

О.В. Булавенко, В.В. Біктіміров

Трансформуючий фактор росту β_1 як маркер порушень гістогенезу ендометрія та прогнозу перебігу недостатності лютеїнової фази

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Ключові слова: недостатність лютеїнової фази • TGF- β • гістогенез • ендометрій

Проведено дослідження рівня експресії TGF- β_1 в ендометрії жінок з недостатністю лютеїнової фази. Для виявлення експресії антигену TGF- β_1 застосований непрямий стрептавідин-пероксидазний метод. Встановлено, що при НЛФ в ендометрії зростає рівень експресії TGF- β_1 , як за інтенсивністю так розповсюдженістю процесу. Пропонується використовувати TGF- β_1 як маркер порушеної секреторної трансформації залоз і стромы ендометрію в діагностиці та як маркер перспективи розвитку гіперпластичних змін ендометрію при НЛФ.

Трансформирующий фактор роста β_1 как маркер нарушений гистогенеза эндометрия и прогноза течения недостаточности лютеиновой фазы

О.В. Булавенко, В.В. Биктимиров

Проведено исследование уровня экспрессии TGF- β_1 в эндометрии женщин с недостаточностью лютеиновой фазы. Для выявления экспрессии антигена TGF- β_1 применен непрямой стрептавидин-пероксидазный метод. Доказано, что при НЛФ в эндометрии растет уровень экспрессии TGF- β_1 как по интенсивности, и так и по распространенности процесса. Предлагается использовать TGF- β_1 как маркер нарушенной секреторной трансформации желез и стромы эндометрия в диагностике и как маркер перспективы развития гиперпластических изменений эндометрия при НЛФ.

Ключевые слова: недостаточность лютеиновой фазы • TGF- β • гистогенез • эндометрий**Патологія.** – 2008. – Т. 5, № 1. – С. 24-27

Transforming growth factor β_1 as a marker of endometrial gistogenesis changes and forecast of the development of lutein phase decreasing

O.V. Bulavenko, V.V. Bictimirov

It has been explored the level of TGF- β_1 endometrial expression in the women with lutein phase decreasing. We used out of the straight streptavidin-peroxidase method for evaluation of TGF- β_1 expression. It has been determined, that in case of lutein phase decreasing, the level of TGF- β_1 expression is increased as in the intensity, so in the spread of the process. We offer to use TGF- β_1 as a diagnostic marker of violated secretion transformation in glands and endometrial stroma and as a marker of the development of gyperplastic endometrial changes in the women with lutein phase decreasing.

Key words: LPD • TGF- β • gistogenesis • endometrium**Pathologia.** 2008;5(1):24-27

Вступ

Вдосконалення методів прижиттєвої морфологічної діагностики хвороб репродуктивної системи жінки повинно сприяти не тільки уточненню патологічного процесу, а також підвищенню можливості прогнозу та ефективності лікування.

Роботами попередніх років було встановлено, що основними регуляторами стану ендометрія є естрогени та гестагени, які специфічно зв'язуються спеціальними внутрішньоклітинними білками, рецепторами естрогенів та прогестерону [6,7].

Протягом нормального менструального циклу ендометрій знаходиться під впливом змінюючих концентрацій естрадіола і прогестерону, джерелом яких є дозріваючий фолікул і менструальне жовте тіло, при чому у фазі проліферації на ендометрій діє тільки естрардіол, а в фазу секретії функціональний стан тканини визначається дією прогестерону. Дослідження

рецепторного апарату ендометрію дозволило встановити, що під час фази проліферації відбувається збільшення кількості естрогенових рецепторів в тканині ендометрію, а як наслідок, зростання здатності зв'язувати естрардіол [7]. Після овуляції відмічається падіння здатності тканини зв'язувати естрогени, що пояснюється дією прогестерону, який знижує рівень естрогенових рецепторів ендометрія. Ендометрій фази секретії втрачає здатність відповідати на естрогенну стимуляцію. Кількість прогестеронових рецепторів сягає максимуму в кінці фази проліферації і в ранній стадії фази секретії.

За даними сучасних досліджень [2], органи жіночої репродуктивної системи закономірно здійснюють істотну тканинову перебудову, що проявляється змінами тканинної маси і функції. Регуляторами цих процесів є гормони, які діють через тканинові фактори росту та цитокіни.

Менструальний цикл контролюється значною кількістю цитокінів і факторів росту. Ключову роль при цьому належить суперсімейству трансформуючих факторів росту – TGF- β . Багатопланова дія TGF реалізується регуляцією рівня апоптозу, ангиогенезу, синтезу і деградації екстрацелюлярного матрикса, підтримки незрілості залозистих структур, розвитку склеротичних, запальних, проліферативних процесів [1,2,3,5].

Підсилена експресія та суперекспресія TGF- β_1 є причиною диспластичних змін та порушеного диференціювання.

В зв'язку з цим виникає необхідність більш глибокого дослідження недостатності лютеїнової фази, її прогнозу в ендометрії саме з позицій рецепторно-молекулярних взаємодій.

