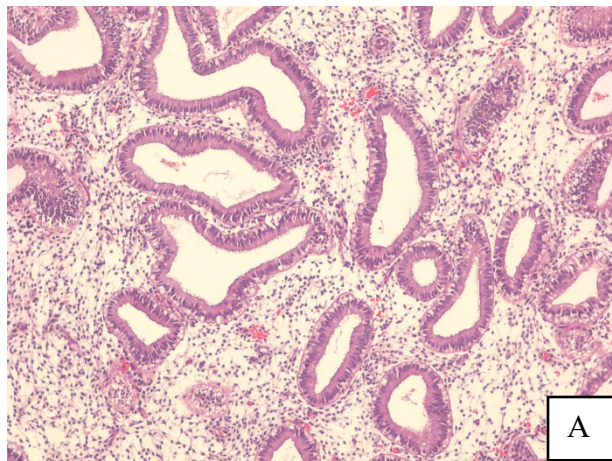
Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета статистической программы Statistica10.0. Для проверки наличия либо отсутствия нормального распределения признаков использовали тест Колмогорова-Смирнова и критерий Шапиро-Уилка. Данные описательной статистики указывали в виде медианы (Me) и квартилей (процентиль 25% – q1, процентиль 75% – q3). Для сравнения двух выборок применяли двусторонний тест Манна-Уитни (p_{mu}). При сравнении нескольких групп переменных использовали H-критерий Краскела-Уоллиса (p_{kw}). Взаимосвязь между показателями определяли при помощи непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r, p_s). Нулевую гипотезу о равенстве выборок отвергали при p < 0,05.

Результаты исследования

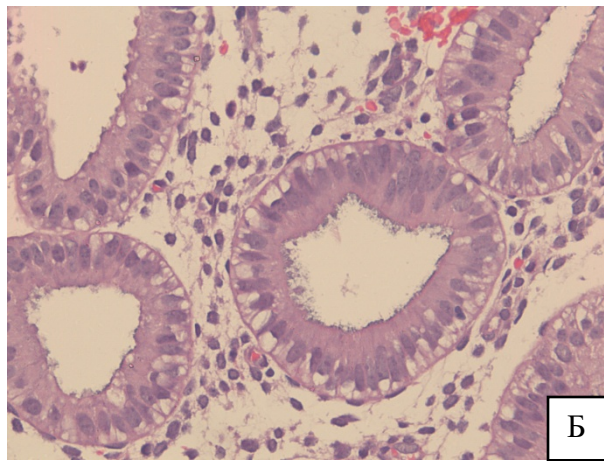
Возраст пациенток с бесплодием на момент забора материала для патологогистологического исследования варьировал от 31 до 38 лет, средний возраст составил $33,73 \pm 3,4$ лет. Средняя продолжительность бесплодия составила $3,86 \pm 1,7$ года. Первичное бесплодие имели 7 женщин из 10 (70%), 8 женщин из 10 (80%) имели неоднократные неудачные попытки ЭКО (от 1 до 4 неуспешных программ, в среднем $1,82 \pm 1,4$).

При микроскопическом исследовании эндометрия фаза пролиферации была установлена в 90% случаев, фаза секреции – в 10% случаев (рисунок 1). У трех пациенток (30%) определялось нарушение отторжения эндометрия с признаками обратного развития: наличие гиализированных клубков спиральных артерий в поверхностном слое эндометрия, соответствующего средней фазе пролиферации (рисунок 1 Д). У 2 пациенток (20%) определялись минимальные признаки хронического неспецифического эндометрита на стандартных окрасках, такие как: наличие плазматических клеток в строме, лимфоидных инфильтратов вблизи кровеносных сосудов и/или желез с формированием лимфоидных фолликулов, неравномерно выраженный фиброз стромы, склеротические изменения стенок спиральных артерий (рисунок 2 А, Б). У одной пациентки (10%) отмечалось снижение экспрессии EsR и PrR.

