

ЭКСПРЕССИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА CD34+ В ГРАВИДАРНОМ ЭНДОМЕТРИИ ПРИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЯХ ПОСЛЕ ЭКО И ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Траль Т.Г.^{1,2}, Толибова Г.Х.^{1,3}

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, e-mail: ttg.tral@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург;

³ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург

Полноценный ангиогенез является ключевым компонентом развития эндометрия, имплантации и плацентации. Хронический эндометрит приводит к активации патологического неоангиогенеза, склерозу сосудистого русла и фиброзу стромального компонента эндометрия, что ведет к репродуктивным потерям. Цель исследования – оценить экспрессию эндотелиального маркера CD34+ в gravidарном эндометрии при неразвивающейся беременности после ЭКО и привычном невынашивании беременности. В исследование включены 40 образцов abortивного материала от пациенток с хроническим эндометритом: 20 образцов gravidарного эндометрия от пациенток при неразвивающейся беременности после ЭКО (I группа) и 20 образцов gravidарного эндометрия от пациенток при привычном невынашивании беременности (II группа); 15 образцов abortивного материала, полученного после прерывания беременности по желанию женщины (контрольная группа). Гистологическое исследование проведено по стандартной методике. Иммуногистохимическое исследование эндотелиального фактора CD34+ [клон QBEnd-10] проводили с использованием первичных антител в стандартном разведении согласно протоколу производителя (Dako) Cytomation. Компактный слой gravidарного эндометрия во всех группах характеризовался полноценной трансформацией, овоидно-округлой формой капилляров с разной степенью кровенаполнения. Экспрессия CD34+ в gravidарном эндометрии контрольной группы была статистически значимо ниже по сравнению с основными группами. При сравнении внутри основных групп верифицировано статистически значимое повышение экспрессии маркера при неразвивающейся беременности после ЭКО по сравнению с abortивным материалом от пациенток с привычным невынашиванием беременности. Верификация экспрессии маркера CD34+ в gravidарном эндометрии может быть использована в клинической практике для оценки сосудистого компонента у пациенток с хроническим эндометритом в анамнезе.

Ключевые слова: хронический эндометрит, неразвивающаяся беременность после ЭКО, привычное невынашивание беременности, gravidарный эндометрий, эндотелиальный маркер CD34+.

EXPRESSION OF ENDOTHELIAL FACTOR CD34+ IN THE GRAVID ENDOMETRIUM IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE LOSSES AFTER IVF AND RECURRENT MISCARRIAGE

Tral T.G.^{1,2}, Tolibova G.Kh.^{1,3}

¹D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, e-mail: ttg.tral@yandex.ru;

²State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg;

³I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg

Adequate angiogenesis is a key factor of endometrial development, implantation, and placentation. Chronic endometritis leads to the activation of abnormal neoangiogenesis, vascular bed sclerosis and fibrosis of endometrial stroma, which causes reproductive loss. The purpose of the study was to evaluate the expression of the endothelial marker CD34+ in the gravid endometrium in missed abortion after IVF and recurrent miscarriage. The study included 40 tissue samples from patients with chronic endometritis: 20 samples of gravid endometrium from patients with missed abortion after IVF (group I); 20 samples of gravid endometrium from patients with recurrent miscarriage (group II); 15 samples of the material obtained after termination of pregnancy by elective abortion (control group). Histological examination was carried out according to the standard method. Immunohistochemical study of endothelial factor CD34+ [clone QBEnd-10] performed using primary antibodies in standard dilution according to the instruction of the manufacturer (Dako) Cytomation. The compact layer of the gravid endometrium in all groups was characterized by adequate transformation, ovoid-rounded capillaries with different blood filling. Expression of CD34+ in the gravid endometrium in control

group was significantly lower compared to other groups. Endometrial expression of CD34+ in the missed abortion after IVF group was significantly higher compared to recurrent miscarriage group. **Verification of the expression of the CD34+ marker in the gravid endometrium can be used in clinical practice to assess the vascular component in patients with a history of chronic endometritis.**

Keywords: chronic endometritis, missed abortion after IVF, recurrent miscarriage, gravid endometrium, endothelial marker CD34+.

