

ЭКСПРЕССИЯ ИНДУКТОРА (NOXA) И ИНГИБИТОРА (BCL-2) АПОПТОЗА В ЭНДОМЕТРИИ ПРИ ГИПОПЛАЗИИ И БЕСПЛОДИИ

Гришкина А.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Данькова И.В., Мелкозерова О.А.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, Екатеринбург, e-mail: xumukyc.ru@mail.ru

В настоящее время актуальны вопросы бесплодного брака и репродуктивных неудач. Тем не менее стандартное клиническое обследование с применением гистологических методов не позволяет в полной мере оценить рецептивность эндометрия и прогнозировать наступление беременности у женщин с тонким эндометрием и репродуктивными неудачами в анамнезе. По данным литературы имеются сведения, свидетельствующие, что нарушение регуляции пролиферативных и апоптотических процессов в эндометрии на протяжении секреторной фазы цикла приводит к его истончению и утрате рецептивных свойств, что может обуславливать репродуктивные неудачи и бесплодие. Известно, что роль апоптоза в регуляции функции эндометрия возрастает преимущественно в поздних секреторной и менструальной фазах, что позволяет использовать оценку соотношения проапоптотических и антиапоптотических факторов как маркер эндометриальной дисфункции при гипоплазии эндометрия и репродуктивных неудачах. Нами установлено, что у пациенток с гипоплазией эндометрия и бесплодием наблюдаются снижение площади и высоты пиноподий на апикальной поверхности эпителиоцитов, умеренно сниженная экспрессия рецепторов к NOXA и bcl-2 железистым клеткам эндометрия и повышение экспрессии bcl-2 клетками стромы, что свидетельствует о нарушении регуляции апоптоза и рецептивности эндометрия, следствием чего является неполноценная инвазия цитотрофобласта.

Ключевые слова: гипоплазия эндометрия, бесплодие, апоптоз, NOXA, bcl2, секреция.

EXPRESSION OF INDUCER (NOXA) AND INHIBITOR (BCL-2) OF APOPTOSIS IN THE THIN ENDOMETRIUM OF INFERTILE WOMEN

Grishkina A.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Dankova I.V., Melkozerova O.A.

Federal State Budgetary Institution «Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care» of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Yekaterinburg, e-mail: xumukyc.ru@mail.ru

Issues of sterile marriage and reproductive failures are relevant. However, a standard clinical examination with histological methods does not allow to fully assess the receptivity of the endometrium and prognoses the pregnancy in women with thin endometrium and history of reproductive failures. According to the literature, there is evidence that dysregulation of proliferative and apoptotic processes in the endometrium during the secretory phase of the cycle leads to its thinning and loss of receptive properties, which can lead to reproductive failure and infertility. It is known that the role of apoptosis in the regulation of endometrial function increases mainly in the late secretory and menstrual phases, which makes it possible to use the assessment of the ratio of apoptotic and antiapoptotic factors as markers of endometrial dysfunction in endometrial hypoplasia and reproductive failures. We found that patients with endometrial hypoplasia and infertility, have decreased area and height of pinopodia on the apical surface of epithelial cells, a moderately reduced expression of receptors for NOXA and bcl-2 by endometrial glandular cells, and an increase in the expression of bcl-2 by stromal cells, indicating a violation of apoptosis regulation, were established. and endometrial receptivity, resulting in inferior cytotrophoblast invasion.

Keywords: endometrial hypoplasia, infertility, apoptosis, NOXA, bcl2, secretion.

Нарушение регуляции пролиферативных и апоптотических процессов в эндометрии приводит к его истончению и утрате рецептивных свойств, что может являться причиной репродуктивных неудач и бесплодия. Клиническое обследование женщин с тонким эндометрием и репродуктивными неудачами в анамнезе с применением гистологических методов не позволяет в полной мере оценить рецептивность эндометрия и прогнозировать наступление беременности [1, 2].

У Y. Chang et al. [3] мы обнаружили, что основными патофизиологическими признаками «тонкого» эндометрия были нарушение пролиферации железистого эпителия и формирование сосудистой резистентности в маточных сосудах. Клеточная пролиферация, ангиогенез, дифференцировка (децидуализация) и десквамация (менструация) контролируются циклическими изменениями эстрогена и прогестерона, секретируемыми яичниками, а также факторами пролиферации и апоптоза [4]. В эндометрии наблюдается выраженная экспрессия супрессора опухолей p53, который является активатором генов Bcl-2 и NOXA [5]. A. Mourtzikou et al. [6] предположили, что изменение экспрессии Bcl-2 в нормальном эндометрии зависит от фазы цикла, поскольку ген Bcl-2 может усиливать пролиферативную активность железистого эндометрия, а соотношение Bcl-2/BAH поддерживает баланс пролиферации клеток эндометрия.

