

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЧНОГО І ГІСТОХІМІЧНОГО СТАНУ ЕНДОМЕТРІЇ ПІСЛЯ ОТРИМАННЯ ООЦИТІВ ПРИ РІЗНИХ СХЕМАХ ПІДТРИМКИ ЛЮТЕЇНОВОЇ ФАЗИ

А. С. ЛУЦЬКИЙ, доц. О. А. ОМЕЛЬЧЕНКО

*Харківський національний медичний університет, Україна*

**Проаналізовано результати вивчення морфологічних і гістохімічних змін в ендометрії у жінок-донорів, у яких на п'яту добу після забору ооцитів використовувалися різні схеми підтримки лютеїнової фази. Зроблено висновок про те, що найбільш виражена готовність ендометрію до імплантації бластоцисти відзначається у жінок, які отримували високоочищений прогестерон для підшкірного введення у поєднанні з його внутрішньопіхвовою формою у вигляді гелю (90 мг).**

*Ключові слова: ендометрій, екстракорпоральне запліднення, лютеїнова фаза, прогестерон.*

За сучасними уявленнями, виникнення вагітності забезпечується двома складовими: функціонально повноцінним ембріоном і зрілістю ендометрію [1]. У теперішній час основним методом лікування безпліддя є екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ), при якому всі етапи зачаття і раннього розвитку ембріонів здійснюються поза організмом [2].

Відсутність імплантації у циклах ЕКЗ є однією з основних проблем сучасної репродуктології. Останніми роками з метою підвищення результативності циклів ЕКЗ особлива увага приділяється саме вивченню стану ендометрію [3].

Покривний епітелій матки першим контактує з бластоцистою, у результаті чого в ньому відбуваються морфологічні і молекулярні зміни, що забезпечують сприйнятливості ендометрію до нідації ембріону [4]. Цей процес неможливий без підготовки ендометрію стероїдними гормонами яєчників, що забезпечують проліферацію і диференціацію його та вироблення великої кількості біологічно активних молекул: нейропептидів, факторів росту, цитокінів, протеаз, різних білків тощо.

Проліферація і диференціація ендометрію контролюються гормонами яєчників [5]. Крім цього, він належить до числа тих рідкісних тканин, в яких імплантація можлива у так званому періоді «вікна імплантації» (ВІ) [6].

У циклах стимуляції яєчників у програмі допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) розвинені піноподії формуються на 18–24-й дні менструального циклу. Поява піноподій абсолютно залежить від впливу прогестерону. У цей період матковий ендометрій найбільше сприйнятливий до ембріону, оскільки продукується велика кількість гормонів і різноманітних біологічно активних речовин [7]. ВІ має особливе значення для проведення ЕКЗ за ідеальних умов для підготовки ендометрію до нідації ембріону і розвитку подальшої вагітності. У зв'язку із цим компенсація

недостатності лютеїнової фази (ЛФ) — це спосіб підвищення частоти настання й успішного прогресування вагітності [8].

Остаточним етапом діагностики стану ендометрію є його морфологічне дослідження.

Мета цієї роботи — вивчення морфологічних змін в ендометрії у донорів на п'яту добу після забору ооцитів при різних схемах підтримки ЛФ.

Дослідження було проведено на базі Клініки репродуктивної медицини імені акад. В. І. Грищенка «Імплант» (м. Харків). Під наглядом перебували 30 повністю соматично і гінекологічно обстежених здорових жінок — донорів ооцитів. Усім проводили ультразвуковий моніторинг із метою визначення динаміки зростання фолікулів. Коли вони досягали діаметру 12–14 мм, донорам починали вводити антагоніст гонадотропін-рилізінг гормону. Через 35–36 год після триггеру фінального дозрівання ооцитів донорам виконували трансвагінальну пункцію фолікулів. У день пункції здійснювали підтримку ЛФ. На п'яту добу після забору ооцитів з метою визначення ефективності різних схем підтримки ЛФ у донорів для морфологічного дослідження брали ендометрій, отриманий при пайпель-біопсії.

Для з'ясування оптимальної схеми підтримки ЛФ усіх обстежених було розділено на три групи, до кожної з яких увійшли 10 жінок. У першій групі вивчався ендометрій, отриманий у природному оваріально-менструальному циклі, у другій — для «підтримки» ЛФ пацієнткам призначали дидрогестерон перорально 30 мг на добу, у третій — високоочищений прогестерон для підшкірного введення у поєднанні з його внутрішньопіхвовою формою у вигляді гелю (90 мг).

