

Гулиева Залина Сайдовна

**ОСОБЕННОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ
НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ
ПРИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ
ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Иваново – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук

доктор медицинских наук, профессор

Герасимов Алексей Михайлович

Перетятко Любовь Петровна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии ИДПО ГБОУ ВПО «Воронежский ГМУ им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Енькова Елена Владимировна

доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС ГОУ ВПО «Кубанский ГМУ» Минздрава России

Карахалис Людмила Юрьевна

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.028.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 153045, г. Иваново, ул. Победы, д. 20.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В. Н. Городкова» Минздрава России, сайт: www.niimid.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук

Панова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из важнейших проблем акушерства и гинекологии является привычное невынашивание беременности (ПНБ) [В.Е.Радзинский с соавт., 2009; Е. В. Енькова с соавт., 2011], поскольку в 15–50% случаев клинически диагностированные беременности заканчиваются самопроизвольными выкидышами [Г.С. Богданова и соавт., 2012; С.И. Михалевич, 2012; М.С. Селихова и соавт., 2012; Н.Е. Канн и соавт., 2013]. Около 80% таких потерь приходится на ранние сроки, т.е. до 12 недель беременности. Частота привычного выкидыша в структуре невынашивания беременности составляет от 5 до 20% [Д.Ю. Айрапетов, 2012; Л.Ю. Карахалис, Н.В. Селина, 2013].

Причины, приводящие к ПНБ, чрезвычайно разнообразны [Е.В. Енькова и соавт., 2011; Л.Ю. Карахалис, Н.В. Селина, 2013]. Одной из причин развития ПНБ является нарушение формирования соединительной ткани [Г.Т. Сухих, 2010; Т.А. Демура и соавт., 2012; Н.Е. Канн и соавт., 2013]. Немногочисленными исследованиями показано влияние недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ) на формирование акушерско-гинекологической патологии, а также на течение беременности в поздние сроки, в частности на развитие таких осложнений, как недонашивание беременности и задержка роста плода [Л. М. Комисарова и соавт., 2012; Н. В. Керимкулова, 2013; А.В. Масленников и соавт., 2014]. При этом изменения в эндометрии на ранних сроках беременности при НДСТ до сих пор не изучены. В достаточной мере не исследовано влияние НДСТ на течение и исходы беременности [Ю. В. Ковалева, 2010; Е. В. Енькова и соавт., 2011], на ферментную активность эндометрия [О. А. Ефименко, 2014, М. А. Литневская, 2014], на изменение концентрации ионов магния в эндометрии [О. А. Громова, 2010].

До настоящего времени в публикациях отсутствуют данные о структурно-функциональных особенностях эндометрия при НДСТ у женщин,

беременность которых осложнилась ПНБ в ранние сроки. Исследователи относят НДСТ к системной патологии, при которой формируются различные аномалии на тканевом уровне [Т.Д. Боб, 2013; Л.Ю. Карахалис, М.Н. Могилина, 2014; Н.В. Ford, D.J. Schust, 2009; J.M. Ernest, P.V. Marshburn, W.H. Kutteh, 2011]. Логично предположить, что эндометрий также реагирует определенными изменениями при НДСТ. Перечисленные нерешенные вопросы явились предметом проведенного настоящего исследования.

Цель исследования – на основании изучения биохимических и структурно-функциональных особенностей эндометрия установить новые патогенетические механизмы привычного невынашивания беременности у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани, на основании чего разработать диагностические критерии данной патологии.

Задачи научного исследования

1. Дать оценку состояния репродуктивного и соматического здоровья пациенток с привычным невынашиванием беременности ранних сроков в анамнезе, имеющих недифференцированную дисплазию соединительной ткани.
2. Выявить особенности содержания магния и уровня фибринолитической активности периферической венозной крови и эндометрия у женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани.
3. Установить структурно-функциональные особенности эндометрия у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани на основании изучения общей морфологии, экспрессии виментина, коллагена IV типа, металлопротеиназ 9 типа и ингибитора металлопротеиназ в эндометриальных фрагментах спиральных артерий, базальных мембранах и строме слизистой матки.
4. На основании анализа полученных данных разработать новые диагностические критерии недифференцированной дисплазии

соединительной ткани у женщин с привычным невынашиванием беременности.

Научная новизна исследования

Установлено, что привычное невынашивание беременности у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани сочетается с повышением содержания магния в эндометрии и снижением фибринолитической активности эндометрия, которые не зависят от степени выраженности заболевания.

Показано, что для женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани характерны особенности эндометрия, проявляющиеся на тканевом уровне несоответствием его структуры фазе менструального цикла с гипоплазией сосудов, нарушениями спирализации гипоплазированных спиральных артерий и соотношениями мышечного и стромального компонентов в их стенках с мускулинизацией и стенозом, незавершенным ремоделированием эндометриальных фрагментов сосудов, отставанием дифференцировки и нарушением трансформации фибробластоподобных клеток в прецедуальные на фоне гиповаскуляризации стромы.

Впервые показано, что для женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани характерно увеличение экспрессии металлопротеиназы 9-го типа в стромальных клетках эндометрия наряду с количественным снижением содержания коллагена IV типа в спиральных артериях, базальных мембранах капилляров и железистых структур, а также увеличение экспрессии ингибитора металлопротеиназ в эпителиальных структурах эндометриальных желез, клеток стромы и сосудистом эндотелии.