Полноценный ангиогенез служит ключевым компонентом развития эндометрия, имплантации и плацентации. Патологическая активация неоангиогенеза может явиться одним из факторов нарушения имплантации при репродуктивных потерях независимо от способов наступления беременности. Известно, что децидуальные клетки регулируют инвазию трофобласта, способствуют дифференцировке иммунных клеток и стимулируют ангиогенез посредством синтеза компонентов внеклеточного матрикса, цитокинов, многочисленных протеаз, метаболитов, ионов, факторов роста, цитокинов, белков матрикса, которые могут модулировать процессы ангиогенеза/васкулогенеза как положительно, так и отрицательно [1–4].

Патология эндометрия, а именно хронический эндометрит, приводит к склерозу сосудистого русла и фиброзу стромального компонента эндометрия, активации патологического неоангиогенеза, поскольку наличие воспалительного процесса изменяет экспрессию эндотелиального фактора в фазу пролиферации и секреции, что в совокупности неизбежно приводит к патологии фертильности [5–7].

Нарушение кровообращения в фетоэмбриональном комплексе при наличии исходного хронического эндометрита и патологическом ангиогенезе, вероятнее всего, связано с несоответствием в созревании и дифференцировке сосудов, а также с повышенным окислительным стрессом. Окислительный стресс возникает при дисбалансе между оксидативными факторами и антиоксидантной системой, которая истощается из-за избытка активных форм кислорода (АФК), обладающих цитотоксичностью [8–10].

В компактном слое gravidарного эндометрия сосудистый компонент представлен концевыми отделами артериол и большей частью капиллярным руслом, роль которого в развитии беременности недостаточно изучена. Одним из перспективных маркеров верификации патологического неоангиогенеза может явиться эндотелиальный фактор CD34+ – белок семейства сиаломуцина, который экспрессируется на ранних гемопоэтических и сосудистых клетках-предшественниках в кровеносных сосудах.

Изучение эндотелиального фактора CD34+ в gravidарном эндометрии позволит расширить представления о влиянии патологического неоангиогенеза на развитие беременности у пациенток с исходным хроническим эндометритом, невынашиванием беременности и повторными потерями беременности ранних сроков после ЭКО.

Цель исследования – оценить экспрессию CD34+ в гравидарном эндометрии при неразвивающейся беременности после ЭКО и привычном невынашивании беременности.

Материал и методы исследования. В исследование включены 40 образцов абортивного материала от пациенток с хроническим эндометритом в анамнезе, верифицированным гистологическим и иммуногистохимическим методами: 20 образцов гравидарного эндометрия от пациенток при неразвивающейся беременности после ЭКО (I группа) и 20 образцов гравидарного эндометрия от пациенток при привычном невынашивании беременности (II группа) на сроках от 5 до 8 недель гестации, поступивших в отдел патоморфологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». Контрольную группу составили 15 образцов абортивного материала, полученного после прерывания беременности по желанию женщины на аналогичном сроке беременности. Критериями включения в исследование для всех групп явились: получение материала хирургическим путем, полноценная гравидарная трансформация эндометрия, отсутствие хромосомной патологии трофобласта, подтвержденное цитогенетическим методом исследования отсутствие признаков инфекционного процесса, иммунологических нарушений, обратного развития гравидарного эндометрия.

Гистологическое исследование

Операционный материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине (рН 7,2), после стандартной гистологической проводки в гистопроцессоре Histo-Tek VP1 (Sakura, Япония) заливали в парафин на приборе модульной системы заливки TES 99 (Medite, Германия). Из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм на микротоме Rotary 3002 (PFM, Германия) и окрашивали их гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). Исследование проводили на микроскопе Olympus CX31 (Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Оценивали: наличие маточной беременности (инвазию трофобласта в зоне плацентарного ложа), полноценность гравидарной трансформации компактного и спонгиозного слоев эндометрия (стромы и желез), состояние спиральных артерий, наличие инфильтрации (экссудативной/продуктивной) и других изменений.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах с использованием одноэтапного протокола с демаскировкой антигена. Верификацию эндотелиального фактора CD34+ [клон QVEnd-10] проводили с использованием первичных антител в стандартном разведении согласно протоколу производителя (Dako) Cytomation. Оценку экспрессии маркера проводили на микроскопе Olympus BX46 и посредством программного обеспечения «CellSens 47 Entry» с последующей морфометрией и применением программы ВидеоТест-Морфология 5.2 (Россия). В каждом срезе оценивали относительную

площадь экспрессии (%) – вычисляли как отношение площади иммунопозитивных клеток к общей площади препарата и оптическую плотность экспрессии (усл. ед) – величина вычислялась автоматически. После этого вычислялись средние величины исследуемых показателей.