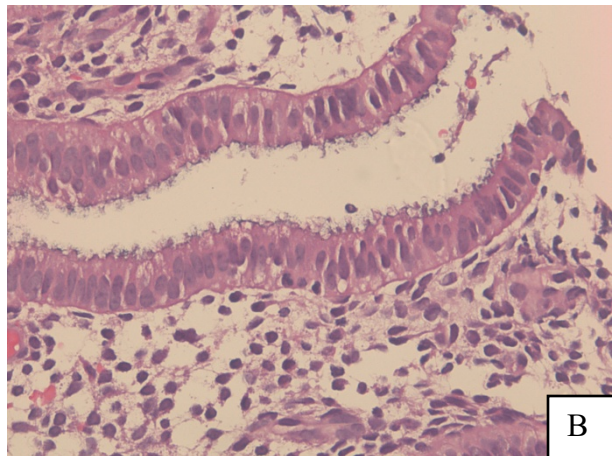
При иммуногистохимическом окрашивании с антителами к CD20 (В-лимфоциты) и CD3 (Т-лимфоциты) позитивные клетки выявлены в поверхностном, функциональном и базальном слоях эндометрия (рисунок 2 А, Б, В, Г). Позитивность экспрессии CD20 от 3% до 32% ($14,7 \pm 12,3\%$), CD3 от 9% до 46% ($24 \pm 16,9\%$). Исследование рецепторов эстрогенов и прогестерона позволило установить равномерное их распределение в эпителии желез и стромальных клетках с разной степенью выраженности экспрессии (рисунок 2 Д,Е). Общая железистая и стромальная позитивность экспрессии EsR составила от 15% до 66% ($40,5 \pm 21,2\%$), PrR – от 29% до 62% ($45,5 \pm 14,2\%$). Частота хронического эндометрита отмечалась в 20% случаев.