Практическая значимость исследования

Разработаны новые диагностические критерии недифференцированной дисплазии соединительной ткани у женщин с привычным невынашиванием беременности, связанные с определением уровня фибринолитической

активности эндометрия (патент № 2013116097 от 09.04.2013 г.), содержания магния в эндометрии, уровня экспрессии в стромальных клетках металлопротеиназы 9-го типа, ингибитора металлопротеиназ, в эндотелии артерий и артериол эндометрия – ингибитора металлопротеиназ.

Положения, выносимые на защиту

Привычное невынашивание беременности у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани ассоциируется с нарушениями биохимических и структурно-функциональных изменений эндометрия проявляющимися повышением уровня магния, угнетением фибринолитической активности, уменьшением его васкуляризации, несоответствием фазе менструального цикла, дезорганизацией соединительной ткани (снижением содержания коллагена IV типа), повышением экспрессии металлопротеиназы 9-го типа, ингибитора коллагеназы I типа.

Определение содержания фибринолитической активности эндометрия у женщин с привычным невынашиванием беременности позволяет диагностировать недифференцированную дисплазию соединительной ткани.

Внедрение результатов в практику

Для применения в клинической практике разработан «Способ диагностики недифференцированной дисплазии соединительной ткани у женщин с потерей беременности в анамнезе» (патент № 2013116097 от 09.04.2013 г.), который прошёл предрегистрационное испытание в гинекологической клинике ФГБУ «Ив НИИ М и Д имени В. Н. Городкова» Минздрава России.

Предложены дополнительные критерии диагностики недифференцированной дисплазии соединительной ткани у женщин с привычным невынашиванием беременности.

Личное участие автора

Автором самостоятельно проводились отбор пациенток в группы, их клиническое обследование и лечение; статистико-математическая обработка

полученных данных, анализ и описание полученных результатов; сформулированы выводы и практические рекомендации.

Апробация работы

Основные результаты исследования докладывались на: XII Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2011), XXV Международном конгрессе с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний» (Москва, 2012), 92-й ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Неделя науки – 2012» в рамках областного фестиваля «Молодые ученые – развитию Ивановской области» (Иваново, 2012), научной практической конференции «Репродуктивное здоровье – здоровье будущего поколения» (Ижевск, 2012), научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Неделя науки – 2013» в рамках областного фестиваля «Молодые ученые – развитию Ивановской области» (Иваново, 2013), монотематической конференции по диспластико-ассоциированным состояниям в рамках «Недели науки» (Иваново, 2013, 2014), XV Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2014).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикаций научных результатов диссертаций.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации. Список литературы включает 208 источников, в том числе 155 отечественных и 53 зарубежных. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 39 рисунками.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ (директор — доктор медицинских наук

А. И. Малышкина). Под наблюдением находилось 160 женщин, объединенных в 2 клинические группы: контрольная (n=30) – пациентки, обратившиеся по поводу подбора метода контрацепции, без репродуктивных потерь и НДСТ в анамнезе. Вторая группа женщины с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) ранних сроков (n=130) в анамнезе, разделенная на две подгруппы: с привычным невынашиванием беременности ранних сроков в анамнезе и НДСТ – основная подгруппа (n=73) и с привычным невынашиванием беременности ранних сроков в анамнезе без НДСТ – подгруппа сравнения (n=57). При поступлении в клинику проводилось однократное обследование женщин. Эндометрий на исследование забирали на 23-26 дни менструального цикла методом пайпель – биопсии.

Клинические проявления НДСТ у пациенток оценивали профильные специалисты (терапевты, ортопеды, хирурги, стоматологи, офтальмологи, лор-врачи), которые сопоставляли результаты клинического осмотра с данными антропометрического исследования, а также дополнительными сведениями, полученными при инструментальном обследовании, рентгенографии и УЗИ. Дополнительно выявляли стигмы дизэмбриогенеза со стороны костной, соединительно-тканной, мышечной тканей. Для оценки степеней НДСТ использовали критерии, положенные в основу классификации Милковской-Димитровой Т. и Каркашева А. (1987).

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь и биоптаты эндометрия.

Биохимическое исследование уровня магния в сыворотке периферической крови проводилось на биохимическом анализаторе «SAPPIRE 400» реактивами фирмы «Biolabo» (France). Концентрацию ионов магния в эндометрии исследовали методом мокрого озоления в концентрированной азотной кислоте [О.Л. Воскресенская, с соавт., 2006], колориметрическим способом на аппарате «Micro Vitalab» фирмы «Merck.» Расчёт содержания магния в тканях производили по формуле: $x=(c/m)u$, где x – содержание магния в 1 мг ткани, c – полученная

концентрация магния в рабочем растворе, m – масса биоптата эндометрия, y – коэффициент, соответствующий массе биоптата, в котором требуется рассчитать содержание магния.

Фибринолитическая активность (ФА) в плазме периферической крови определялась стандартным лабораторно-клиническим методом, в биоптатах эндометрия методом фибриновых пластинок [Л.В. Подорольская и соавт., 2010, Ю.В. Данилова и соавт, 2012].

Морфологическое исследование эндометрия, осуществляли с помощью гистологических обзорных, элективных, иммуногистохимических и электроно-микроскопических методик. Нативный материал после заключения в различные фиксаторы (10% кислый и 10% нейтральный формалин, фиксатор Караганова) и этапов стандартной проводки доводили до парафиновых блоков, с которых готовили срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали их и изучали под микроскопом MICROS (Австрия).

