

Эпителиомезенхимные отношения в миометрии женщин с аденомиозом, сопровождающимся синдромом хронической тазовой боли

М.Р. Оразов¹, А.В. Чайка¹, Е.Н. Носенко²

¹Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

²Университетская клиника «Центр реконструктивной и восстановительной медицины» Одесского национального медицинского университета

В статье приведены результаты морфологического исследования маток, полученных после гистерэктомии у 60 пациенток с диффузным аденомиозом II–III степени, сопровождающимся выраженным синдромом хронической тазовой боли. Общую морфологическую оценку срезов матки проводили при окраске гематоксилином и эозином. Для оценки характера межклеточных коопераций различные линии клеток визуализировали иммуногистохимически. Для изучения кинетики клеток оценивали пролиферацию и апоптоз клеток с помощью моноклональных антител к Ki-67 и p53 соответственно. Чувствительность к эстрогенам определяли с использованием моноклональных антител к эстрогеновым рецепторам. Сделан вывод о том, что при аденомиозе регистрируется нарушение эпителиомезенхимных отношений, определяющих нарушение морфогенеза разветвлений маточных желез, что сопровождается усилением пролиферации эпителиальных клеток на фоне высокой чувствительности эпителиальных и стромальных клеток к эстрогенам.

Ключевые слова: аденомиоз, эутопический эндометрий, эктопический эндометрий, морфология, Ki-67, p53, рецепторы к эстрогенам.

Аденомиоз является гиперпролиферативным процессом, который встречается у 70–90% пациенток с генитальным эндометриозом [3, 5, 6, 8]. С опухолевым процессом его сближает отсутствие соединительнотканной капсулы, окружающей эндометриодные гетеротопии, относительная автономность, способность к инфильтрирующему росту и метастазированию. В отличие от истинной опухоли для аденомиоза не характерен морфологический атипизм или прогрессия [1, 2].

В настоящее время разработана единая концепция морфогенеза аденомиоза, по которой заболевание формируется вследствие погружения элементов стромы и желез базального слоя эндометрия в миометрий. Современная дефиниция аденомиоза матки – заболевание матки, при котором развивается инвазия желез и стромы эндометрия в миометрий на глубину более чем 2,5 мм от маточной соединительной зоны (the Uterine junctional-zone) [9]. Погружающему росту эндометрия в миометрий благоприятствуют нарушения десмолитических и десмопластических процессов в миометрии и в эндометрии и деструкция соединительнотканной основы миометрия, а также нарушения гистобиологического барьера между слизистой оболочкой матки и миометрием [1, 2, 10].

Аденомиоз является одной из существенных, а по данным некоторых авторов, основной причиной тазового болевого синдрома, дисменореи и гиперменореи [3, 4, 7].

Цель исследования: изучить эпителиомезенхимные отношения в матке женщин с аденомиозом, сопровождающимся синдромом хронической тазовой боли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для морфологического исследования использовали фрагменты стенок 60 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с диффузным аденомиозом II–III степени, сопровождающимся выраженным болевым синдромом. Пациентки были прооперированы в пролиферативную фазу цикла. Контрольную группу составили матки 5 пациенток без наличия гиперпролиферативных процессов, погибших в автокатастрофе.

После гистерэктомии участки стенки матки, включающие эндометрий и миометрий фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине (рН 7,4) в течение 24 ч. После дегидратации материал заливали в высокоочищенный парафин с полимерными добавками (Richard-Allan Scientific, США) при температуре не выше 60°C. Срезы толщиной 5±1 мкм получали на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса срезов STS (Carl Zeiss, Германия). По 2 среза с каждого блока помещали на адгезивное предметное стекло Super Frost Plus (Menzel, Германия). Общую морфологическую оценку срезов проводили при окраске гематоксилином и эозином. При этом оценивали наличие, количество и глубину расположения маточных желез (эктопического эндометрия) в миометрии. Для оценки характера межклеточных коопераций различные линии клеток визуализировали иммуногистохимически (ИГХ).