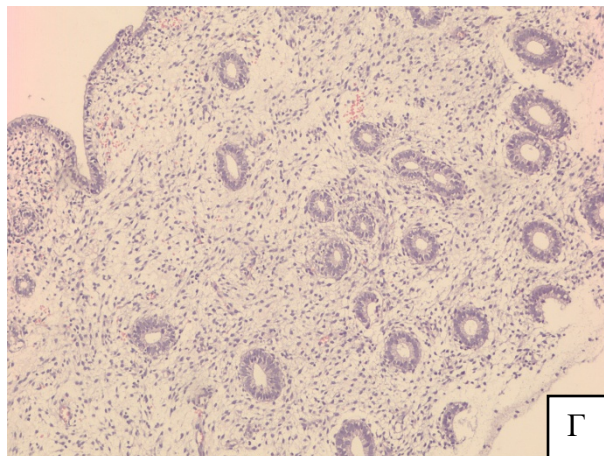
А



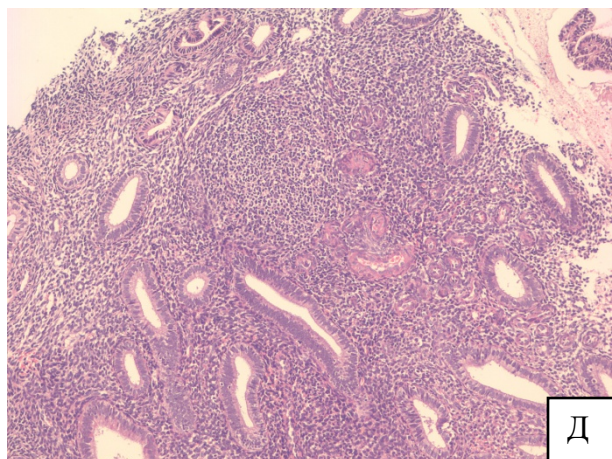
Б



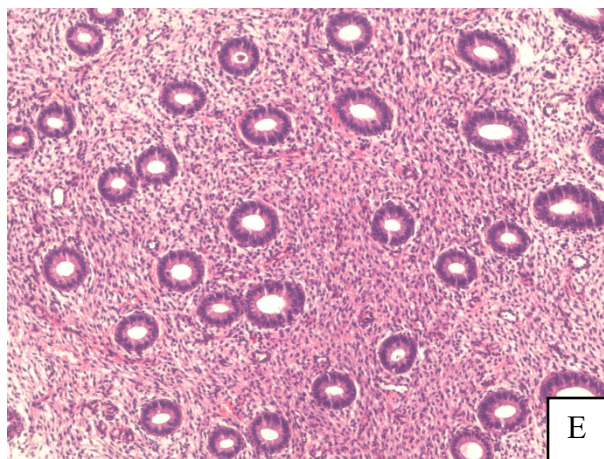
В



Г



Д



Е

Рисунок 1 –
Микроскопические
особенности эндометрия:
А, Б, В – эндометрий фазы
поздней секреции с наличием
субнуклеарных вакуолей и
пиноподий.
Г, Д, Е – эндометрий фазы
средней пролиферации.

Окраска Г&Э.

А – увеличение x200;

Б, В, – увеличение x400;

Г, Д, Е – увеличение x100.