Экспрессию COLL-IV, MMP-9, TIMP-1 и виментина в срезах исследовали иммуногистохимическими (ИГХ) методами, с соблюдением этапов демаскировки антигена и блокировки эндогенной пероксидазы 1% раствором H₂O₂. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышьиные антитела к TIMP-1 (anti-TIMP-1, клон VT7, Dako, рабочее разведение 1:50), к виментину (anti-Vimentin, клон Vim 3B4, Dako, рабочее разведение 1:100), к COLL-IV (anti-Collagen IV, клон CIV 22, Dako, рабочее разведение 1:40). Согласно протокола производителя, комплекс антиген-антитело визуализировали стрептавидин-биотин пероксидазным методом, с помощью системы детекции LSAB2 System, HRP («ДАКО», Германия). Контроль неспецифического окрашивания осуществляли замещением первичных антител 0,1% раствором бычьего сывороточного альбумина, с исключением вторичных антител. Результаты ИГХ реакции оценивали в 100 клетках, в 10 полях зрения микроскопа при увеличении $\times 400$. Индекс экспрессии (ИЭ) факторов рассчитывали по формуле: $ИЭ = \sum P(i) \cdot i / 100$, где i – интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3; $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Структурные изменения в полутонких срезах эндометрия, окрашенных метиленом-азурII-фуксином, изучали в микроскопе MICROS (Австрия), ультратонкие срезы - в ТЭМ (ЭВМ-100АК).

Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ проводили в рамках пакета прикладных лицензионных программ «Statistica 6.0», «Microsoft Office 2007», «GenStat» и «Open Epi». При нормальном распределении признаков достоверность определяли по t-критерию Стьюдента, при отклонениях от нормального распределения использовали критерии Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни, при малых выборках критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Дополнительно использовали парный критерий Вилкоксона и Хи-квадрат. Для оценки клинической значимости биохимических и морфологических показателей применяли интерактивные диаграммы и ROC-анализ с использованием программы «MedCalc».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возраст обследованных пациенток составил от 18 до 43 лет. Средний возраст женщин контрольной группы составил - $31,9 \pm 1,2$ лет, в группе с ПНБ - $30,7 \pm 0,48$ лет, в подгруппе сравнения - $29,21 \pm 0,74$ лет, в основной подгруппе - $31,9 \pm 0,6$ лет ($p > 0,05$).

У обследованных женщин выявлены следующие особенности становления менструальной функции. В группе женщин с ПНБ достоверно чаще, чем в контрольной имело место позднее становление менструальной функции - 16,15% и 3,3% соответственно ($p < 0,01$), преимущественно за счёт основной подгруппы – 19,17% ($p < 0,01$). В подгруппе сравнения частота позднего menarche составила – 12,28% ($p > 0,05$). У женщин с ПНБ достоверно чаще, чем в контрольной группе встречалось вторичное бесплодие (41,09%; $p < 0,05$), хронический эндометрит (54,6%; $p < 0,001$), миома матки (9,23%; $p < 0,01$), сочетанная (ВПГ2 - U. urealyticum или ВПГ2 - M. hominis; $p < 0,01$), а также хламидийная и цитомегаловирусная инфекция ($p < 0,05$).

Анализ экстрагенитальной патологии показал, что у женщин с ПНБ и НДСТ достоверно чаще, чем в контрольной группе и подгруппе с ПНБ без НДСТ

встречалась артериальная гипертензия - 13,69% ($p < 0,01$ в обоих случаях) рефлюксная болезнь - 6,8% ($p < 0,05$ в обоих случаях), бронхиальная астма - 5,48% ($p < 0,05$ в обоих случаях). Женщины с ПНБ и НДСТ чаще болели ОРВИ (42,5%; $p < 0,01$ к контролю, $p < 0,01$ к подгруппе с ПНБ без НДСТ) и имелиотягощенный аллергологический анамнез (46,57%; $p < 0,001$ к контролю, $p < 0,001$ к подгруппе с ПНБ без НДСТ).

Основными признаками НДСТ у женщин с ПНБ являлись: деформация позвоночника (71,2% случаев), миопия (57,5%), патология стопы (53,4%), вывихи суставов (30,1%), гиперрастяжимость кожи (34,2%) и варикозное расширение вен нижних конечностей (31,5%). Совокупность признаков диспластического статуса у пациенток позволила диагностировать следующие степени тяжести НДСТ: в 47,9% случаев - легкую, в 42,6% - среднюю и 9,5% - тяжёлую степени.

Особый интерес при изучении проблемы ПНБ у женщин с НДСТ вызывает эндометрий, представляющий собой регулярно обновляющуюся субстанцию, основу которой составляет соединительная ткань и железистый компонент. От структурно-функциональных изменений эндометрия, происходящих до беременности, в периоды nidации, имплантации и плацентации, зависит исход беременности.

