

Імуногістохімічна оцінка тромбоспондину ендометрія в разі недостатності лютетінової фази

Т.Д. Задорожна¹, О.В. Булавенко², Т.Ф. Татарчук¹, В.В. Біктіміров²

¹НДІ педіатрії, акушерства та гінекології

²ДУ «Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова», м. Київ

Установлено, що в разі недостатності лютетінової фази в паренхіматозно-стромальних елементах ендометрія зростає рівень експресії тромбоспондину. Залежно від структурних елементів ендометрія рівень експресії становить 2–3 бали. Процес залежить від рецепторної активності ендометрія відносно естрогенів та прогестерону.

Ключові слова: ендометрій, тромбоспондин, недостатність лютетінової фази.

В останні роки велика увага зарубіжних і вітчизняних учених приділяється вивченню клітинно-молекулярних відносин, що відбуваються в ендометрії, починаючи з менструального циклу, з етапу інвазії бластоцисти і завершуючи моментом пологової діяльності.

На сьогоднішній день відомо понад 500 білків, які беруть участь у регуляції процесів репродукції. Серед них виділяють наступні основні групи: білки та ферменти клітинного матриксу, цитокіни і хемокіни, фактори росту, білки – регулятори процесів ангиогенезу, гормони та ін. [4].

У репродуктивній системі жінки однією з дискусійних та остаточно не вирішених проблем є недостатність лютетінової фази як однієї з головних причин безплідності, невиношування вагітності [2].

У літературних джерелах є різноманітна інформація про рецепторну особливість, цитокіновий профіль ендометрія та ін. у разі НЛФ [3, 6]. Проте роль білків – регуляторів процесу ангиогенезу при цьому патологічному процесі вивчена недостатньо.

Одним із регуляторів ангиогенезу є тромбоспондин.

Тромбоспондин (TSP) – великий трьохсубодиничний глікопротеїн позаклітинного матриксу з внутрішніми дисульфідними зв'язками. Молекулярна маса TSP становить 450 кДа, молекулярна маса субодиниць – 180 кДа. Він синтезується різноманітними типами клітин, у тому числі ендотеліоцитами, мегакаріоцитами, міоцитами та пухлинними клітинами. TSP – один із головних інгібіторів ангиогенезу, який впливає на адгезію та проліферацію ендотеліальних клітин. Імуногістохімічно тромбоспондин виявляється в перитубулярній сполучній тканині, у базальній мембрані шкіри, легень, у нормальних кровоносних судинах.

Синтез TSP регулюється антионкогеном p53; мутації чи делеції p53 призводять до зниження синтезу тромбоспондину і як наслідок – до посилення ангиогенезу в пухлині (Damcron et al., 1994).

У нормі в тканинах дорослого організму процеси ангиогенезу відсутні. Виключенням з цього є тканини жіночої репродуктивної сфери, де циклічно протягом репродуктивного періоду перебігають процеси ангиогенезу та ремоделювання тканин. Давно відзначено, що однією з головних ознак повноцінної лютетінової фази є розвиток спіральних артерій з «клубочками», які забезпечують повноцінну трофіку ендометрія [5].

Мета дослідження – визначити рівень експресії тромбоспондину в паренхіматозно-стромальних елементах ендометрія та його роль у розвитку недостатності лютетінової фази.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 45 жінок з недостатністю лютетінової фази віком від 18 до 42 років. У контрольну групу включено 28 пацієнток з повноцінною лютетіною фазою менструального циклу. Згідно з анамнезом, у даної групи жінок були фізіологічні пологи і не спостерігалось гінекологічної патології та соматичних хвороб.

Для оцінки морфофункціонального стану ендометрія біоптичний матеріал отримували штриховими зскрябами та методом аспіраційної біопсії з використанням атравматичної аспіраційної кюретки-пайпель «Pipelle de Cornier» (Франція). Фрагменти ендометрія фіксували в 10% розчині холодного нейтрального формаліну (pH 7,4) протягом 24 год. Після дегідратації їх заливали у високоочищений парафін з полімерними добавками (Richard-Allan Scientific) за температури не вище 60°C. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі Microm HM 325 із системою переносу зрізів STS (Carl Zeiss, Німеччина) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною (5±1) мкм.