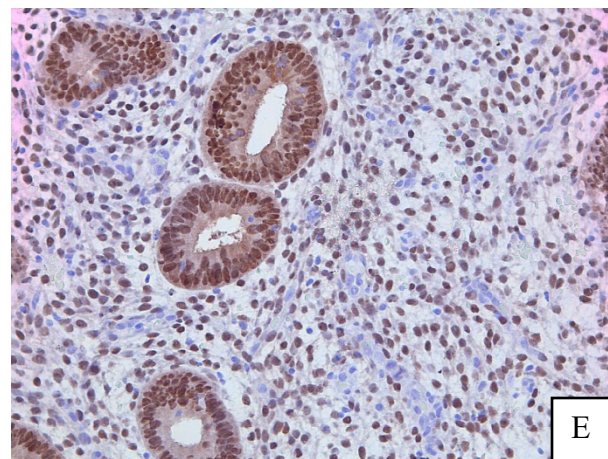
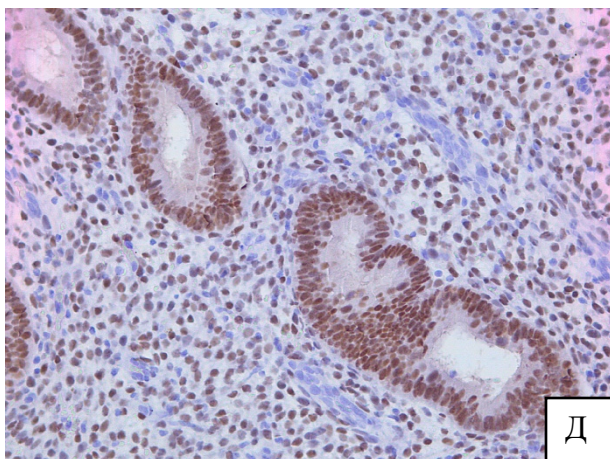
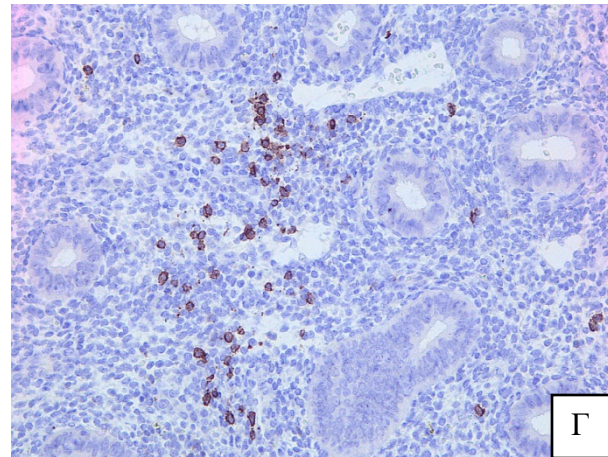
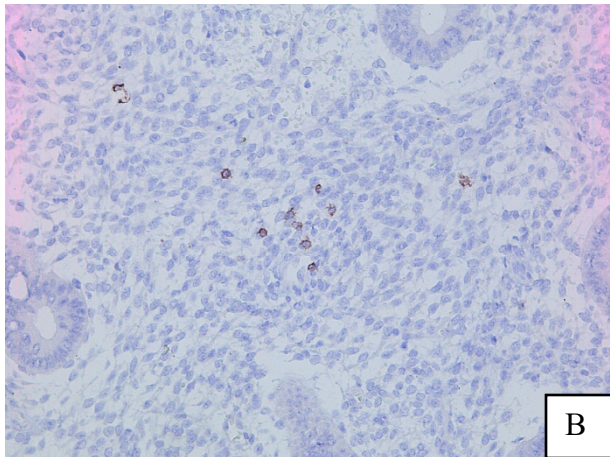
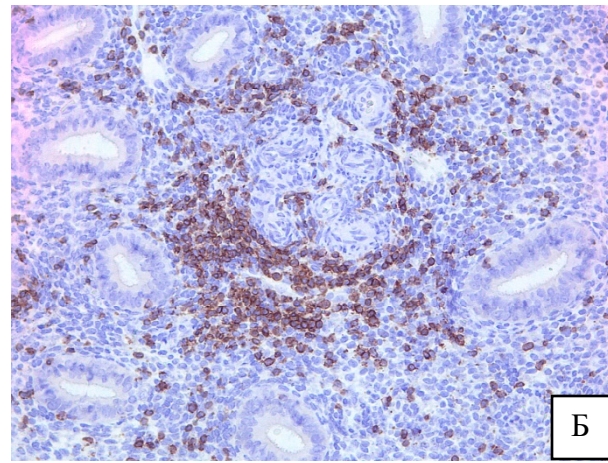
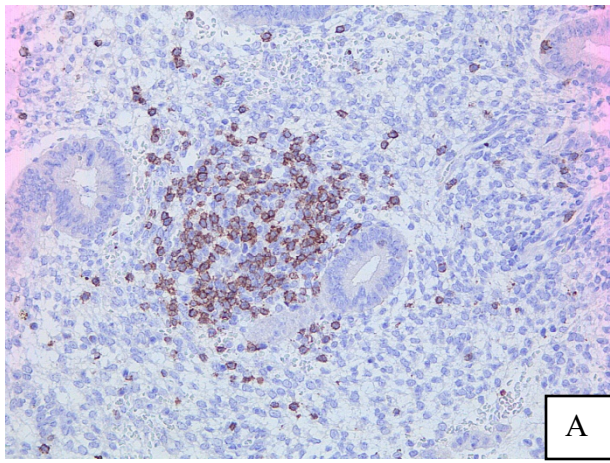


Рисунок 2 – Морфологические особенности особенности эндометрия при клиническом диагнозе «бесплодие».

А, Б, – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD3;

В, Д – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к CD20;

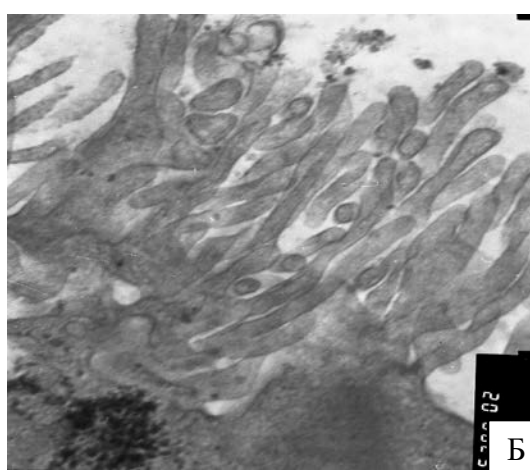
Г – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к ER;