Активную роль в процессах nidации и миграции оплодотворенной яйцеклетки играют факторы адгезии и инвазии, одним из которых является фибринолиз [Е.В. Волкова, Ю.В. Копылова, 2013; О.А. Ефименко, 2014]. Одним из основных показателей, характеризующих состояние фибринолиза, является фибринолитическая активность (ФА). ФА свойственна физиологическому или «нормальному» эндометрию [В.Н.Чернуха, 2002; С.М. Баймурадова, 2006; О.А. Ефименко, 2014]. Фибринолиз играет важную роль в процессах подготовки эндометрия к nidации blastоциты, васкуляризации формирующихся ворсин, секреторной трансформации и десквамации слизистой оболочки полости матки [С.М. Баймурадова, 2006; М.А. Литневская, 2014]. Исходя из значимости ФА на ранних этапах беременности, нами изучены показатели фибринолиза эндометрия. Средний показатель ФА в эндометрии

женщин контрольной группы, составил 47,1 мм² [28,26 - 63,60 мм²], с индивидуальными колебаниями значений от 28,26 мм² до 626,4 мм². У пациенток с ПНБ показатель ФА эндометрия был достоверно ниже, чем в контрольной группе и составил 23,55 мм² [12,56–50,24 мм²] (p<0,02) с колебаниями от 7,06 мм² до 94,2 мм². В подгруппе женщин с ПНБ без НДСТ показатель ФА достоверно не отличался от контрольной группы и составил 56,5 мм² [32,97–78,10 мм²] (p>0,05) с колебаниями от 23,55 мм² до 94,2 мм². У женщин с ПНБ и НДСТ ФА эндометрия составила 15,7 мм² [9,42–19,62 мм²] с колебаниями в пределах от 7,06 до 28,26 мм, что достоверно ниже аналогичных показателей групп контроля (p<0,001) и подгруппы с ПНБ без НДСТ (p<0,001)

Уровень ФА плазмы крови пациенток в исследуемых группах не имел достоверных различий (p>0,05).

На основании полученных результатов разработан способ диагностики НДСТ у пациенток с потерей беременности в анамнезе, основанный на том, что у женщины в субстрате биоптата эндометрия методом фибриновых пластинок определяют ФА и при значениях ниже 23,55 мм² диагностируется НДСТ с точностью 92,6%, чувствительностью 82,9%, специфичностью 88,0% (патент № 2013116097).

Снижение ФА в эндометрии у женщин основной подгруппы с НДСТ можно рассматривать как один из механизмов патогенеза ПНБ. Фибринолиз на местном уровне, наряду с цитокинами и факторами роста, является одним из регуляторов ангиогенеза и активности металлопротеиназ, образования тромбина, с одновременным контролем избыточного тромбообразования и объёма кровопотери при менструации [Н. В. Александрова, О. Р. Баев, 2011]. Нарушение процессов фибринолиза с последующим образованием неполноценных полнокровных лакун может привести к аномалиям формирования ворсинчатого хориона и децидуальной оболочки, повышенному тромбообразованию, неполноценной инвазии цитотрофобласта и потерям беременности.

Вероятно, что при НДСТ на фоне нарушенного фибринолиза в эндометрии реализуется тромбофилия, оказывающая влияние на первую волну инвазии цитотрофобласта, которая обеспечивает дальнейшее развитие беременности. Нарушения в системе гемокоагуляции с гемореологической диспропорцией из-за низкого уровня ФА приводит к развитию прогрессирующего обтурирующего тромбоза устьев плацентарных артерий цитотрофобластическими «пробками» [Н. В. Александрова, О. Р. Баев, 2011]. Повышенное тромбообразование в зоне nidации бластоцисты и формирования плаценты приводит к нарушению nidации и плацентогенеза, результатом которых является отторжение плодного яйца. Скорее всего, причиной экспульсии плодного яйца является нарушение процессов фибринолиза, проявляющееся резким снижением ФА.

Важным показателем, характеризующим состояние соединительной ткани при НДСТ, является концентрация ионов магния в сыворотке крови. Макроионы магния принимают участие в биохимических реакциях организма и в формировании полноценной соединительной ткани [О.А.Громова, 2008; А.М.Шилов с соавт., 2011]. Не случайно исследователи отводят основную роль в формировании НДСТ дефициту магния [О.А. Громова, 2008; З.С. Ходжаева, С.Р. Гурбанова, 2009; А.М. Шилов, М.В. Мельник, А.Ю. Свиридова, 2011].

При анализе содержания магния в сыворотке крови у пациенток исследуемых групп не выявлено достоверной разницы ($p > 0,05$). Исследование магния в эндометрии показало, что его средняя концентрация в контрольной группе составила 0,012 моль/л. [0,004–0,030], с индивидуальными колебаниями значений от 0,002 до 0,06 моль/л. У женщин с ПНБ, уровень магния в эндометрии был достоверно увеличен и достигал $0,03 \pm$ моль/л [0,009–0,077], ($p < 0,05$). Индивидуальные колебания составили от 0,004 до 0,24 моль/л. При этом уровень ионов магния у пациенток с ПНБ без НДСТ был сопоставим с таковым контрольной группы: 0,02 моль/л [0,008–0,040], ($p > 0,05$), индивидуальные показатели колебались в диапазоне от 0,004 до 0,210 моль/л. В подгруппе пациенток с ПНБ и НДСТ показатель концентрации магния в эндометрии достоверно превосходил аналогичный показатель группы контроля и

составил в среднем 0,04 моль/л [0,012–0,080], ($p < 0,05$), с колебаниями от 0,007 до 0,24 моль/л.