Експресію тромбоспондину в тканині ендометрія виявляли непрямим імуногістохімічним методом Clon HB 8432. З цією метою парафінові зрізи наносили на предметне скло зі спеціальним адгезивним покриттям, далі депарафінували у ксилолі за стандартною схемою та проводили регідралізацію. При цьому зрізи піддавали так званій тепловій індукції епітопного повернення (HIER). Для демаскування антигенів (відновлення антигенної структури) регідратовані зрізи підлягали термічній обробці в розчині Target Retrieval Solution (DAKO, Данія) і прогріванню їх на водяній випарній бані GFL 1023 за температури – 90–95° протягом 20–30 хв або в мікрохвильовій печі з урахуванням рекомендацій фірми – виробника антитіл. Після блокування неспецифічного зв'язування білка протейновим блоком (DAKO) та ендогенної пероксидазної активності пероксидазним блоком (DAKO) проводили трьохетапну імуноферментну реакцію.

Розповсюдженість та інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом у балах – від 0 до 3.

Дослідження препаратів у прохідному світлі проводили на дослідницькому мікроскопі Olympus AX 70 (Японія) із цифровою відеокамерою Olympus DP 50, з'єднаною з персональним комп'ютером. Мікрофотографування та морфометричне вивчення препаратів здійснено з використанням програми Analysis Pro 3.2 (фірма Soft Imaging, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника програмного забезпечення. Усі мікрофотографії виконані за допомогою фотоцифрової апаратури Olympus DP 50 і зберігаються в базі даних комп'ютера.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час імуногістохімічного дослідження ендометрія встановлено, що експресія тромбоспондину виявлялась у вигляді гранул у цитоплазмі епітелію залоз, фібробластах, а також у фібрилярних структурах екстрацелюлярного матриксу.

В ендометрії жінок з повноцінною лютеїновою фазою LH+7–8 спостерігалася вогнищева експресія тромбоспондину в цитоплазмі епітелію залоз. Як правило, білок виявлявся в поодиноких клітинах залоз.

Такі залози мали переважно округлу або видовжену форму, без бокових розгалужень та вибухаючих епітеліальних сосочків. Показник рівня експресії TSP коливався від 0 до 1 бала.

У переважній більшості ендометріальних залоз з боковими розгалуженнями та вибухаючими епітеліальними сосочками в цитоплазмі епітелію відсутня експресія тромбоспондину як АВ-1 ізотипу Ig M, так і АВ-7 ізотипу Ig G 2a.

Вогнищево виявлялась експресія тромбоспондину в цитогенних елементах стромі. Як правило, тромбоспондин спостерігався в вогнищах з помірним або вираженим набряком стромі. У таких ділянках серед стромальних клітинних елементів переважали фібробласти.

Кількісний рівень експресії тромбоспондину становив 1 бал.

У стромальних клітинних елементах ендометрія з добре розвинутими спіральними судинами з формуванням «клубочків», з вираженою периваскулярною прецидуальною реакцією експресія тромбоспондину не спостерігалась (мал. 1).

Отримані дані свідчать про низький рівень експресії тромбоспондину паренхіматозно-стромальними елементами ендометрія в жінок з повноцінною лютеїновою фазою менструального циклу. Це зумовлює виражений ангиогенез із формуванням повноцінних спіральних артерій і покращує трофіку ендометрія. Поява низького рівня експресії тромбоспондину (1 бал) у цитоплазмі епітелію залоз та в клітинних елементах стромі спостерігається в відносно функціонально неповноцінних ділянках ендометрія і має компенсаторно-приспосувальний характер.

Під час імуногістохімічного дослідження експресії тромбоспондину в паренхіматозно-стромальних елементах ендометрія жінок з недостатністю лютеїнової фази встановлено, що високий ступінь рівня експресії виявляється в епітелії залоз, у фібробластах стромі, а також навколо кровоносних судин та покривному маточному епітелії.