Статистическое исследование

Статистический анализ проводился в программе SPSSV.23.0. Параметры распределения в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде среднего (95%-ный доверительный интервал) – М (95% ДИ). Для определения статистически значимых различий между количественными параметрами нормально распределенных данных исследуемых групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с расчетом 95%-ного доверительного интервала. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Во всех исследованных образцах компактный слой гравидарного эндометрия характеризовался полноценной трансформацией с формированием единого пласта зрелых децидуальных клеток. Отмечался неравномерно выраженный отек компактного слоя от слабо до умеренно выраженного. Железы компактного слоя гравидарного эндометрия имели щелевидный или слабо овоидный просвет и были выстланы уплощенным кубическим эпителием. Капиллярное сосудистое русло в абортивном материале контрольной группы большей частью представлено капиллярами с округло-овальным просветом, умеренным неравномерным кровенаполнением или относительным малокровием (рис. 1А, 1В).

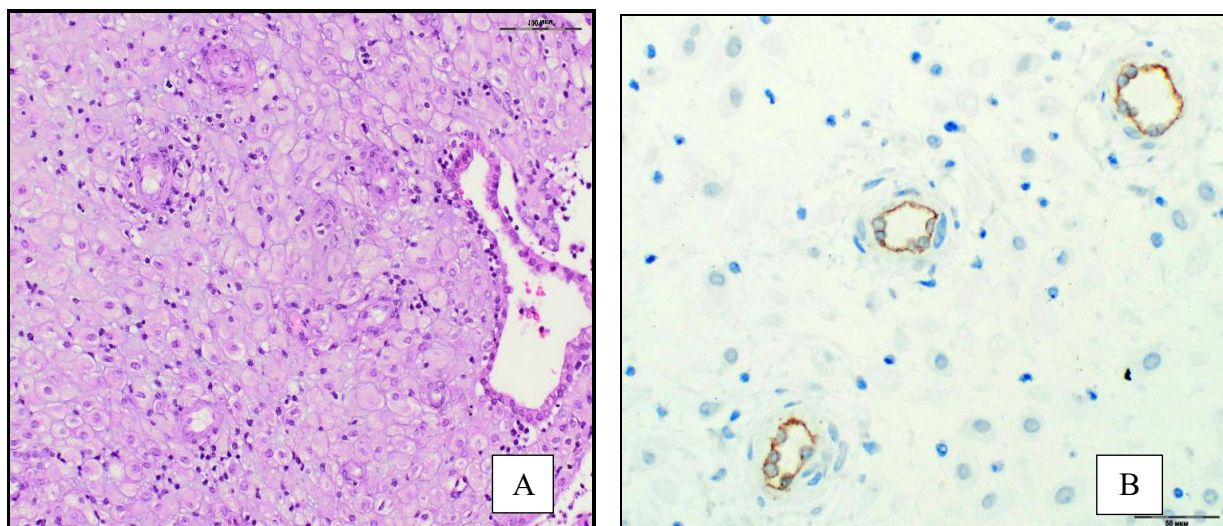


Рис. 1. Капиллярное русло компактного слоя эндометрия в абортивном материале после прерывания по желанию женщины. Гематоксилин и эозин ув. $\times 200$ (А). ИГХ ув. $\times 200$ (В)

Капиллярное русло в абортивном материале при невынашивании беременности характеризовалось овоидным или щелевидным просветом с умеренной степенью кровенаполнения или относительным малокровием (рис. 2А, 2В).