С дефицитом магния в периферической крови у пациенток с НДСТ связывают формирование плацентарной недостаточности и таких осложнений беременности, как преэклампсия, синдром задержки роста плода и преждевременное развитие родовой деятельности [Л. М. Комиссарова, А. Н. Карачаева, М. И. Кесова, 2012; Н. Е. Кан и соавт., 2013]. Исследования концентрации магния в данных работах проводились в эритроцитах. Однако при этом следует учитывать, что магния в эритроцитах от общего количества в организме содержится всего 0,5% [Громова, О. А., Серов В. Н., Торшин И. Ю. 2008, Рычкова, Т.И. 2011]. Известен факт так называемой секвестрации магния в эстрогензависимых органах и тканях, таких как матка и костная ткань [Дадак, К., 2013]. По-видимому, при ПНБ с НДСТ, сопровождающейся дефицитом магния, в условиях особенностей обмена эстрогенов и общего дефицита иона, происходит его накопление в тканях матки [Громова, О. А. 2006].

Морфологическое исследование эндометрия от пациенток с ПНБ выявило существенные отличия, по сравнению с группой контроля. В эндометрии большей части женщин с ПНБ без НДСТ и у пациенток с ПНБ на фоне НДСТ выявлено несоответствие структуры слизистой матки дню менструального цикла. Так у женщин с ПНБ без НДСТ, структура эндометрия соответствовала дню менструального цикла лишь 27,5%, у пациенток с ПНБ и НДСТ в 10,9% ($p < 0,05$ в обоих случаях). В 72,5% и 89,1% случаев, соответственно исследуемым группам, морфологическая картина эндометрия соответствовала фазе пролиферации. В эндометрии 32,5% женщин с ПНБ без НДСТ и в 41,8% случаев у пациенток с ПНБ и НДСТ диагностировано отставание секреторной трансформации и перехода эндометрия в стадию секреции ($p > 0,05$). Кроме этого, у 10% пациенток из подгруппы с ПНБ без НДСТ и у 12,7% женщин подгруппы с ПНБ на фоне НДСТ в эндометрии установлена секреторная недостаточность. Причём, в 5,0% наблюдений у женщин подгруппы сравнения и в 25,4% ($p < 0,01$) наблюдений у женщин основной подгруппы, согласно

морфологической характеристике, эндометрий соответствовал средней стадии секреции. Эндометрий ранней стадии секреции диагностирован в 27,5% случаев у пациенток подгруппы сравнения и в 16,4% случаев у женщин основной подгруппы.

Несмотря на относительно сопоставимую частоту выявления несоответствия трансформации эндометрия дню менструального цикла, у женщин с ПНБ и НДСТ структурные изменения носили более выраженный характер. С морфологических позиций они проявлялись отставанием трансформации стромы с замедлением формирования отёка.

Отёк стромы в среднюю стадию фазы секреции связан с повышением секреции «жёлтым» телом эстрадиола в среднюю стадию лютеиновой фазы [Е. М. Вихляева, 2006; Н. И. Кондриков, 2008; Э. А. Овчарук, 2013]. Отставание трансформации стромы от соответствующей стадии с уменьшением выраженности и распространения отёка можно объяснить неадекватной секрецией эстрадиола, либо снижением чувствительности рецепторов эндометрия к эстрогенам. Формирование отёка в стромальном компоненте эндометрия осуществляется за счёт ряда механизмов: усиления сосудистой проницаемости и перехода основного вещества из золя в гель [Е. М. Вихляева, 2006; Н. И. Кондриков, 2008; Э. А.]. Определенный вклад в нарушение трансформации стромы вносит повышение содержания ионов магния в эндометрии у женщин с НДСТ. Нарушение баланса ионных взаимоотношений оказывает влияние на трансформацию межклеточного матрикса и переход основного вещества соединительной ткани в гелеобразное состояние. В результате выраженного уменьшения отёка сближаются стромальный и железистый компоненты слизистой оболочки полости матки.

По нашим данным, в эндометрии женщин с ПНБ и НДСТ существенно замедлена трансформация фибробластоподобных клеток стромы в предецидуальные, за счет формирования промежуточных форм. Клеткам стромы в эндометрии отводится главная роль в поддержании физиологического морфофункционального потенциала слизистой. Клетки стромы в эндометрии

осуществляют трофическую функцию, за счет секреции различных биологически активных субстанций, регулируют размножение клеток в железистом компоненте слизистой оболочки [Е. М. Вихляева, 2006; Н. И. Кондриков, 2008].

Замедленная и неполноценная трансформация фибробластоподобных клеток у женщин с ПНБ и НДСТ сопряжена с отставанием структурных изменений и в железистом компоненте. Железы в стадию секреции недостаточно извиты с умеренно расширенными просветами, что свидетельствует не только о неадекватной реакции рецепторов к половым стероидам, но и о недостаточной секреторной активности железистых клеток.