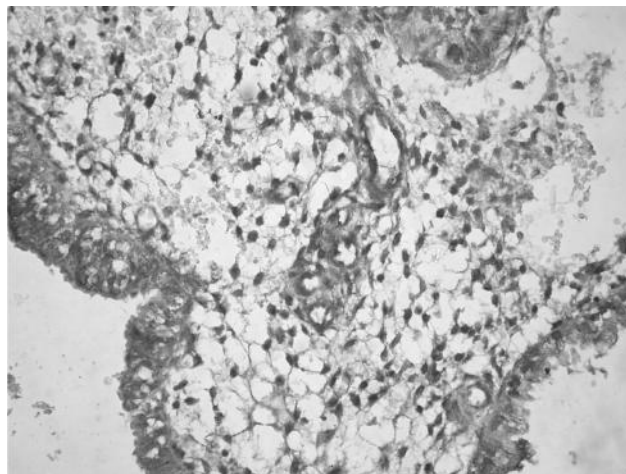
В епітелії залоз відзначається дифузна локалізація тромбоспондину в цитоплазмі, а також у переважній більшості на апікальній поверхні клітин. Такі залози зменшені в розмірах, з неглибокими боковими відгалудженнями (мал. 2).

Навколо залоз строма набрякла і представлена фібробластами з вираженою експресією тромбоспондину. Кількісний рівень експресії тромбоспондину становив 2 бали. Слід підкреслити, що процес має дифузний характер.

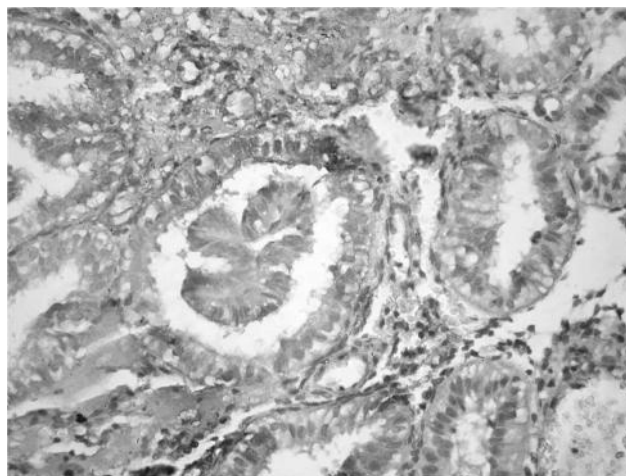
Помірно виражений ступінь експресії тромбоспондину виявлявся в стромі ендометрія і в тих випадках, де ендометріальні залози мали повноцінну морфологічну структуру, з явищами секреції та формуванням вибухаючих епітеліальних сосочків. У таких ділянках експресія тромбоспондину мала вогнищевий характер.

Кількісний рівень експресії тромбоспондину в досліджуваних ділянках становив 2 бали.

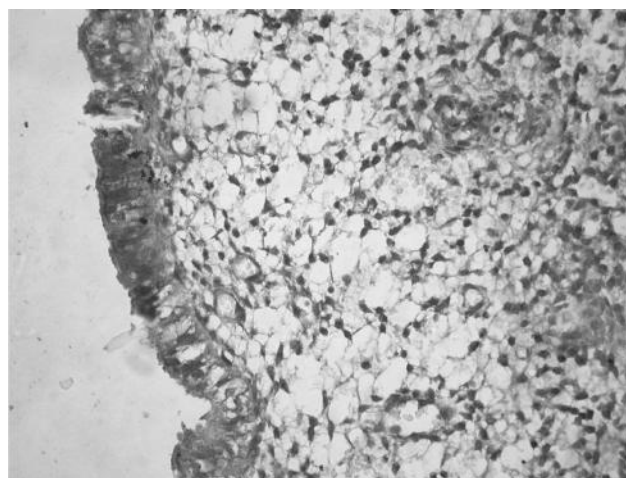
У переважній більшості спостережень експресія тромбоспондину виявлялась і в покривному маточному епітелії та в субепітеліальній стромі ендометрія. Процес мав вогнищевий характер. Тромбоспондин виявлявся в цитоплазмі клітин епітелію з відсутньою щіточковою облямівкою. У підлеглій стромі таких ділянок реєструвалися незрілі спіральні артерії. Тромбоспондин мав вигляд «ніжних» фібрилярних структур (мал. 3).