Для изучения кинетики клеток оценивали пролиферацию и апоптоз клеток с помощью моноклональных антител (МАТ) к Ki-67 (Clone DO-7) и p53 (Clone MM1; DAKO) соответственно. Чувствительность к эстрогенам определяли с использованием МАТ к эстрогеновым рецепторам (ER). Для «демаскировки» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR при 450W 3 раза по 3,5 мин. После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) наносили первичные антитела (RTU). Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (DAKO). Препараты доокрашивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетической среде Permanent Mounting Medium (DAKO).

С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный морфометрический анализ, который проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1. Снимки выполнены на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония).

В исследованиях с использованием МАТ к Ki-67, p53 оценивали удельную плотность иммунопозитивных клеток

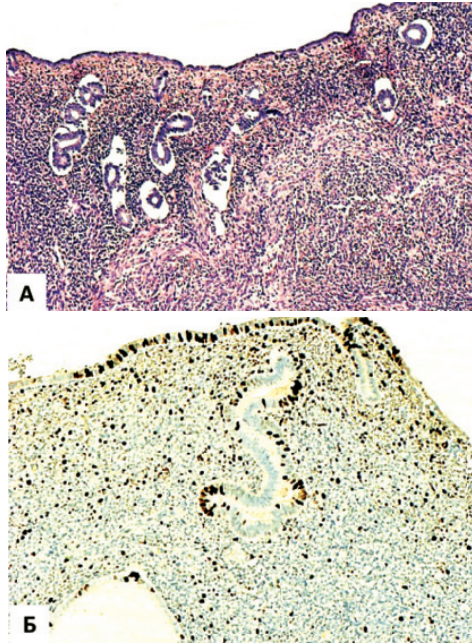


Рис. 1. Эндометрий пациентки с аденомиозом в фазу пролиферации. А – окраска гематоксилином и эозином, ув. 80. Б – ИГХ с МАТ к Ki-67, ув. 200

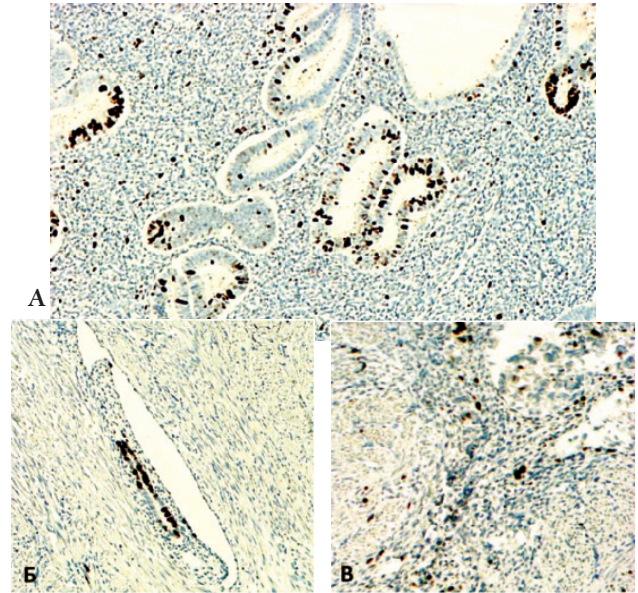


Рис. 4. Проллиферирующие клетки в эктопическом эндометрии. ИГХ с МАТ к Ki-67, ув. 200:

А – очаг аденомиоза в подслизистом слое миометрия, Б – инвазия одиночной неразветвленной железы вглубь миометрия, В – очаг аденомиоза с десквамацией клеток