Мета роботи – дослідити рівень експресії трансформуючого фактора росту (TGF- β_1) у жінок з недостатністю лютеїнової фази, а також визначити перспективи розвитку даної патології.

Матеріали та методи

Проведено обстеження 45 жінок з НЛФ віком від 18 до 42 років, які були розділені на три групи. Перша група (15) – жінки віком від 18 до 24 років, друга група (15) – від 25 до 34 років, третя група (15) – жінки віком від 35 до 42 років. Контрольну групу спостережень склали 28 пацієнток з повноцінною лютеїновою фазою менструального циклу. Згідно анамнезу у даної групи жінок були фізіологічні пологи і не спостерігалось гінекологічної патології та соматичних хвороб.

Біоптичний матеріал отримували штриховими зскрябами та методом аспіраційної біопсії з використанням атравматичної аспіраційної кюретки-пайпель "Pipelle de Cornier" – Франція. Фрагменти ендометрію фіксували в 10% розчині холодного нейтрального формаліну (рН = 7,4) протягом 24 годин. Після дегідратації їх заливали у високо очищений парафін з полімерними добавками (Richard-Allan Scientific) при температурі не вище 60°C. З парафінових блоків на ротаційному мікромомі Microm HM 325 з системою переносу зрізів STS (Carl Zeiss, Німеччина) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною (5±1 мкм).

Для загальної оцінки структурних змін ендометрію зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за ван Гізоном.

Експресію антигену TGF- β_1 в ендометрії виявляли імуногістохімічним методом дослідження. З цією метою парафінові зрізи наносили на предметне скло з 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 при $t = 90-95^\circ\text{C}$ протягом 20-30 хвилин або у мікрохвильовій печі з урахуванням рекомендацій фірми виробника антитіл. Після блокування неспецифічного зв'язування білка протеїновим блоком (DAKO) та ендогенної пероксидазної активності пероксидазним блоком (DAKO) проводили трьохетапну імуноферментну реакцію.

Розповсюдженість та інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом в балах, від 0 до 3:

а) розповсюдженість реакції:

- 1) 0 – відсутнє забарвлення;
- 2) 1 – менше 10% позитивно забарвлених клітин;
- 3) 2 – більше 10% і менше 50% позитивно забарвлених клітин;
- 4) 3 – гомогенне забарвлення більше 50% клітин.

б) інтенсивність реакції:

- 1) 0 балів – відсутнє видиме забарвлення;
- 2) 1 бал – слабе забарвлення;
- 3) 2 бали – помірне забарвлення;
- 4) 3 бали – виразне забарвлення.

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 Analisis Pro 3.2 (фірма Soft Imaging, Німеччина) згідно рекомендаціям виробника програмного забезпечення. Всі мікрофотографії виконані за допомогою фото цифрової апаратури Olympus DP 50 і зберігаються в базі даних комп'ютера.

Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень показали, що у жінок з повноцінною секреторною фазою менструального циклу спостерігається нерівномірний розподіл антигену TGF- β_1 в паренхіматозно-стромальних елементах ендометрію. В залозистих структурах з вираженою секреторною трансформацією експресія антигену трансформуючого фактора росту виявлялась в цитоплазмі поодиноких епітеліальних клітинах. Рівень експресії TGF- β_1 складав 0-1 бал (рис. 1, кольор. вкладка 8). Як правило антигени досліджуемого росткового фактору локалізувались на апікальній частині клітин, які формували дрібні вирости у вигляді епітеліальних сосочків.

Ядра епітеліоцитів пухіреподібні. Мітотична активність слабо виражена і складає від 0 до 1 балу.

Навколо таких залоз відмічалось виражена предецидуальна реакція з незначним скупченням лімфоцитів.

В цитогенних елементах строми ендометрія рівень експресії TGF- β_1 дещо вищий в порівнянні з такими у залозистому апараті як за рівнем розповсюдженості так і інтенсивності забарвлення.

Рівень інтенсивності експресії антигену коливався в межах 1-2 балів, що пояснюється структурною перебудовою строми. В цей період частина сполучнотканинних клітин диференціюється в двох напрямках; а саме поверхневі клітини строми трансформуються в прецидуальні, а глибокі в так звані зернисті. Поряд з цим в стромі ендометрія зростає вміст основної речовини та колагенових волокон [2,4]. Маркерами цих процесів є зростання рівня TGF- β_1 у жінок першої групи з недостатністю лютеїнової фази.

При дослідженні експресії фактора трансформуючого росту (TGF- β_1) в ендометрії жінок з недостатністю лютеїнової фази встановлено, що антигени виявляються переважно в цитогенних елементах строми. У всіх спостереженнях першої групи жінок в епітелії ендометріальних залоз спостерігалась вогнищева експресія антигену.

Ендометріальні залози мали видовжену форму. В просвіті залоз секрет відсутній. В епітеліальних клітинах не виявляються над- і підядерні просвітлені зони. Навколо залоз слабо виражена прецидуальна трансформація клітин. Проте в цитогенних елементах в значній кількості спостерігається експресія антигену TGF- β_1 (рис. 2, кольор. вкладка 8).