Вік донорів варіював від 25 до 32 років. Жінки різних груп були однорідні за зростом і масою тіла. Усі пацієнтки мали регулярний овуляторний менструальний цикл, репродуктивний анамнез не мав достовірних відмінностей у групах. У всіх жінок

не було операцій на внутрішніх статевих органах, ендокринних захворювань, ендометріозу, уrogenітальних інфекцій, а за даними трансвагінального ультразвукового дослідження у порожнині матки не визначалося гіперпластичних процесів ендометрію.

Після забору ендометрію за допомогою пайпель-біопсії матеріал фіксувався у 10%-вому розчині формаліну. Ущільнення тканин, фіксованих у формаліні, досягалося проведенням через спирти зростаючої концентрації, целюдин, хлороформ і заливкою у парафін. Із виготовлених блоків для подальшого фарбування готувалися серійні зрізи завтовшки  $5 \times 10^{-6}$  мм.

Для вивчення морфологічних особливостей ендометрію використовували гістологічні методи зафарбовування, а саме — гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізоном [9]. За допомогою гістохімічного методу визначали сульфатовані (рН 1,5) і нессульфатовані (рН 3,5) глікозоамінглікани (ГАГ) з вимірюванням методом цитофотометрії оптичної щільності (Romhanyi, 1963). Також досліджували вміст глікогену з використанням ШІК-реакції. Інтенсивність гістохімічних реакцій в умовних одиницях оптичної щільності враховувалася на стереометричних комп'ютерних зображеннях мікрофотографій у програмі Adobe Photoshop 6,0. Мікропрепарати вивчали на мікроскопі Olympus BX-41 (Японія) з подальшою обробкою з використанням програм Olympus DP-soft version 3,1 і Microsoft Excel [10].

При дослідженні ендометрію у жінок першої групи висота функціонального шару становила до 8 мм. Залози мали компактне розташування, місцями були звивисті, їх епітелій однорядний. Апікальний відділ клітин наближався до банеподібної форми, їх численні ядра розташовувалися у центрі епітеліальних клітин, насичені хроматином. Траплялись залози, в яких велика частина ядер містилась у базальних відділах. Форма ядер — кругляста або витягнута. Визначалась виражена

субнуклеарна вакуолізація, яка при гістохімічному дослідженні з використанням ШІК-реакції підтверджує наявність глікогену у вакуолях (рис. 1).

У жінок першої групи, ендометрій яких був отриманий у природному оваріально-менструальному циклі, визначалась помірно виражена інтенсивність зафарбовування ядер у зв'язку з низьким розподілом глікогену (рис. 2).

У цій групі спостережень строма ендометрію була компактною, траплялись поодинокі децидуоподібні клітини, великі, з круглястим ядром, насиченим хроматином. Траплялись нечисленні волокна сполучної тканини, які зафарбовані пікрофуксином у червоний колір (рис. 3).

Дослідження, що проведені у жінок-донорів другої групи, яким для підтримки ЛФ призначали дигестерон перорально 30 мг на добу, показало, що ендометрій за мікроскопічною будовою дуже близький до такого ж, що й у жінок першої групи. Залози містяться компактно, вони здебільшого круглястої форми, однотипні, правильно розташовані, злегка розширені (рис. 4).

Товщина ендометрію жінок третьої групи становила 8,5 мм. Мікроскопічне вивчення його стану дає змогу відзначити появу більшої кількості залоз штопороподібної форми, які близько прилягають одна до одної. Епітелій крипт високий, призматичний, його апікальні відділи банеподібної форми. Ядра, що опускаються в базальні відділи, світлі, бідні на хроматин, пухирчасті. Практично у всіх клітинах епітелію вакуолі залістистих крипт локалізуються над ядрами. Строма у зішкрібах жінок цієї групи не є вираженою, пухка. Навколо судин трапляються децидуоподібні клітини, іноді полігональної форми (рис. 5).

Результати визначення інтенсивності гістохімічної реакції глікогену в ендометрії у жінок обстежених груп подано у табл. 1.