Неполноценной трансформацией клеток стромы у пациенток с ПНБ и НДСТ можно объяснить ранее изложенное снижение фибринолитической активности в эндометрии, поскольку фибробластоподобные клетки являются основным источником синтеза протеиновых субстанций [Е. М. Вихляева 2006]. При проведении электронной микроскопии эндометрия женщин с ПНБ и НДСТ выявлено изменение структуры и нарушение соотношения всех компонентов стромы, наряду с задержкой последовательной трансформации фибробластоподобных клеток в прецидуальные, проявившиеся в неравномерности внутриклеточных преобразований. Структура клеток стромы в секреторную стадию цикла вариабельна, встречались клетки с гиперхромией ядер и несколькими ядрышками наряду с клетками, имеющими эухромные ядра. Преобразования ядер сопровождалось деструктивными изменениями органелл, особенно гранулярного ретикулума, с дегрануляцией и фрагментацией его мембран. Промежуточные клетки стромы приобретали различную, порой причудливую форму, за счёт образования нуклеолеммой многочисленных инвагинатов. Общеизвестно, что цитоплазматический ретикулум синтезирует биологически активные субстраты, продуцируемые клетками [Е. М. Вихляева 2006; Н. А. Лифарева 2011]. Деструкция цитоплазматического ретикулума при НДСТ определяла снижение синтеза белков и, следовательно, его неадекватную трансформацию фибробластоподобных клеток стромы и железистого эпителия с

нарушением деления клеток и увеличением количества клеток, находящихся в состоянии амитоза. За счет денуклеитизации и лизиса ядер и последующего некроза и элиминации цитоплазмы в секреторном эндометрии уменьшалось количество функционирующих клеток стромы. В сохранившихся стромальных клетках визуализировались или фрагменты ядерной субстанции, либо скопления органелл. Цитоплазма прецидуальных клеток при некрозе органелл гомогенизировалась, появлялись вакуолеподобные структуры, усиливались везикулообразование, микроклязматоз и клязматоз.

Гипоактивность плазминовой системы, о чём свидетельствует угнетение ФА, сказывается на формировании сосудов эндометрия, поскольку плазмин, определяющий активность фибринолиза, является одним из основных ангиогенных факторов [Н. В. Александрова, О. Р. Баев 2011]. По нашим данным у женщин с ПНБ и НДСТ установлено нарушение васкуляризации эндометрия, обусловленное гипоплазией вертикальных сосудистых ветвей с уменьшением их количества в поперечных срезах до 1-2-х сосудов. Горизонтальные ветви спиральных артерий находились в состоянии замедленной спирализации, поскольку формируют мелкие сосудистые скопления с уменьшением не только количества сосудов в «сосудистых клубках», но и самих «клубков». За счёт гипоплазии или очаговой аплазии стромально-мышечного компонента в стенке артериол, сосуды были тонкие и дилатированные. При электронной микроскопии капилляры дистальных отделов эндометрия имели некротизированный эндотелий, проявления кариопикноза и деструкцию органелл с последующими плазморексисом или плазмолизисом. Эритроциты, расположенные в капиллярах, имели аномальные формы за счет нестабильности мембран, контактировали с немногочисленными сохранившимися уплощенными клетками эндотелия, цитоплазма в которых была вакуолизирована, а мембраны органелл в состоянии клязматоза. По мере прогрессирующей деструкции эндотелиоцитов капилляры заустевали и редуцировались, а прилежащие к сосудам клетки стромы подвергались апоптозу. Выявленные структурные изменения в сосудистом русле приводят к нарушению адекватной перфузии

эндометрия кровью и гипоксии, которые, в свою очередь, способствуют отклонениям от физиологической трансформации эндометрия.

Установлено опосредованное влияние фибробластов, через продукты своей секреции, к которым относятся коллаген, эластин, протеогликаны и гликопротеины на эпителиальные клетки [Н. А. Лифарева, 2011; А. В. Говорин, Е. В. Рацина, Н. А. Соколова, 2014]. Согласно нашим данным, трансформация фибробластоподобных клеток эндометрия у пациенток с НДСТ замедляется, что доказано обзорными и элективными (PAS-реакция) методами исследования. В структурах эндометрия женщин с ПНБ и НДСТ в стадию секреции выявлено снижение PAS-позитивной реакции, свидетельствующее о резком уменьшении нейтральных мукополисахаридов (НМПС) в базальных мембранах железистого эпителия, в сосудах, а также, находящегося в просвете желез секрета. Одновременно количество НМПС в строме эндометрия увеличивается, при сопоставлении с таковыми в эндометрии у пациенток без НДСТ. Следовательно, при НДСТ существует диспропорция в распределении НМПС, свидетельствующая о нарушениях обменных процессов в тканях эндометрия, влияющих на железистый компонент слизистой матки у женщин с НДСТ.

В изучаемых структурах эндометрия женщин с ПНБ и НДСТ установлено количественное уменьшение COLL IV типа, по сравнению с пациентками с ПНБ, без НДСТ. Так у женщин с ПНБ и НДСТ экспрессия COLL IV типа в спиральных артериях, капиллярах и железах выявлена лишь в 12,5% случаев, тогда как у пациенток с ПНБ без НДСТ экспрессия фактора установлена у 56,2% женщин ($p < 0,01$). В 50,0% случаев у пациенток с НДСТ коллаген IV-позитивные структуры представлены тонкими и прерывистыми волокнами в стенках спиральных артерий эндометрия. Такого же рода волокна COLL IV типа в 25,0% наблюдений локализовались в базальных мембранах эпителия эндометриальных желез, тогда как стенки спиральных артерий и капилляров оставались иммунонегативными. У 12,5% пациенток с ПНБ и НДСТ COLL IV -позитивные структуры в каких-либо структурах эндометрия не выявлялись. Электронно-микроскопическое исследование установило кроме уменьшения

коллагеновых волокон, вплоть до полного их отсутствия, аномальную структуру волокон. Резкое уменьшение экспрессии COLL IV позитивных структур в эндометрии женщин с НДСТ обусловлено нарушением трансформации фибробластоподобных клеток и соответственно снижением синтеза коллагена [А. В. Говорин, Е. В. Рацина, Н. А. Соколова, 2014], а также повышением активности MMP-9, регулирующей формирование коллагена [Е. В. Енькова, 2009].