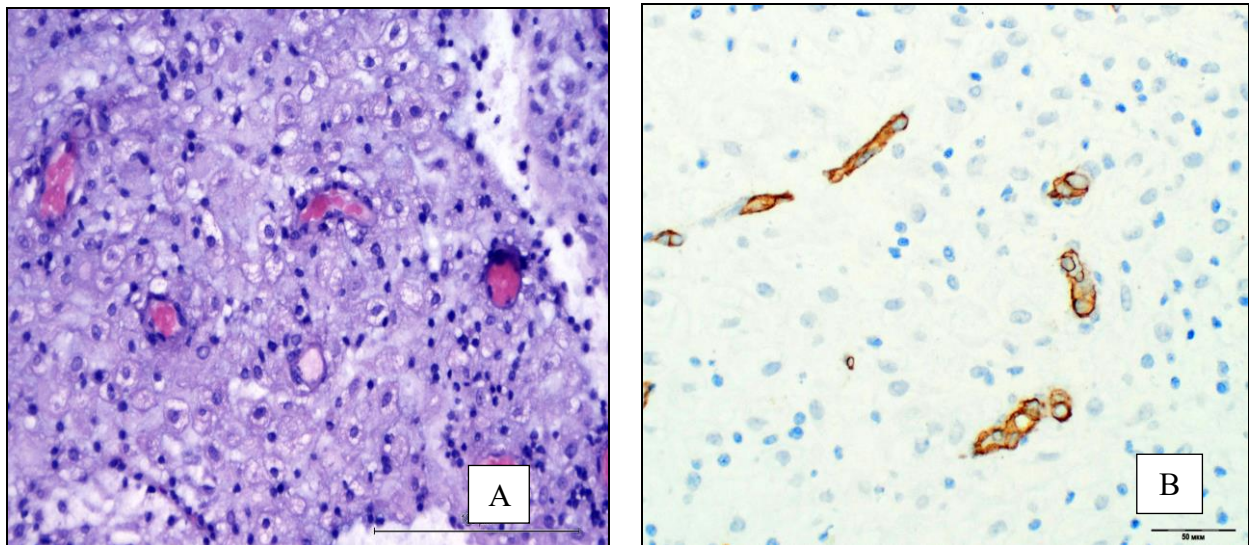


Рис. 2. Капиллярное русло компактного слоя эндометрия в абортивном материале при привычном невынашивании беременности.

Гематоксилин и эозин ув. $\times 200$ (А). ИГХ ув. $\times 200$ (В)

Капиллярное русло в компактном слое гравидарного эндометрия при полноценной перестройке в образцах абортивного материала после ЭКО распределено неравномерно, представлено спавшимися сосудами и сосудами с сохраненным просветом. Во всех исследованных образцах отмечалось неравномерное кровенаполнение капиллярного сосудистого русла от относительного малокровия до умеренного кровенаполнения с множественными мелкоочаговыми кровоизлияниями в части образцов (рис. 3А, 3В).

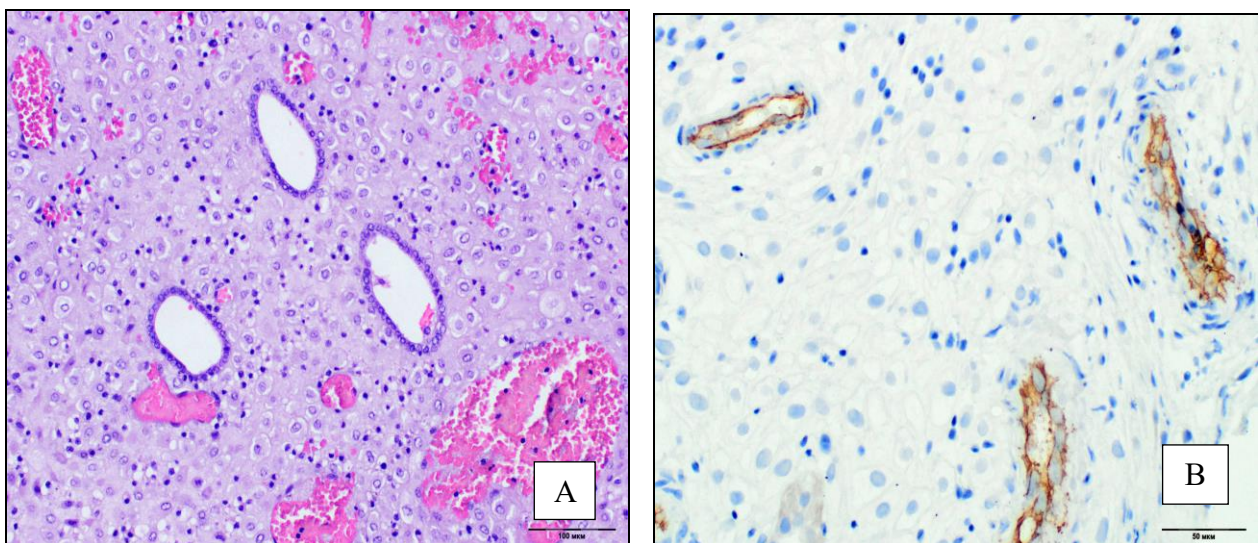


Рис. 3. Капиллярное русло компактного слоя эндометрия при полноценной гравидарной трансформации в абортивном материале после ЭКО.