Отже, в першій та другій групах жінок не було достовірних відмінностей у розподілі глікогену

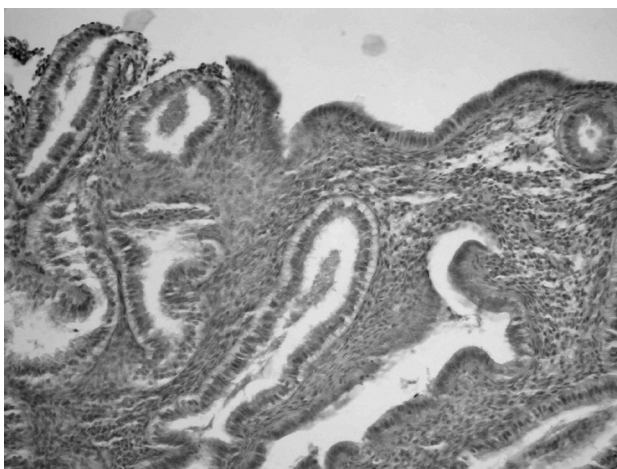


Рис. 1. Компактне розташування залоз ендометрію з центральною локалізацією ядер і субнуклеарною вакуолізацією (зафарб. гематоксилін-еозином,  $\times 200$ )

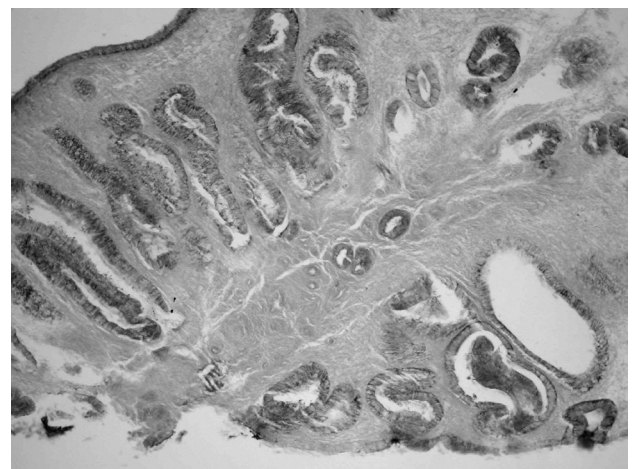


Рис. 2. Наявність глікогену під ядрами клітин ендометрію (зафарб. за ШІК-реакцією,  $\times 100$ )

Таблиця 1

**Інтенсивність гістохімічної реакції визначення глікогену в ендометрії обстежених жінок**

Групи жінок-донорів	Розподіл глікогену в ендометрії (ум. од. оптичної щільності)
Перша	0,244±0,012
Друга	0,314±0,011
Третя	0,365±0,013*

\*  $p \leq 0,05$  — достовірність відмінностей між порівнюваними групами.

Таблиця 2

**Інтенсивність гістохімічних реакцій визначення глікозамінгліканів у структурах ендометрію обстежених жінок**

Групи обстежених жінок-донорів	Розподіл ГАГ у структурах ендометрію (ум. од. оптичної щільності)	
	несульфатовані (рН 3,5)	сульфатовані (рН 1,5)
Перша	0,156±0,007*	0,314±0,014
Друга	0,119±0,004	0,355±0,011
Третя	0,210±0,008*	0,221 ± 0,009*

\*  $p \leq 0,05$  — достовірність відмінностей між сульфатованими і нессульфатованими ГАГ.

в ендометрії. В першій групі спостережень гранули глікогену розміщуються в базальних відділах під ядром клітин, результатом цього є розташування ядер в один ряд на одному рівні, в основному над вакуолями, що містять глікоген, який забарвлюється в червоний колір при фарбуванні за ШПК-реакцією (рис. 2).

Достовірно збільшена концентрація глікогену ( $0,365 \pm 0,013$ ,  $p \leq 0,05$ ) спостерігалася у третій групі. При зафарбовуванні за ШПК-реакцією на глікоген у цій групі виявляється інтенсивне червоне забарвлення з високою оптичною щільністю (табл. 1).

Дані щодо розподілу ГАГ у структурах ендометрію в обстежених жінок після донорства ооцитів подано в табл. 2. Дослідження сульфатованих і нессульфатованих ГАГ виявляє таку закономірність: метахроматичні фарбування у синюватий колір (рН 1,5) на наявність сульфатованих ГАГ трапляється в базальних мембранах ендотеліоцитів, у судинах стромі і базальній мембрані епітеліальних клітин залізистих структур, а також у стромі ендометрію у вигляді тонких, пофарбованих у синій колір ниток.