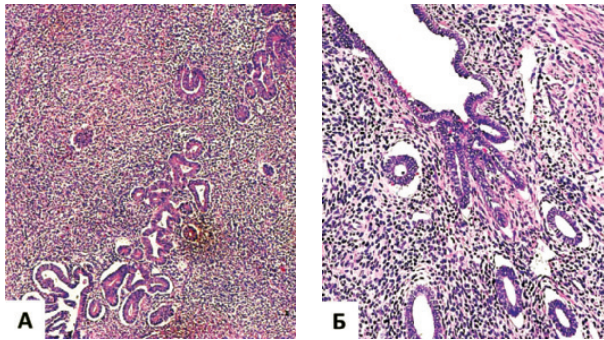


Рис. 2. Эктопический эндометрий в миометрии. Инвазия разветвленных маточных желез. Окраска гематоксилином и эозином. А – ув. 160, Б – ув. 400

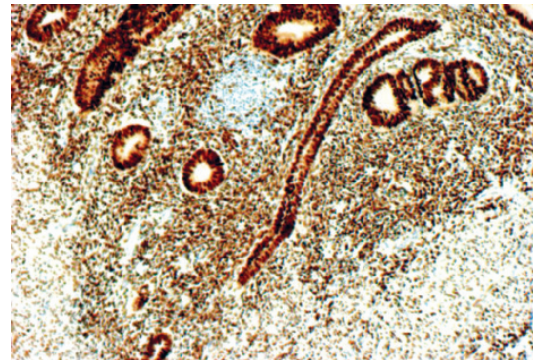


Рис. 5. Высокая экспрессия рецепторов к эстрогенам в клетках эктопического эндометрия. ИГХ с МАТ к ER, ув. 200

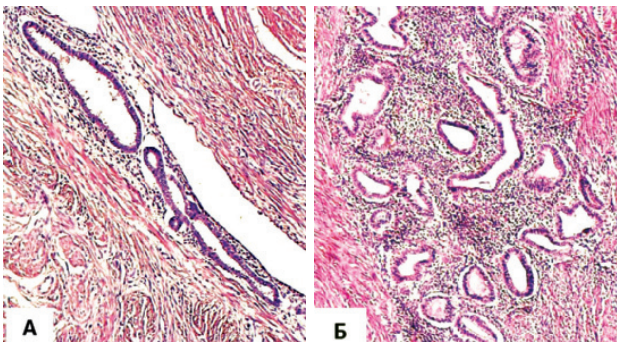


Рис. 3. Очаги аденомиоза с вращением одиночных (А) и многочисленных (Б) маточных желез, окруженных инфильтрированной стромой. Окраска гематоксилином и эозином. А – ув. 200, Б – ув. 160

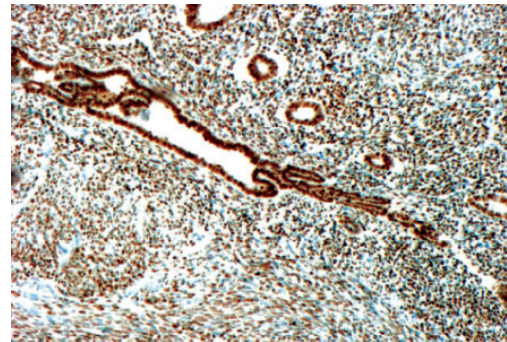


Рис. 6. Экспрессия рецепторов к эстрогенам в очаге аденомиоза. ИГХ с МАТ к ER, ув. 200

(количество окрашенных в коричневый цвет клеток на сотню клеток в поле зрения). Оценку количества клеток проводили в 10 разных полях зрения каждого препарата при увеличении $\times 200$ (окуляр 10, объектив 40), соответствующем $0,785 \text{ мм}^2/\text{поле зрения}$, с участием двух независимых специалистов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка эктопического эндометрия у пациенток с аденомиозом продемонстрировала соответствие структуры фазе пролиферации менструального цикла. Покровный эпителий характеризовался присутствием большого количества про-

лиферирующих клеток ($12,8 \pm 2,74\%$, 95% ДИ – 6,5–20,7%) и признаками незрелости, проявлениями которой были высокое ядерно-цитоплазматическое отношение и отсутствие развитого апикального полюса. Железы формировали до $28,4 \pm 3,2\%$ (95% ДИ – 23,4–33,2%) объема эндометрия, имели местами извитой ход с формированием локальных расширений преимущественно в глубине эндометрия (рис. 1).