Согласно результатам проведенного ИГХ исследования установлено, что у женщин с ПНБ и НДСТ уровень экспрессии MMP-9 в клетках стромы эндометрия достоверно выше 280 [260-290] усл.ед., чем в подгруппе пациенток с ПНБ без НДСТ. В последней показатель экспрессии MMP-9 в клетках стромы эндометрия составил 230 [210-260] усл.ед. ($p < 0,001$). MMP-9 относится к ферментам широкого спектра действия. Субстратами для MMP-9 кроме коллагена, являются желатин, эластины, фибронектин, некоторые интерлейкины и плазмин [А. В. Говорин, Е. В. Рацина, Н. А. Соколова, 2014], активность которого в эндометрии у женщин с НДСТ также снижена. Вероятно, плазмин изначально, активирует MMP-9 [И. В. Воронкина и соавт, 2014], которая начинает инактивировать предшественник плазмينا - плазиноген, являющийся субстратом для MMP-9 [А. В. Говорин, Е. В. Рацина, Н. А. Соколова, 2014].

Результатом последовательных влияний MMP-9, является снижение ФА эндометрия, с вторичным повышением активности TIMP-I в слизистой матки у женщин с ПНБ и НДСТ. По нашим данным, индекс экспрессии TIMP-1 в цитоплазме стромальных клеток и строме подгруппы с ПНБ и НДСТ, составляющий 235 [210-245] усл.ед., достоверно превышал аналогичный показатель подгруппы с ПНБ без НДСТ, в которой он составил 150 [120-210] усл.ед. ($p < 0,01$). В эндотелии спиральных артерий эндометрия женщин с ПНБ и НДСТ индекс экспрессии TIMP-1 составил 200 [175-210] усл.ед. Полученный показатель, достоверно превышал ИЭ TIMP-1 в эндотелии эндометриальных артерий у пациенток с ПНБ и без НДСТ, который равен 140 [110-160] усл.ед., ($p < 0,01$).

Сопряженное увеличение MMP-9 и TIMP-1 приводит к нарушению синтеза коллагена в эндометрии у женщин с НДСТ. Не исключено, что параллельное увеличение экспрессии MMP-9 и TIMP-1, является одной из причин нарушенной инвазии цитотрофобласта в период первой волны. Согласно литературным данным, одну из ключевых ролей в инвазии цитотрофобласта играет MMP-9, контролирующая глубину инвазии клеток [И. М. Расстригина, 2014]. По-видимому, при наступлении беременности в условиях повышенного синтеза и активности TIMP-1 ингибируется MMP-9, отклонения в синтезе которой приводит к нарушению процессов инвазии цитотрофобласта.

Проведение ROC – анализа позволило выявить наиболее информативные показатели, которые предложены в качестве дополнительных диагностических критериев НДСТ у женщин с ПНБ (Таблица 1).

Таблица 1

Диагностические критерии недифференцированной дисплазии соединительной ткани у женщин с привычным невынашиванием беременности

Диагностические показатели	Значения показателей (усл.ед.)	Точность метода %	Чувствительность %	Специфичность %	Площадь под ROC кривой
ФА в эндометрии	$\leq 23,5$	92,4	82,9	88	0,978
Магний в эндометрии	$>0,035$	69,3	53,1	93,3	0,784
MMP – 9 в стромальных клетках эндометрия	$>240,0$	80,6	93,7	66,7	0,896
TIMP-1 в стромальных клетках эндометрия	$>200,0$	74,2	81,2	73,3	0,806
TIMP -1 в эндотелии артерий и артериол эндометрия	$>160,0$	70,9	81,2	80,0	0,810

Так в эндометрии, фибринолитическая активность менее 23,5%, концентрация магния более 0,035 моль/л, экспрессия в клетках стромы эндометрия MMP – 9 $>240,0$ усл.ед. и TIMP–1 $>200,0$ усл.ед., а также экспрессия

ТМР-1 в эндотелии артерий и артериол эндометрия $>160,0$ усл.ед., могут свидетельствовать о наличии у женщин с ПНБ НДСТ.

Таким образом, на основании проведенного исследования установлено, что одним из патогенетических механизмов привычного невынашивания беременности у пациенток с НДСТ является гипоестрогения, приводящая к повышению магния и снижению ФА в эндометрии, с развитием дисбаланса в системе MMP-9 - ТМР-1, сочетающиеся со структурными изменениям в эндометрии, проявляющимися несоответствием морфологии фазе и стадии менструального цикла, нарушениями ангиогенеза и синтеза коллагена, отставанием дифференцировки и трансформации фибробластоподобных клеток.

ВЫВОДЫ.

1. В анамнезе пациенток с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани достоверно чаще встречаются артериальная гипертензия, бронхиальная астма, рефлюксная болезнь, отягощенный аллергологический анамнез, частые острые респираторные вирусные инфекции.
2. У женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани достоверно снижена фибринолитическая активность в эндометрии, по сравнению с пациентками без недифференцированной дисплазии соединительной ткани, имеющими привычное невынашивание беременности в анамнезе, и с исследуемыми контрольной группы.
3. Для женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани характерно повышение уровня магния в эндометрии, тогда как у женщин с привычным невынашиванием беременности без недифференцированной дисплазии соединительной ткани этот показатель не имеет существенных отличий от такового у здоровых фертильных женщин.
4. При привычном невынашиванием беременности у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани структура

эндометрия достоверно чаще не соответствует лютеиновой фазе менструального цикла, что проявляется гипоплазией вертикальных ветвей радиальных артерий, уменьшением спирализации горизонтальных ветвей с мускулинизацией сосудистых стенок и их стенозированием, незавершенной трансформацией эндометриальных фрагментов спиральных артерий, а также отставанием дифференцировки и трансформации фибробластоподобных клеток в промежуточные эпителиодного типа и предецидуальные.