Вплив гіалуронідази зменшує сине забарвлення, що свідчить про наявність у досліджуваних структурах саме ГАГ. Присутність у базальній мембрані інтенсивного фарбування в синій колір дає змогу ідентифікувати нессульфатовані ГАГ (рН 3,5), оптична щільність яких трохи більша, ніж у сульфатованих ГАГ. Різний ступінь



Рис. 3. Нечисленні волокна сполучної тканини у стромі ендометрію. Строма компактна, з волокнами сполучної тканини (зафарб. за ван Гізоном,  $\times 200$ )



Рис. 4. Залози ендометрію розширені, круглястої форми, компактні. Ядра розташовані на одному рівні, строма набрякла (зафарб. за ван Гізоном,  $\times 200$ )

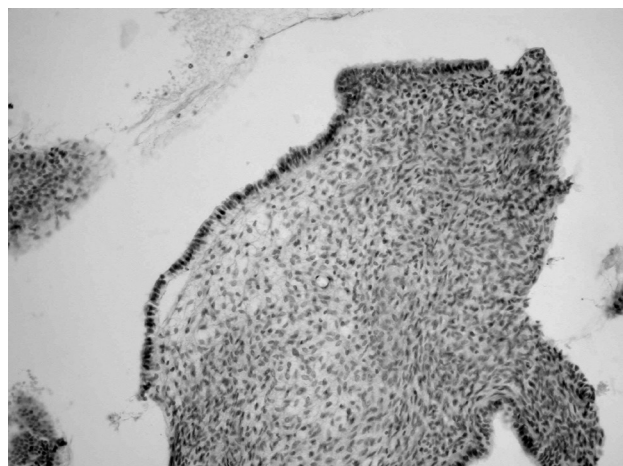


Рис. 5. Строма ендометрію жінки третьої групи. Клітини пухко розташовані, помірно виражений набряк (зафарб. за ван Гізоном,  $\times 200$ )

зафарбовування в синій колір підтверджується кількісною зміною оптичної щільності в умовних одиницях.

При дослідженні сульфатованих і нессульфатованих ГАГ у групах обстежених нами виявлено таку закономірність. Метахроматичне зафарбовування в бузковий колір (рН 1,5), яке пояснює наявність сульфатованих ГАГ, достовірно знижене в базальних мембранах епітеліальних клітин і ендотеліоцитів у стінках судин тільки у жінок третьої групи ( $0,221 \pm 0,009$ ,  $p \leq 0,05$ ). Поява у стромі ендометрію ділянок більш інтенсивного зафарбовування у синій колір дає змогу ідентифікувати нессульфатовані ГАГ (рН 3,5), оптична щільність яких достовірно менша, ніж у сульфатованих у другій групі спостереження —  $0,119 \pm 0,004$ ,  $p \leq 0,05$ .

Однак в усіх групах зберігається закономірність наявності сульфатованих або нессульфатованих ГАГ у базальних мембранах епітелію залізистих крипт і у стромі. Причому інтенсивність забарвлення значно більша при виявленні сульфатованих ГАГ із відповідною оптичною щільністю в умовних одиницях (табл. 2).

Аналізуючи отримані дані, слід зазначити, що найбільш виражена готовність ендометрію до імплантації бластоцисти відзначається у жінок третьої групи, де в якості підтримки ЛФ оваріально-менструального циклу використовувалось підшкірне введення високоочищеного прогестерону у поєднанні з його внутрішньопіхвовою формою — гелем 90 мг.

Трансформація ендометрію в цій групі відповідає 4–5-му дню після овуляції, що підтверджується змінами залізистих крипт із появою їх звислості та компактного розташування з відповідним зменшенням стромы, а також більшою кількістю децидуоподібних клітин. Одним із показників готовності ендометрію до імплантації ембріону

є наявність глікогену в цитоплазмі епітеліальних клітин залізистих крипт і його локалізація в епітелії. Глікоген на початку секреторної фази оваріально-менструального циклу утворюється у базальних відділах і поступово просувається до апікального краю. Надалі він виділяється у про-світ залоз, надходить до матки і забезпечує нідацію і розвиток заплідненої яйцеклітини в ендометрії.

При використанні дидрогестерону ендометрій злегка запізнюється у розвитку і відповідає 2–3-му дню після овуляції порівняно з використанням прогестерону у жінок третьої групи.

У деяких повідомленнях [11] є вказівки, що рання стадія секреції з характерною для неї субнуклеарною вакуолізацією виділяється у самостійну «постовуляторну фазу». Слід зазначити, що у кожній жінки можуть бути свої індивідуальні особливості трансформації ендометрію.

При аналізі реакції на ГАГ відбувається ніби стабілізація базальних мембран епітеліальних клітин у жінок третьої групи, що документується зменшенням концентрації сульфатованих ГАГ і відповідним збільшенням нессульфатованих. Існує точка зору, що сульфатовані ГАГ є компонентами мембран клітин, де вони можуть функціонувати як рецептори і брати участь у клітинних взаємодіях.