Гематоксилин и эозин ув. ×200 (А). ИГХ ув. ×200 (В)

Результаты морфометрического исследования показали, что экспрессия CD34+ в гравидарном эндометрии контрольной группы от пациенток, пожелавших прервать беременность, была статистически значимо ниже по сравнению с основными группами ($p=0,0001$, $p=0,018$). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Площадь экспрессии эндотелиального маркера CD34+ в гравидарном эндометрии
М (95% ДИ)

Группы	Среднее значение	95%-ный доверительный интервал для среднего значения		F-statistic	p-value
		Нижняя граница	Верхняя граница		
Контрольная группа (n=15)	2,73	2,44	3,03	14,18	$p^{k-1} = 0,000$ $p^{k-2} = 0,018$ $p^{1-2} = 0,015$
I группа (n=20)	4,25	3,75	4,75		
II группа (n=20)	3,51	3,23	3,79		

При сравнении внутри основных групп верифицировано статистически значимое повышение экспрессии эндотелиального маркера CD34+ в I группе при неразвивающейся беременности после ЭКО по сравнению со II группой – абортивном материале от пациенток с привычным невынашиванием беременности ($p=0,015$).

При оценке оптической плотности экспрессии в контрольной группе выявлено статистически значимое повышение экспрессии данного маркера по сравнению с основными группами. При сравнении внутри основных групп отмечалась тенденция к повышению экспрессии в гравидарном эндометрии у пациенток с неразвивающейся беременностью после ЭКО по сравнению с гравидарным эндометрием от пациенток с привычным невынашиванием беременности (табл. 2).

Таблица 2

Относительная плотность экспрессии эндотелиального маркера CD34+ в гравидарном эндометрии М (95% ДИ)

Группы	Среднее значение	95%-ный доверительный интервал для среднего значения		F-statistic	p-value
		Нижняя граница	Верхняя граница		

Контрольная группа (n=15)	0,17	0,16	0,18	20,41	$p^{k-1} = 0,000$ $p^{k-2} = 0,000$ $p^{1-2} = 0,003$
I группа (n=20)	0,14	0,13	0,15		
II группа (n=20)	0,12	0,11	0,13		

В патогенезе влияния хронического эндометрита на морфофункциональные характеристики эндометрия сосудистому руслу отводится особая роль. Формирование патологического неангиогенеза на фоне воспалительного процесса усугубляет структурно-функциональные характеристики эндометрия, что, безусловно, негативно влияет на его репродуктивный потенциал [11].

На ранних стадиях развития беременности физиологическая гипоксия необходима для адекватной пролиферации и дифференцировки трофобласта. К концу 1-го триместра кровообращение между плацентой и плодом полностью сформировано, и дальнейшее быстрое повышение уровня кислорода важно для стимулирования дифференцировки трофобласта и процессов инвазии во 2-м триместре [12].

Гиперваскуляризация, вероятно, изменяет показатели физиологической гипоксии сначала в секреторном эндометрии, а затем и гравидарном эндометрии при наступлении беременности в сторону гипероксии и избытка активных форм кислорода с формированием окислительного стресса, что может служить самостоятельным фактором прекращения развития беременности в эмбриональные сроки до 8 недель гестации. Полученные нами данные о повышении площади экспрессии маркера CD34+ в гравидарном эндометрии пациенток с разными видами нарушения репродуктивной функции подтверждают эту гипотезу.

Известно, что при хроническом эндометрите нарушается микроциркуляция с последующей ишемией, гипоксией и повреждением клеточных мембран ткани с развитием фиброза и нарушением рецепторного, иммунного и ангиогенного профиля эндометрия, которые детерминируют нарушения имплантации и плацентации. Статистически значимое повышение экспрессии эндотелиального фактора в гравидарном эндометрии при неразвивающейся беременности после ЭКО и при привычном невынашивании беременности свидетельствует об активации патологического неангиогенеза и нарушении кровоснабжения ткани.