Белки из семейства Bcl-2 имеют по меньшей мере одну гомологичную Bcl-2 (BH- Bcl-2 Homolog) область. Эти белки можно разделить на три группы. Первая группа содержит антиапоптотические белки Bcl-xL и Bcl-2, которые содержат все четыре (BH1-BH4) домена. Ко второй группе относятся апоптотические белки Bak и Bax с тремя доменами BH (BH1, BH2, BH3). Члены третьей группы BH3, являющиеся также индукторами апоптоза, обладают только одним доменом – BH3, к этой группе относятся белки, Bad, Bid, Bim, Puma и NOXA.

NOXA (NADPH oxidase activator), известный как PMAIP1, активируется белком p53 в ответ на повреждение ДНК и является антагонистом Bcl-2, который снижает количество свободных радикалов, блокирует внутриклеточный приток Ca²⁺ в клеточные органеллы и уменьшает p53-зависимый апоптоз [7, 8].

Маркер NOXA преимущественно используют в оценке апоптоза при развитии опухолевых процессов соединительной и нервной ткани [9]. Однако в последнее время определение уровня экспрессии рецептора этого белка стало проводиться для изучения состояния слизистой матки.

Тем не менее, несмотря на большое количество исследований, недостаточное внимание уделяется изменению процессов клеточной гибели в гипопластичном секреторном эпителии у женщин с бесплодием.

Цель исследования: оценить экспрессию индуктора апоптоза NOXA и ингибитора апоптоза bcl-2 в эндометрии в секреторную фазу у пациенток с бесплодием и гипоплазией эндометрия.

Материалы и методы исследования. Проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование образцов эндометрия у 32 женщин с гипоплазией эндометрия и бесплодием (основная группа), проходивших обследование на базе ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России в 2017–2019 гг., и 31 гинекологически здоровой женщины

(группа сравнения), обратившихся по вопросам планирования семьи в связи с мужским фактором бесплодия. Критерии исключения: прием гормональных препаратов в течение последних двух месяцев перед исследованием, наличие тяжелой соматической патологии. Все женщины подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании, одобренном локальным этическим комитетом, и на открытую публикацию его результатов. Обследование пациенток проводили по единой схеме, включающей анализ жалоб и анамнеза, общепринятые клинические и лабораторные исследования, морфологическое и иммуногистохимическое исследование эндометрия, полученного путем Пайпель-биопсии на 20–22-й день менструального цикла. Все женщины находились в репродуктивном возрасте, имели овуляторный менструальный цикл; уровень гормонов гипоталамо-гипофизарной системы, стероидных гормонов яичников, гормонов надпочечников, щитовидной железы в сыворотке крови соответствовал нормативным значениям согласно предоставленным для истории болезни данным. Эндометрий подвергали комплексному морфологическому и морфометрическому исследованию. Гистологическое изучение парафиновых срезов эндометрия проводили при окраске материала гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону. Морфометрические измерения площади желез, процент покровных эпителиоцитов, имеющих пиноподии, а также высоту пиноподий определяли при помощи программы ImageJ (Java based).

В зависимости от площади, занимаемой эпителиальным покровом, пиноподии характеризовались как избыточные (более 50%), умеренные (от 20% до 50%) и невыраженные (менее 20%) [10]. Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли при оптимальном увеличении на микроскопе Carl Zeiss Primo Star (Germany) с использованием цифровой фотокамеры Carl Zeiss, (Germany).