Таким чином, на підставі результатів проведеного порівняльного морфологічного і гістохімічного аналізу стану ендометрію після отримання ооцитів при різних схемах підтримки ЛФ можна зробити висновок, що найбільш виражена готовність ендометрію до імплантації бластоцисти відзначалася у донорів, яким в якості підтримки ЛФ оваріально-менструального циклу використовувалась високоочищений прогестерон для підшкірного введення у поєднанні з внутрішньопіхвовою формою прогестерону у вигляді гелю (90 мг).

#### Список літератури

1. Допоміжні репродуктивні технології лікування безпліддя: навч. посіб. / В. В. Каміньський, О. М. Юзько, Ф. В. Дахно [та ін.]; за заг. ред. Ф. В. Дахната та О. М. Юзька.— К.: ІДІР, 2011.— 338 с.
2. *Вартанян Э. В.* Роль сочетанной патологии в неудачных протоколах ЭКО / Э. В. Вартанян, Е. Ю. Мартышкина, К. А. Цатурова // Акушерство, гинекология и репродукция.— 2011.— № 4.— С. 40–43.
3. Сравнительное изучение эффективности протоколов поддерживающей терапии после переноса эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Д. П. Камилова, Т. В. Овсянникова, А. А. Феоктистов, Д. А. Давыдова // *Consilium Medicum*.— 2009.— № 1.— С. 49–52.
4. Применение «мягкого» протокола стимуляции супер-овуляции в программах вспомогательных репродуктивных технологий: эффективность и безопасность / Е. А. Калинина, М. В. Березикова, О. В. Бурменская, Л. А. Подрез // Акушерство и гинекология.— 2012.— № 4–2.— С. 51–56.
5. *Корнеева И. В.* Общая концепция диагностики и классификации форм бесплодия / И. В. Корнеева, Т. В. Лопатина // Бесплодный брак; под ред. В. И. Кулакова.— М.: ГЭОТАР Медиа, 2006.— С. 19–50.
6. *Краснопольская К. В.* Новые подходы к повышению эффективности ЭКО у женщин старшего репродуктивного возраста / К. В. Краснопольская, Д. И. Кабанова // Акушерство и гинекология.— 2010.— № 2.— С. 48–53.
7. Роль гестагенов в лечении бесплодия и невынашивания беременности / К. В. Краснопольская, О. С. Горская, Д. И. Кабанова, Е. В. Крстич // Акушерство и гинекология.— 2010.— № 2.— С. 21–23.
8. *Грищенко Н. Г.* Поддержка лютеиновой фазы в рамках вспомогательных репродуктивных технологий: теория и практика / Н. Г. Грищенко // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа.— 2015.— № 2 (38).— С. 1–3.
9. *Пирс Э.* Гистохимия / Э. Пирс.— М.: Изд-во иностр. лит., 1962.— 962 с.

10. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич.— К.: Морион, 2001.— 408 с.
11. Kotz J. The clinical interpretation of the endometrial biopsy: report of three hundred cases / J. Kotz, E. Parker // Endocrinology.— 1939.— Vol. 24, iss. 4.— P. 193–213.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И ГИСТОХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОМЕТРИЯ ПОСЛЕ ПОЛУЧЕНИЯ ООЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ ПОДДЕРЖКИ ЛЮТЕИНОВОЙ ФАЗЫ**

А. С. ЛУЦКИЙ, О. А. ОМЕЛЬЧЕНКО

Проанализированы результаты изучения морфологических и гистохимических изменений в эндометрии у женщин-доноров, у которых на пятые сутки после забора ооцитов использовались различные схемы поддержки лютеиновой фазы. Сделан вывод о том, что наиболее выраженная готовность эндометрия к имплантации бластоцисты отмечается у женщин, получивших высокоочищенный прогестерон для подкожного введения в сочетании с его внутривлагалищной формой в виде геля (90 мг).

*Ключевые слова:* эндометрий, экстракорпоральное оплодотворение, лютеиновая фаза, прогестерон.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL STATE OF THE ENDOMETRIUM AFTER OOCYTE ASPIRATION AT DIFFERENT LUTEAL PHASE SUPPORT SCHEMES**

A. S. LUTSKYI, O. A. OMELCHENKO

The results of the study of morphological and histochemical changes in the endometrium in female donors were analyzed after the use of different schemes of luteal phase support on the fifth day after oocyte aspiration. It was concluded that the most pronounced endometrial readiness to blastocyst implantation was observed in women receiving highly purified progesterone for subcutaneous administration in combination with its intravaginal form (gel, 90 mg).

*Key words:* endometrium, in vitro fertilization, luteal phase, progesterone.

Надійшла 26.12.2017