5. В эндометрии женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани выявлено: увеличение экспрессии металлопротеиназ 9-го типа в стромальных клетках эндометрия; увеличение экспрессии ингибитора металлопротеиназ 1 типа в стромальных клетках, в эндотелии артерий и артериол эндометрия; снижение количества коллагена IV типа в мышечно-эластическом компоненте и в базальных мембранах эндометриальных сосудов, в базальных мембранах желёз и стромальных структурах слизистой оболочки тела матки.
6. При электронной микроскопии компонентов соединительной ткани эндометрия у пациенток с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани установлены неупорядоченная локализация коллагеновых волокон, количественная вариабельность в группах, фрагментация и укорочение предшественников волокон. В клетках стромы выявлены деструкция ультраструктур, кариопикноз, кариорексис, микроклазматоз и клазматоз мембран.
7. Установлен показатель фибринолитической активности в эндометрии позволяющий диагностировать недифференцированную дисплазию соединительной ткани при значениях менее 23,5 мм² с точностью 92,6%.

Практические рекомендации

1. Для диагностики недифференцированной дисплазии соединительной ткани, у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе, рекомендуется использовать такие дополнительные биохимические и структурно-функциональные показатели эндометрия, как: уровень фибринолитической активности в эндометрии менее 23,5 мм² (точность метода – 92,4%), содержание магния в эндометрии более 0,035 моль/л (точность метода – 69,3%), уровень экспрессии в стромальных клетках эндометрия металлопротеиназы 9-го типа более 240,0 усл. ед. (точность метода – 80,6%), ингибитора металлопротеиназ 1 типа более 200,0 усл. ед. (точность метода – 74,2%), уровень экспрессии ингибитора металлопротеиназ 1 типа в эндотелии артерий и артериол эндометрия более 160,0 усл. ед. (точность метода – 70,9%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. **Гулиева, З. С.** Недифференцированная дисплазия соединительной ткани как фактор риска развития невынашивания беременности в ранние сроки / **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2013. – Т. 18, № 2. – С. 39–41.
2. **Гулиева З. С.**, Особенности эндометрия у женщин с потерей беременности в анамнезе с недифференцированной дисплазией соединительной ткани / **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов, Н. Г. Кузьменко // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/117-13455>.
3. **Гулиева, З. С.**, Структурные и функциональные особенности эндометрия у женщин с потерей беременности ранних сроков в анамнезе с недифференцированной дисплазией соединительной ткани / **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов, Л. П. Перетятко // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/120-15461>.
4. Патент 2535071 Российская Федерация, МПК G01N33/50. от 08.10.2014 г. «Способ диагностики недифференцированной дисплазии соединительной ткани у женщин с потерей беременности в анамнезе» / **Гулиева З. С.**, Герасимов А. М. Заявитель и патентообладатель – ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская

академия» МЗ Российской Федерации (RU). – № 2013116097, заявлено 09.04.2013; опубликовано 10.12.2014. Бюллетень.... № 34.- 7 с.

Публикации в сборниках, материалы конференций и тезисы докладов

1. **Гулиева, З. С.** Состояние фибринолитической активности децидуального эндометрия и хориона в норме с НДСТ и без неё / **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов // Материалы XII Всероссийского научного форума «Мать и Дитя». – М., 2011. – С. 43–44.
2. Особенности ферментативной активности хориона у женщин с угрозой прерывания беременности / О. А. Ельникова, **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов, Л. В. Посисеева // Материалы XXV Международный конгресс с курсом эндоскопии «Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний». – М., 2012. – С. 161–162.
3. **Гулиева, З. С.** Гистологические особенности эндометрия у женщин с привычным невынашиванием беременности и недифференцированной дисплазией соединительной ткани (НДСТ) / **З. С. Гулиева** // Материалы 92-й ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молодые ученые – развитию Ивановской области». – Иваново, 2012. – С. 31.
4. Гистологические и биохимические особенности эндометрия у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани и привычным невынашиванием беременности в анамнезе / **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов, Л. П. Перетятко, Т. А. Кривенцова // Репродуктивное здоровье – здоровье будущего поколения // Консилиум. – 2012. – № 2. – С. 34–35.
5. **Гулиева, З. С.** Особенности содержания магния в эндометрии у женщин с потерей беременности и НДСТ / **З. С. Гулиева** // Материалы 93-й ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых Молодые ученые – развитию Ивановской области».- Иваново, 2013. – С. 157.
6. Морфологические особенности эндометрия у женщин с недифференцированной дисплазией соединительной ткани и привычным невынашиванием беременности в анамнезе / **З. С. Гулиева**, А. М. Герасимов, Л. П. Перетятко, Р.А. Кузнецов // XV Всероссийский научный форум «Мать и дитя». – М., 2014. – С. 52–54.