Тканевые образцы для иммуногистохимического исследования готовили по общепринятой методике. Используемые антитела NOXA (поликлональные мышинные антитела, «GeneTex», США), bcl-2 (клон 100/D5, «GeneTex», США) предназначены для работы с парафиновыми срезами по общепринятым протоколам, окрашивание производили с использованием иммуногистостейнера закрытого типа Bond max (производитель Leica, Германия). Микроскопию проводили с учетом выраженности рецепторов NOXA, bcl-2 в строме и железах, для анализа результатов ИГХ реакций использовали метод гистологического счета H-score по формуле: $HS=1a+2b+3c$, где а – процент слабоокрашенных клеток, b – процент умеренно окрашенных клеток, с – процент сильно окрашенных клеток, 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 7.0», «Excel». Для показателей, характеризующих

качественные признаки, указывали абсолютное значение и относительную величину в процентах, для проверки статистических гипотез использовали критерий хи-квадрат. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий осуществляли с помощью критериев Стьюдента, Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Средний возраст женщин в группах был сопоставим и составил в первой группе $34,75 \pm 0,9$ года, во второй группе – $34,6 \pm 1,01$ года ($p > 0,05$).

Число попыток ЭКО, предпринятых женщинами с бесплодием, достигало 4 (в среднем $1,75 \pm 0,24$), что свидетельствует об отсутствии эффекта от проведения программ ВРТ. В 37,3% наблюдений женщины с бесплодием и гипоплазией эндометрия относились к категории Recurrent Implantation failure (повторные неудачи имплантации) и имели две и более неудачные попытки ЭКО. Размеры матки по ультразвуковому исследованию не отличались у пациенток основной группы и были сопоставимы с размерами у женщин из группы сравнения. У женщин с бесплодием и гипоплазией толщина эндометрия по М-эхо составила $5,02 \pm 0,34$ мм, что практически в 2 раза меньше, чем в группе сравнения: $9,95 \pm 0,45$ мм ($p < 0,05$).

При анализе гинекологической заболеваемости женщин в группах наблюдения основной жалобой, предъявляемой пациентками, было отсутствие беременности в течение года и более (100%). Менархе и продолжительность менструального цикла в группах наблюдения не имели достоверных различий. Длительность менструаций была достоверно меньше (до 3 дней) у женщин с гипоплазией эндометрия ($p = 0,0024$), что объясняется наличием у них гипоменструального синдрома.

День цикла на момент взятия материала соответствовал ранней или средней стадиям фазы секреции. При макроскопической оценке материала достоверных различий в характере образцов не выявлено. При микроскопическом исследовании у женщин основной группы наблюдались слабо выраженные признаки апокриновой секреции, полноценная секреторная трансформация регистрировалась в 56,25% (18) случаев по сравнению с 87% (27) во второй группе ($p < 0,05$). Количество желез в этой группе женщин в поле зрения было в 2 раза ниже, чем в группе сравнения ($5,3 \pm 0,25$ против $9,28 \pm 0,49$, $p < 0,001$).

Оценка площади эпителиоцитов, имеющих пиноподии, представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика пиноподий на апикальной поверхности покровных эпителиоцитов

Характеристика пиноподий	Основная группа (N=32)		Группа сравнения (N=31)		Уровень значимости, р
	%	Абс.	%	Абс.	
Отсутствие	12,5	4	0	0	$p > 0,05$

пиноподий на апикальной поверхности					
Невыраженные пиноподии	53,12	17	12,9	4	p<0,05
Умеренные пиноподии	15,62	5	29,0	9	p<0,05
Изобилующие пиноподии	18,75	6	58,06	18	p<0,05
Низкие пиноподии	68,75	22	3,22	1	p<0,05
Высокие пиноподии	18,75	6	96,78	30	p<0,05

При оценке площади эпителиоцитов, имеющих пиноподии, установлено, что у каждой восьмой женщины основной группы пиноподии отсутствовали (рис. 1). Невыраженные пиноподии у женщин с нарушением репродуктивной функции регистрировались в 4 раза чаще, а умеренные и изобилующие пиноподии встречались практически в 2 и 3 раза реже, чем в группе сравнения, что свидетельствует о значительном снижении рецептивности эндометрия. Отличался и характер пиноподий. У женщин с бесплодием преобладали низкие пиноподии, в группе сравнения – высокие.