В структуре маточных желез максимальное количество митозов отмечалось в области шейки и дна (рис. 1Б), где количество Ki-67 иммунопозитивных клеток составляло соответственно $17,3 \pm 2,8\%$ и $23,5 \pm 3,6\%$. В отличие от этого, в области тела маточных желез количество пролиферирующих клеток не превышало 6%. При этом высокая скорость пролиферации эпителия эндометрия вела к формированию картины псевдомногогорядности (за счет тесного расположения ядер при отсутствии четко выраженного апикального полюса клеток маточных желез).

Характерно, что в строме эутопического эндометрия также отмечалась пролиферация клеток, однако численность пролиферирующих клеток была ниже, чем в эпителиальных структурах эндометрия, и составляла $8,8 \pm 4,2\%$ (95% ДИ – 5,3–11,8%). Хотя при этом строма характеризовалась высокой плотностью расположения клеток. Последнее было связано с наличием лимфоцитарной инфильтрации. Характерно, что при этом количество клеток, экспрессирующих маркер апоптоза, p53, было крайне низким – и не превышало 2% у всех обследованных пациенток с аденомиозом. Важно также отметить, что формирующийся функциональный слой эндометрия был богат кровеносными сосудами, часть которых была дилатирована и заполнена эритроцитами.

В ряде участков стенки матки отмечалась инвазия маточных желез вглубь эндометрия. Форма и размер желез при этом варьировали. В отдельных случаях отмечалась инвазия единичных трубчатых неразветвленных желез в миометрий. Однако в большинстве случаев имело место гроздевидное врастание маточных желез вглубь миометрия. Последнее было ассоциировано с нарушением морфогенеза желез и усилением их ветвлений (рис. 2).

Такая картина, по сути, отражает нарушение эпителиомезенхимных взаимодействий, лежащих в основе не только эмбрионального роста, но также физиологического и патологического ремоделирования тканей и органов. С нарушением межтканевых отношений при эндометриозе связывают также развитие эпителиомезенхимной трансформации, сопровождающейся изменением локального микроокружения и концентрации факторов роста [11]. Не удивительно, что гроздевидные очаги эктопических маточных желез, в отличие от очагов единичной инвазии, были окружены большим объемом стромы (рис. 3).

В строме отмечалась высокая плотность клеток, среди которых выявлялись не только фибробластоподобные клетки, но и многочисленные лимфоциты. В расширенных эктопических железах наблюдали картины разрушения клеток эпителия, десквамируемых в просвет железы. Важно отметить, что во всех случаях очаги аденомиоза были ассоциированы с формированием локальных кистообразных расширений и наличием вблизи большого количества дилатированных кровеносных сосудов. При этом, как и в эутопическом эндометрии, в очагах аденомиоза регистрировали высокую пролиферацию клеток (рис. 4).

Характерно, что количество делящихся клеток в кистозно расширенных участках было ниже, чем в железах, сохраняющих трубчатую структуру (см. рис. 4А). Интересно, что даже в участках десквамации клеток в просвет расширенных желез, определялись Ki-67-позитивные клетки (рис. 4Б). Кроме того, обращала на себя внимание относительно низкая экспрессия Ki-67 в миометрии, несмотря на наличие признаков гиперплазии, предопределяющих, по сути, увеличение размеров матки. Визуализация данного маркера вовлечения кле-

ток в клеточный цикл определялась лишь в незначительном (до 1%) количестве гладких миоцитов при диффузном распределении иммунопозитивных клеток в миометрии.