Выводы

Верификация экспрессии маркера CD34+ в гравидарном эндометрии может быть использована в клинической практике для оценки сосудистого компонента эндометрия у

пациенток с хроническим эндометритом в анамнезе. Своевременная обоснованная патогенетическая терапия хронического эндометрита во избежание формирования вторичного органического повреждения структурных компонентов эндометрия позволит улучшить репродуктивные исходы у пациенток с репродуктивными потерями после ЭКО и привычным невынашиванием беременности.

Список литературы

1. Yang H.L., Zhou W.J., Lu H., Lei S.T., Ha S.Y., Lai Z.Z., Zheng Z.M., Ruan L.Y., He Y.Y., Li D.J., Li M.Q., Shao J. Decidual stromal cells promote the differentiation of CD56bright CD16-NK cells by secreting IL-24 in early pregnancy. *Am J. Reprod Immunol.* 2019. Vol. 81 (6). P. e13110. DOI: 10.1111/aji.13110.
2. Bourdieu A., Ahmad S.F., Lachhab A., Akoum A. Regulation of inflammatory and angiogenesis mediators in a functional model of decidualized endometrial stromal cells. *Reprod Biomed Online.* 2016. Vol. 32 (1). P. 85-95. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.09.011.
3. Ujvari D., Jakson I., Oldmark C., Attarha S., Alkasalias T., Salamon D., Gidlöf S., Hirschberg A.L. Prokineticin 1 is up-regulated by insulin in decidualizing human endometrial stromal cells. *J. Cell Mol Med.* 2018. Vol. 22 (1). P. 163-172. DOI: 10.1111/jcmm.13305.
4. Boldeanu L., Dijmărescu A.L., Radu M., Siloși C.A., Popescu-Drigă M.V., Poenariu I.S., Siloși I., Boldeanu M.V., Novac M.B., Novac L.V. The role of mediating factors involved in angiogenesis during implantation. *Rom J. Morphol Embryol.* 2020. Vol. 61 (3). P. 665-672. DOI: 10.47162/RJME.61.3.04.
5. Лихачева В.В., Зорина В.Н., Третьякова Я.Н., Баженова Л.Г., Третьякова Т.В., Ренге Л.В. Современные представления о патогенезе хронического эндометрита // *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2017. № 4. С. 25-32. DOI: 10.17116/rosakush201717425-32.
6. Толибова Г.Х. Эндометриальная дисфункция у женщин с бесплодием патогенетические детерминанты и клинико-морфологическая диагностика: дис. ... докт. мед. наук. Санкт-Петербург, 2018. 282 с.
7. Kimura F., Takebayashi A., Ishida M., Nakamura A., Kitazawa J., Morimune A., Hirata K., Takahashi A., Tsuji S., Takashima A., Amano T., Tsuji S., Ono T., Kaku S., Kasahara K., Moritani S., Kushima R., Murakami T. Review: Chronic endometritis and its effect on reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2019. Vol. 45 (5). P. 951–960. DOI: 10.1111/jog.13937.
8. Pereira R.D., De Long N.E., Wang R.C., Yazdi F.T., Holloway A.C., Raha S. Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. *Biomed Res Int.* 2015. Vol. 2015. P. 814543. DOI: 10.1155/2015/814543.

9. Zhi Z., Yang W., Liu L., Jiang X., Pang L. Early missed abortion is associated with villous angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway. *Arch Gynecol Obstet.* 2018. Vol. 298 (3). P. 537-543. DOI: 10.1007/s00404-018-4802-9.
10. Hussain T., Murtaza G., Metwally E., Kalhoro D.H., Kalhoro M.S., Rahu B.A., Sahito R.G.A., Yin Y., Yang H., Chughtai M.I., Tan B. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. *Mediators Inflamm.* 2021. Vol. 27. P. 9962860. DOI: 10.1155/2021/9962860.
11. Schoots M.H., Gordijn S.J., Scherjon S.A., van Goor H., Hillebrands J.L. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta.* 2018. Vol. 69. P. 153-161. DOI: 10.1016/j.placenta.2018.03.003.
12. Kenchegowda D., Natale B., Lemus M.A., Natale D.R., Fisher S.A. Inactivation of maternal Hif-1 α at mid-pregnancy causes placental defects and deficits in oxygen delivery to the fetal organs under hypoxic stress. *Dev Biol.* 2017. Vol. 422 (2). P. 171-185. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.12.013.