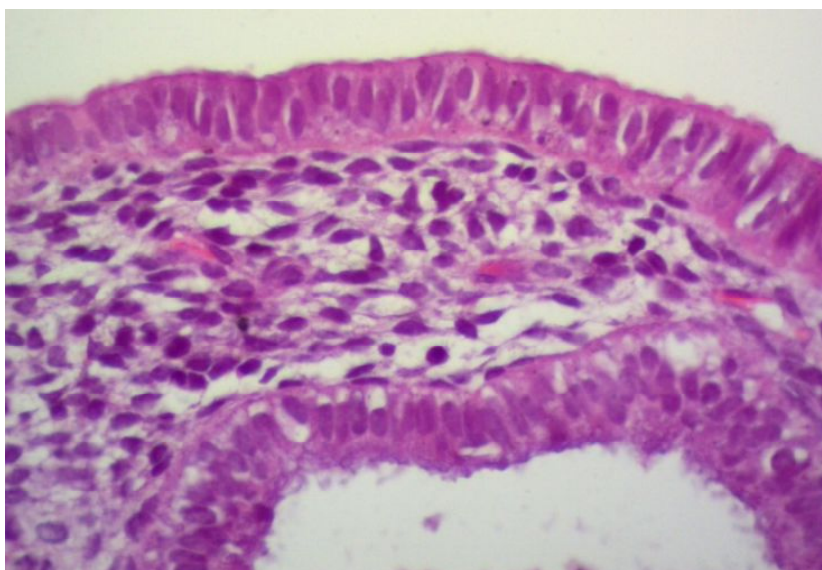


Рис. 1. Поверхностный эпителий эндометрия женщины с гипоплазией эндометрия, отсутствие пиноподий на апикальной поверхности.

Окраска гематоксилином и эозином, х 400

Проведенные исследования показали, что более выраженная экспрессия bcl-2 в клетках стромы наблюдалась у женщин основной группы, однако статистически значимых различий не обнаружено ($p>0,05$) (табл. 2).

Экспрессия NOXA и bcl-2 в эндометрии

Характеристика пиноподий	Основная группа (N=32)	Группа сравнения (N=31)	Уровень значимости, p
	балл	балл	
Экспрессия NOXA в железах	246,56±14,9	292,18±6,24	p<0,05
Экспрессия NOXA в строме	9,37±9,37	2,58±2,58	p>0,05
Экспрессия bcl-2 в железах	59,22±8,2	118,28±17,46	p<0,05
Экспрессия bcl-2 в строме	60,41±8,7	44,53±7,18	p>0,05

Экспрессия bcl-2 в железах у женщин с гипоплазией была менее выражена (p<0,05) (рис. 2). Это противоречит результатам Panzan, Michele Q. et al. [11], которые продемонстрировали более высокую экспрессию Bcl-2 в эпителиальных клетках во время окна имплантации у женщин с идиопатическим бесплодием, что свидетельствует об уменьшении апоптотических сигнальных механизмов.

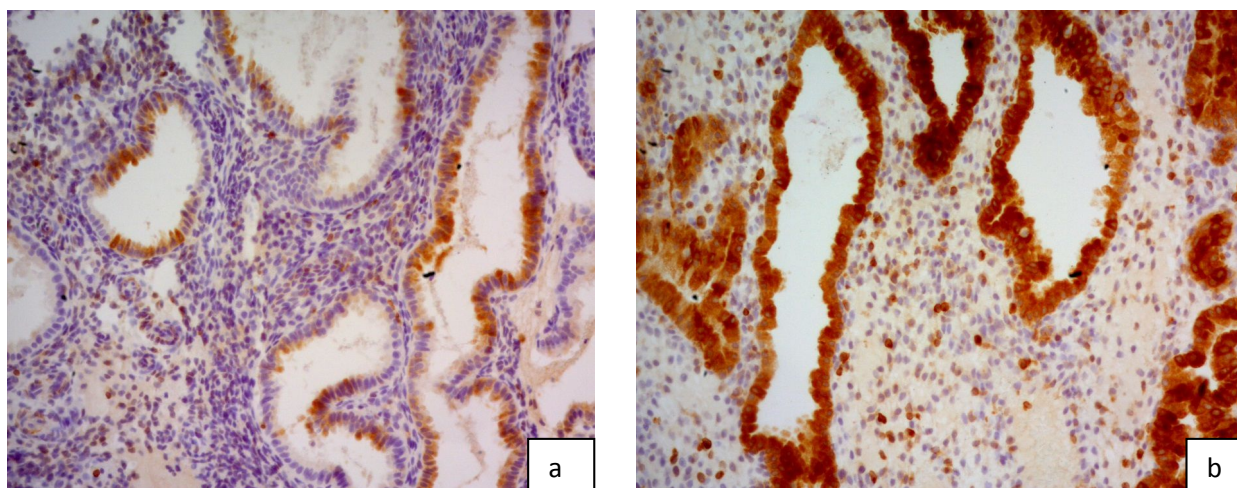


Рис. 2: *a* – слабая экспрессия bcl-2 в железах эндометрия женщин с гипоплазией эндометрия, *b* – выраженная экспрессия в железах эндометрия женщин группы сравнения.