Несмотря на высокую скорость пролиферации эпителиальных клеток эндометрия, в них оказалась чрезвычайно низкой экспрессия p53, что отражает снижение апоптоза. Данный феномен может быть обусловлен высокой экспрессией рецепторов к эстрогенам и эффектами данных гормонов, для которых характерен выраженный антиапоптогенный эффект. ИГХ-исследование продемонстрировало максимальную экспрессию эстрогеновых рецепторов в эпителиальных клетках как эутопического, так и эктопического эндометрия (рис. 5–6), которая охватывала 99–100% клеток, что вполне закономерно в фазу пролиферации менструального цикла и согласуется с данными литературы о выраженной зависимости эндометриоза от эстрогенов [12].

Высокой оказалась чувствительность и стромальных клеток эндометрия к эстрогенам. Интересно, что при этом интенсивность и пространственные характеристики экспрессии ER в строме эндометрия не были связаны с пролиферативными процессами. Кроме того, данный вид рецепторов визуализировался как в ядрах фибробластоподобных клеток эндометрия, так и в мигрирующем пуле, за исключением незначительного количества лимфоцитов.

Характерно, что в миометрии выраженность экспрессии ER оказалась существенно ниже (см. рис. 6) по сравнению с эндометрием. Более того, часть гладких миоцитов оказались иммунонегативными – до 20% клеток миометрия не экспрессировали рецепторы к эстрогенам, что отражает мозаичное выпадение экспрессии рецепторов к половым стероидам в миометрии. При этом многочисленные тонкие пучки гладких миоцитов были дезорганизованы (разнонаправлены) и разделены прослойками стромы с многочисленными кровеносными сосудами во всех слоях эндометрия. Интересно, что в строме между пучками гладких миоцитов была выявлена также низкая экспрессия эстрогеновых рецепторов, что, вероятно, связано с инфильтрацией стромы лимфоцитами.

ВЫВОДЫ

При аденомиозе регистрируется нарушение эпителиомезенхимных отношений, определяющих нарушение морфогенеза разветвлений маточных желез, что сопровождается усилением пролиферации эпителиальных клеток на фоне высокой чувствительности эпителиальных и стромальных клеток к эстрогенам.

Епітеліомезенхімні відносини в міометрії жінок з аденоміозом, що супроводжується синдромом хронічного тазового болю М.Р. Оразов, А.В. Чайка, О.М. Носенко

У статті наведено результати морфологічного дослідження маток, отриманих після гістеректомії у 60 пацієнток з дифузним аденоміозом II–III ступеня, що супроводжувався вираженим синдромом хронічного тазового болю. Загальне морфологічне оцінювання зрізів матки проводили при забарвленні гематоксиліном та еозинном. Для оцінювання характеру міжклітинних кооперацій різні лінії клітин візуалізували імуногістохімічно. Для вивчення кінетики клітин оцінювали проліферацію і апоптоз клітин за допомогою монокліональних антитіл до Ki-67 і p53 відповідно. Чутливість до естрогенів визначали з використанням монокліональних антитіл до естрогенових рецепторів. Зроблено висновок про те, що при аденоміозі реєструється порушення епітеліомезенхімних відносин, які визначають порушення морфогенезу розгалужень маткових залоз, що супроводжується посиленням проліферації епітеліальних клітин на тлі високої чутливості епітеліальних і стромальних клітин до естрогенів.

Ключові слова: аденоміоз, еутопічний ендометрій, ектопічний ендометрій, морфологія, Ki-67, p53, рецептори до естрогенів.

Epithelium-mesenchymal relations in the myometrium of women with adenomyosis, accompanied by chronic pelvic pain syndrome
M.R. Orazov, A.V. Chaika, E.N. Nosenko

The paper presents the results of morphological studies queens obtained after hysterectomy from 60 patients with diffuse adenomyosis II–III degree, accompanied by severe chronic pelvic pain syndrome. Overall morphological evaluation sections of the uterus was performed at H & E stain. To assess the nature of intercellular cooperation various cell lines was visualized by immunohistochemistry. To

study the kinetics of cell the proliferation and apoptosis were assessed cells with monoclonal antibodies Ki-67 and p53, respectively. Sensitivity to estrogens determined using monoclonal antibodies to estrogen receptors. It is concluded that the violation of adenomyosis registered epithelium-mesenchymal relations that determine a violation of branching morphogenesis uterine glands, which is accompanied by increased proliferation of epithelial cells on the background of the high sensitivity of epithelial and stromal cells to estrogens.