Е – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к PR;

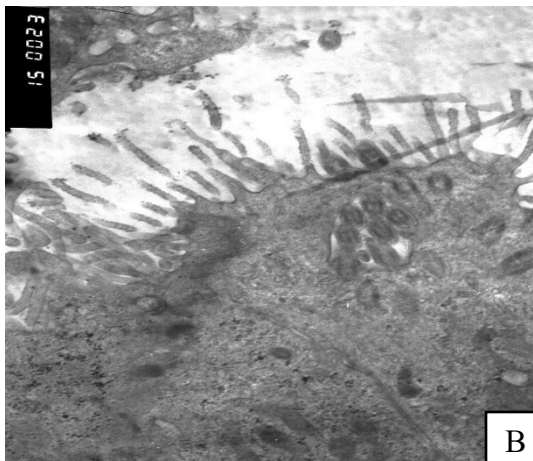
Увеличение x200 (хромоген – DAB, контрокраснение гематоксилином Майера).



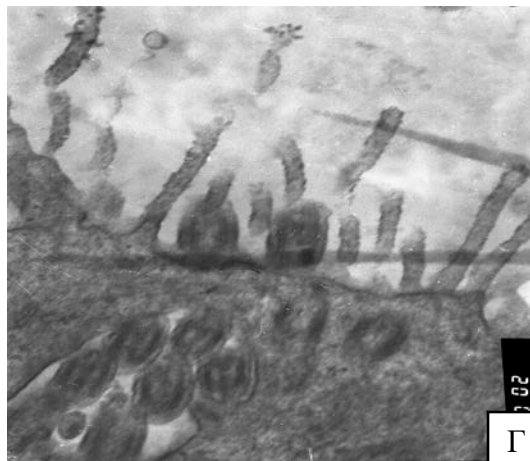
А



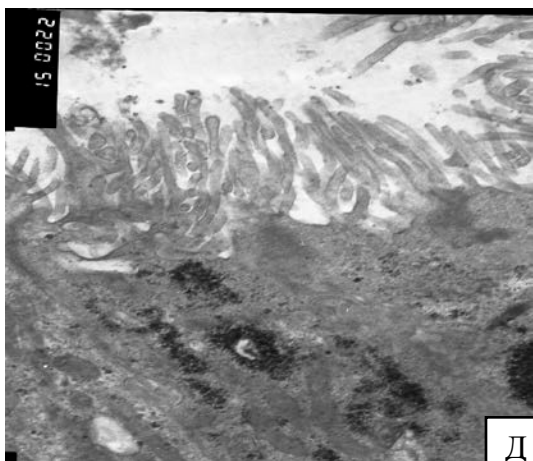
Б



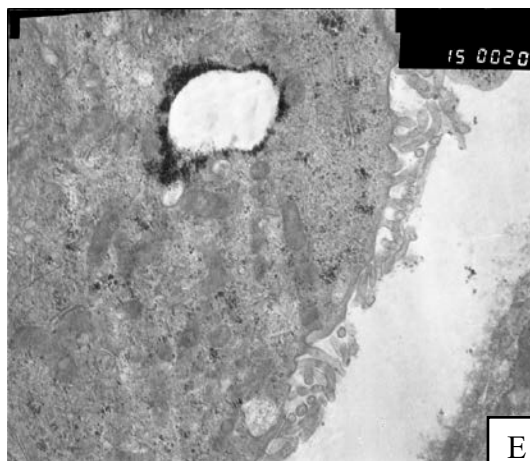
В



Г



Д



Е

Рисунок 3 – Морфологические особенности готовности эндометрия к имплантации.