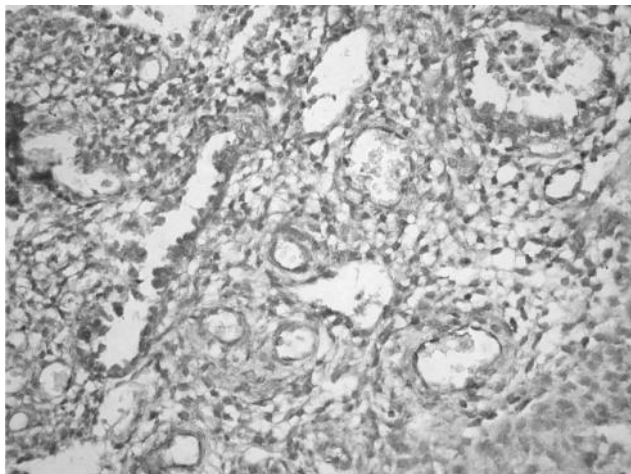
Мал. 1. LH+8. Норма. Відсутність експресії TRS AB-1 у цитогенних елементах стромі. Непрямий імуногістохімічний метод Clon HB 8432. x 100



Мал. 2. LH+8. Норма. Вогнища експресії TSP AB-1 у гранулах цитоплазми епітелію залоз та фібробластах стромі. Непрямий імуногістохімічний метод Clon HB8432. x 200



Мал. 3. LH+8. НЛФ. Вогнища експресії тромбоспондину TSP B-1 у покривному матковому епітелії та в стромі ендометрія. Непрямий імуногістохімічний метод Clon HB8432. x 200



Мал. 4. LH+8. НЛФ. Високий рівень експресії тромбоспондину TSP AB-1 у ендотеліюцитах артерій та цитогенних елементах строми. Непрямий імуногістохімічний метод Clon NB 8432. x 200

Найбільш виражена експресія тромбоспондину спостерігалась у цитогенних елементах строми, а також в ендометріальних кровоносних судинах. Процес мав дифузний, розповсюджений характер. У стромі ендометрія рівень експресії тромбоспондину становив 2 бали.

У кровоносних судинах експресія тромбоспондину інтенсивно виражена в артеріях. Артерії нагадують спіральні артерії, проте просвіт їх розширений, з невеликою кількістю епітеліальних клітин, без формування «клубочків». В ендотелії артерій спостерігався високий рівень експресії тромбоспондину – він становив 2–3 бали (мал. 4).

Таким чином, дослідження експресії білка тромбоспондину в ендометрії показало, що в жінок з недостатністю лютеїнової фази зростає рівень експресії тромбоспондину як у покривному маточному епітелії, в епітелії ендометріальних залоз, ендотелії артерій, так і в цитогенних елементах строми. Рівень експресії становить 2–3 бали. Процес має дифузний характер.

Високий рівень тромбоспондину пригнічує ангіогенний ефект. При цьому порушується секреторна трансформація ендометрія і створюються умови для погіршення трофіки паренхіматозно-стромальних елементів ендометрія. Зростання рівня інтенсивності та розповсюдженості активності тромбоспондину може пояснюватися рецепторною недостатністю ендометрія, зокрема прогестерону.

Для утворення судин в ендометрії на різних стадіях менструального циклу необхідні фактори росту, найбільш важливими з яких є основний фактор росту фібробластів та судинно-ендотеліальний ростковий фактор – поліфункціональний цитокін, що має багато ізоформ, які пов'язані з тромбоцитами та лімфоцитами [1].