Окраска – иммуногистохимический метод, полимерная тест-система; x200

При оценке экспрессии NOXA в железах и строме у женщин основной группы отмечены увеличение его экспрессии в строме и уменьшение в железистом эпителии (p<0,05 для желез). Согласно данным литературы белок NOXA участвует в контроле путей клеточной гибели в нескольких типах клеток благодаря конкурентному связыванию с

белками, включая антиапоптотические белки Bcl-2, белок A1 Bcl-xL и MCL1. Апоптоз в нормальном секреторном эндометрии способствует устранению старых или нефункционирующих клеток и обеспечивает восстановление ткани в каждом менструальном цикле. Численность апоптотических клеток максимальна в железистом эпителии и значительно меньше в строме. Различные факторы, связанные с апоптозом, участвуют в регуляции секреторной трансформации клеток эндометрия. Проведенные исследования показали, что у женщин с гипоплазией эндометрия наблюдалось снижение экспрессии индуктора апоптоза NOXA преимущественно в железистых клетках.

Полученные нами данные противоречат результатам исследования Lebedeva et al. [11], свидетельствующим о значительном повышении количества клеток с рецепторами bcl-2 в эндометрии пациентов с замершими беременностями и увеличении только NOXA у пациенток с невынашиванием, что диктует необходимость проведения дальнейших исследований.

Выводы

Таким образом, у женщин с гипоплазией эндометрия и бесплодием установлены снижение площади и высоты пиноподий на апикальной поверхности эпителиоцитов, умеренно сниженная экспрессия рецепторов к NOXA и bcl-2 железистыми клетками эндометрия и повышение экспрессии bcl-2 клетками стромы, что свидетельствует о нарушении регуляции апоптоза и рецептивности эндометрия, следствием чего является неполноценная инвазия цитотрофобласта.

Список литературы

1. Gnainsky Y., Dekel N., Granot I. Implantation: mutual activity of sex steroid hormones and the immune system guarantee the maternal-embryo interaction. *Semin. Reprod. Med.* 2014. Vol. 32. P. 337-345.
2. Kanzaki H. *Uterine Endometrial Function*. Osaka: Springer; 2017. 156 p.
3. Chang Y., Li J., Chen Y. et al. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015. Vol.8 (1). P. 1286–1290.
4. Marshall E., Lowrey J., MacPherson S., et al. In Silico Analysis Identifies a Novel Role for Androgens in the Regulation of Human Endometrial Apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011. Vol.96(11). P. 1746-1755.

5. Genazzani A.R., Tarlatzis B.C. *Frontiers in Gynecological Endocrinology: Volume 3: Ovarian Function and Reproduction - From Needs to Possibilities*. Switzerland: Springer, 2015. 214 p.
6. Amstad P.A., Liu H., Ichimiya M., Berezsky I.K., Trump B.F., Buhimschi I.A., Gutierrez P.L. BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox. Rep.* 2001. Vol.6. P. 351-362.
7. Antsiferova Y.S., Sotnikova N.Y. Apoptosis and endometrial receptivity: Relationship with in vitro fertilization treatment outcome. *World J. Obstet. Gynecol.* 2016. Vol.5(1). P. 87-96.
8. Liu Y.L., Lai F., Wilmott J.S., et al. Noxa upregulation by oncogenic activation of MEK/ERK through CREB promotes autophagy in human melanoma cells. *Oncotarget.* 2014. Vol.5(22). P. 11237-11251.
9. Achache H., Revel A. Endometrium receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum. Reprod. Update.* 2006. Vol. 12 (6). P. 731–74
10. Panzan M.Q., Mattar R., Maganhin C.C. et al. Evaluation of FAS and caspase-3 in the endometrial tissue of patients with idiopathic infertility and recurrent pregnancy loss// *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 2013. Vol. 167, Issue 1. P. 47–52.
11. Lebedeva O., Zhukova I.O., Ivashova O.N., Pakhomov S.P., Churnosov Mikhail. Proteins P53 and BCL-2 in pathogenesis of missed and spontaneous abortions. *Drug Invention Today.* 2017. Vol. 9. P. 65-68.