Е – поверхность эндометрия до развития пиноподий;
А, В, Г – поверхность эндометрия с началом развития пиноподий.
Б, Д – эндометрий с выраженными пиноподиями.

Электронная микроскопия.
А, Б, В, Г, Д, Е – увеличение x2500.

Алгоритм морфологического исследования эндометрия женщин вступающих в программу вспомогательных репродуктивных технологий

Неровность поверхностного эпителия	Да/нет		
	поверхностный	функциональный	базальный
Слои эндометрия:	Да/нет	Да/нет	Да/нет
Железы			
1. Архитектура			
- однородный эндометрий			
- неоднородный эндометрий			
- отношение желез к строме 1:1			
- отношение желез к строме до 3:1			
- отношение желез к строме более 3:1			
- железистый распад			
2. Форма			
- мелкие трубчатые железы			
- мелкие трубчатые и извитые			
- извитые железы			
- извитые растянутые железы			
2. Эпителий			
- неактивный эпителий			
- эпителий с низкой митотической активностью			
- митотически активный стратифицированный эпителий			
- нерегулярная субнуклеарная вакуолизация			
- регулярная субнуклеарная вакуолизация			
- внутрипросветная секреция			
- четко выявляемые пиноподии (40x)			
- цитологическая клеточная атипия			
Строма:			
- стромальный распад			
- компактная строма с митотической активностью			
- плотная строма с выраженной митотической активностью			
- плотная строма без митотической активности			
- стромальный отек			
- предецидуальные изменения			
Сосуды:			
- не выявляются			
- мелкие спиральные артерии и тонкостенные венулы			
- склерозированные спиральные артерии			
- фибриновые тромбы в мелких сосудах			

Заключение

На основании литературных данных и результатах собственных наблюдений разработан алгоритм морфологической оценки эндометрия у женщин, вступающих в программу ВРТ.

Возраст пациенток с бесплодием на момент забора материала для патологогистологического исследования варьировал от 31 до 38 лет, средний возраст составил $33,73 \pm 3,4$ лет. Средняя продолжительность бесплодия составила $3,86 \pm 1,7$ года. Первичное бесплодие имели 7 женщин из 10 (70%), 8 женщин из 10 (80%) имели неоднократные неудачные попытки ЭКО (от 1 до 4 неуспешных программ, в среднем $1,82 \pm 1,4$).

При микроскопическом исследовании эндометрия фаза пролиферации была установлена в 90% случаев, фаза секретиции – в 10% случаев. У трех пациенток (30%) определялось нарушение отторжения эндометрия с признаками обратного развития: наличие гиализированных клубков спиральных артерий в поверхностном слое эндометрия соответствующего средней фазе пролиферации. У 2 пациенток (20%) определялись минимальные признаки хронического неспецифического эндометрита на стандартных окрасках, такие как: наличие плазматических клеток в строме, лимфоидных инфильтратов вблизи кровеносных сосудов и/или желез с формированием лимфоидных фолликулов, неравномерно выраженный фиброз стромы, склеротические изменения стенок спиральных артерий. У одной пациентки (10%) отмечалось снижение экспрессии EsR и PrR.

При иммуногистохимическом окрашивании с антителами к CD20 (В-лимфоциты) и CD3 (Т-лимфоциты) позитивные клетки выявлены в поверхностном, функциональном и базальном слоях эндометрия (рисунок 2 А, Б, В, Г). Позитивность экспрессии CD20 от 3% до 32% ($14,7 \pm 12,3\%$), CD3 от 9% до 46% ($24 \pm 16,9\%$). Исследование рецепторов эстрогенов и прогестерона позволило установить равномерное их распределение в эпителии желез и стромальных клетках с разной степенью выраженности экспрессии. Общая железистая и стромальная позитивность экспрессии EsR составила от 15% до 66% ($40,5 \pm 21,2\%$), PrR – от 29% до 62% ($45,5 \pm 14,2\%$).

Спасибо за внимание