Прогестерон є інтенсивним стимулятором експресії bFGF у матці. bFGF – фактор росту фібробластів є важливим фактором ангіогенезу та клітинного диференціювання. Цей фактор надає стимулюючий вплив на проліферацію ендотеліальних клітин артерій матки, бере участь у регенерації тканин, контролює ріст та диференціювання [4]. Як показали наші попередні дослідження, у разі недостатності лютеїнової фази в структурних елементах ендометрія знижується експресія прогестеронових рецепторів, у зв'язку з цим і пригнічується ангіогенез.

На ендотеліальних та гладком'язових клітинах кровоносних судин присутні рецептори естрогенів. Естрогени є також потужними регуляторами ангіогенезу. Під їх впливом відбувається індукція проліферації та міграції ендотеліальних клітин, стимуляція секреції судинно-ендотеліального росткового фактора VEGF як одного із найважливіших регуляторів ангіогенезу в різних органах і тканинах. Дисбаланс експресії антигенів до рецепторів естрогену в паренхіматозно-стромальних елементах ендометрія порушує активність VEGF та пригнічує ангіогенез.

Таким чином, аналіз отриманих даних показав, що в разі недостатності лютеїнової фази порушується процес ангіогенезу, в основі якого лежить складний механізм за участю значної кількості регуляторних одиниць. Отримані дані є початком багатогранної картини всіх процесів, що відбуваються в ендометрії.

Перспективою подальших досліджень є вивчення загального спектра регуляторних взаємодій в ендометрії, що дозволить знайти нові підходи до вирішення проблеми діагностики та лікування недостатності лютеїнової фази.

Иммуногистохимическая оценка тромбоспондина эндометрия при недостаточности лютеиновой фазы Т.Д. Задорожная, О.В. Булаченко, Т.Ф. Татарчук, В.В. Биктимиров

Установлено, что при недостаточности лютеиновой фазы в паренхиматозно-стромальных элементах эндометрия возрастает уровень экспрессии тромбоспондина. В зависимости от структурных элементов эндометрия уровень экспрессии составляет 2–3 балла. Процесс зависит от рецепторной активности эндометрия по отношению к эстрогенам и прогестерону.

Ключевые слова: эндометрий, тромбоспондин, недостаточность лютеиновой фазы.

Immunohistochemical evaluation of the endometrial trombospondin in case of the lutein phase decreasing T.G. Zadorozhna, O.V. Bulavenko, T.F. Tatarchuk, V.V. Biktimirov

It has been explored, that in case of insufficiency of the lutein phase, the level of the trombospondin secretion in endometrial stromal elements is increased. The elevation depends of the endometrial structural changes and is 2-3 units. This process is connected with the sensitivity of the endometrial receptors to such hormones as estrogen and progesterone.

Key words: endometrium, trombospondin, insufficiency of the lutein phase.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гласко Е.Н., Капланская И.Б., Франк Г.А. Паренхиматозно-стромальные факторы при гемобластозах // Архив патологии. – 2007. – № 5. – С. 17–25.
2. Диагностика недостаточности лютеиновой фазы / Краснодарский В.И., Логутова Л.С., Серова О.Ф. и др. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2006. – № 2. – С. 68–72.
3. Роль цитокинов в регуляции репродуктивной функции / Останин А.А., Айзинович Б.И., Айзинович И.В., Кожин А.Ю., Черных Е.Р. // Бюл. экпер. биол. мед. – 2007. – 143, № 1. – С. 81–85.
4. Роль матричных белков, цитокинов и факторов ангиогенеза маточно-плацентарного комплекса в регуляции имплантации и плацентации / Никитина Л.А., Демидова Е.М., Радзинский В.Е., Демидов Б.С., Самоходская Л.М. // Акуш. и гинек. – 2007. – № 3. – С. 5–10.
5. Хмельницкий О.К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. – СПб.: Сотис, 1994. – С. 115–151.
6. Хокина Н.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Особенности продукции цитокинов при физиологической и осложненной беременности // Акуш. и гинек. – 2006. – № 2. – С. 11–15.