Key words: adenomyosis, eutopic endometrium, ectopic endometrium, morphology, Ki-67, p53, estrogen receptors.

Сведения об авторах

Оразов Мекан Рахимбердыевич – Научно-исследовательский институт медицинских проблем семьи Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, 83114, г. Донецк, пр. Панфилова, 3

Чайка Андрей Владимирович – Научно-исследовательский институт медицинских проблем семьи Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, 83114, г. Донецк, пр. Панфилова, 3

Носенко Елена Николаевна – Университетская клиника «Центр реконструктивной и восстановительной медицины» Одесского национального медицинского университета, 65009, г. Одесса, ул. Тенистая, 8. Email: nosenko.olena@gmail.com

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дамиров М.М. Генитальный эндометриоз: взгляд практикующего врача : монография / Дамиров М.М., Олейникова О.Н., Майорова О.В. – М.: Издательство БИНОМ, 2013. – 152 с.
2. Носенко О.М. Клініко-морфологічна діагностика внутрішнього ендометріозу матки [Текст]: Автореф. дис... канд. мед. наук: 14.01.01 «Акушерство та гінекологія» / О.М. Носенко; Інститут педіатрії, акушерства та гінекології АМН України. – Київ: Б.в., 1999. – 21 с.
3. Роль пролиферации и апоптоза в патогенезе генитального эндометриоза / [Адамян Л.В., Зайратьянц О.В., Осипова А.А. и др.] // Спец. выпуск. 3-й Междунар. науч. конгр. «Новые технологии в акушерстве и гинекологии». – 2007. – С. 123–124.
4. Сонова М.М. Клинико-морфологические, молекулярно-биологические и лечебные факторы генитального эндометриоза [Текст]: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.01 / М.М. Сонова; ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет Росздрава». – Москва: Б.и., 2009. – 22 с.
5. Сорокина А.В. Патогенез, прогнозирование и постгеномная диагностика аденомиоза [Текст]: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01, 14.03.03 / А.В. Сорокина; Российский университет дружбы народов. – Москва: Б.и., 2011. – 39 с.
6. Эзимова А.С. Критерии диагностики и прогнозирования неоплазии органов репродуктивной системы женщин / А.С. Эзимова, С.А. Плещановская // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 12, № 1. – С. 83.
7. Clinical characteristics indicating adenomyosis at the time of hysterectomy: a retrospective study in 291 patients / [Taran F.A., Wallwiener M., Kabashi D. et al.] // Arch. Gynecol. Obstet. – 2012. – Vol. 285, № 6. – P. 1571–1576. doi: 10.1007/s00404-011-2180-7.
8. Cockerham A.Z. Adenomyosis: a challenge in clinical gynecology / Cockerham A.Z. // J. Midwifery Womens Health. – 2012. – Vol. 57, № 3. – P. 212–220.
9. Fusi L. The uterine junctional zone / Fusi L., Cloke B., Brosens J.J. // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. – 2006. – Vol. 20, № 4. – С. 479–491.
10. Garcia L. Adenomyosis: review of the literature / Garcia L., Isaacson K. // J. Minim. Invasive. Gynecol. – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 428–437. doi: 10.1016/j.jmig.2011.04.004.
11. Leyendecker G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair / Leyendecker G., Wildt L., Mall G. // Arch. Gynecol. Obstet. – 2009. – Vol. 280, № 4. – P. 529–538. doi: 10.1007/s00404-009-1191-0.

Статья поступила в редакцию 03.12.2014