Слід підкреслити нерівномірний розподіл експресії TGF- β_1 серед стромальних компонентів ендометрію. Найбільш інтенсивний рівень експресії TGF- β_1 спостерігався навколо незрілих спіральних артерій ендометрію. В таких судинах були відсутні "клубочки". Поряд з цим скупчення антигенів TGF- β_1 виявлялось в фібробластичних та прецидуальних клітинах. В залозистих структурах ендометрію експресія TGF- β_1 на відміну від контрольної групи спостережень, де була негативна експресія - виражена нерівномірно (рис. 3, кольор. вкладка 8).

В недорозвинутих залозах спостерігався високий рівень експресії TGF- β_1 , який складав 2-3 бали. В морфологічно зрілих залозах рівень експресії TGF- β_1 складав 0-1 бал.

Розповсюдженість процесу в залозистих структурах складала 32,77 \pm 4,45%, в цитогенних елементах строми – 93,38 \pm 7,41%.

В ендометрії жінок другої вікової групи рівень експресії трансформуючого фактору росту був вираженим в незрілих залозистих структурах, тобто в залозах які перебували в стадії проліферації, а також в цитогенних елементах строми. В залозах з секреторною трансформацією експресія TGF- β_1 була негативною.

Рівень інтенсивності експресії антигену в епітелії ендометріальних залоз складав 2 бали, а рівень розповсюдженості – 39,49 \pm 2,36%.

В стромальному компоненті ендометрію зростання рівня експресії TGF- β_1 , як за інтенсивністю (3 бали) так і розповсюдженістю (54,23 \pm 3,17%) пояснюється наявністю дрібних хронічних запальних вогнищ з лімфо-плазмочитарним інфільтратом та розвитком фібросклеротичних змін.

В ендометрії жінок третьої вікової групи рівень експресії TGF- β_1 різко зростав як в епітелії ендометріальних залоз так і цитогенних елементах строми. Рівень інтенсивності експресії антигену TGF- β_1 як в епітелії так і клітинних елементах строми сягав 3 бали, рівень розповсюдженості експресії носив вогнищеводифузний характер і складав відповідно 59,84 \pm 4,47 та 74,31 \pm 3,26%. Високий рівень експресії TGF- β_1 зберігався в вогнищах з явищами залозистої гіперплазії ендометрію (рис. 4, кольор. вкладка 8) та формуванням залозистих поліпів, що вказувало на інтенсивність процесів проліферації з порушенням диференціювання паренхіматозно-стромальних елементів ендометрію.

Таким чином, підсилення рівня експресії та суперекспресії TGF- β_1 призводить до порушення дозрівання та диференціювання ендометрію, що проявляється появою незрілих ендометріальних залоз, залоз з недостатньою секрецією, незрілістю спіральних артерій, слабою прецидуальною реакцією, інтенсивним розвитком цитогенних елементів строми. В плані прогнозу TGF- β_1 є маркером залозистої гіперплазії та поліпоутворення в ендометрії при недостатності лютеїнової фази.

Висновки

1. При НЛФ відмічається висока експресія та суперекспресія TGF- β_1 , що вказує на виражені проліферативні зміни паренхіматозно-стромальних елементах ендометрію з подальшим порушенням процесів диференціювання.

2.3 зростанням віку жінок з НЛФ зберігається виражена експресія TGF- β_1 як за інтенсивністю так і за розповсюдженням. В віковий період (35-42 роки) спостерігається суперекспресія TGF- β_1 , яка є віддзеркаленням розвитку залозистої гіперплазії ендометрія поліпоутворення і може слугувати маркером прогнозу в онкоморфологічному плані.

Перспективною подальших досліджень є вивчення зміни експресії TGF- β_1 при НЛФ в процесі фармакотерапії.

Література

1. Роль матриксних белков, цитокинов и факторов ангиогенеза маточно-плацентарного комплекса в регуляции имплантации и планцентации / Никитина Л.А., Демидова Е.М., Радзинский В.Е., Демидов Б.С., Самоход-

- кая Л.М. // Акушерство и гинекология. - 2007.- №3.- С.5-10.
2. Роль цитокинов в регуляции репродуктивной функции / *Останин А.А., Айзинович Б.И., Айзинович И.В., Кожин А.Ю., Черных Е.Р.* // Бюл. exper. биол. мед.- 2007.- Т.143, № 1.- С.81-85.
3. *Соболева Г.М., Сухих Г.Т.* Семейство матриксных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль // Акушерство и гинекология.- 2007.- №1.- С.5-9.
4. Трансформирующий фактор роста β_1 как маркер нарушения морфогенеза при врожденных obstructивных уродатиях / *Леонова Л.В., Северина Э.С., Попова О.П., Коновалов Д.М., Петрухина Ю.В., Симонова Н.А.* // Архив патологии.- 2007.- № 4.- С.35-38.
5. *Туманский В.А.* Физиологическое самообновление и репаративная регенерация специализированных клеток // Патология.- 2006.- № 2.- С.19-31.
6. *Хмельницкий О.К., Прянишников В.А.* Актуальные вопросы прижизненной диагностики патологических состояний эндометрия // Архив патологии.- 1979.- №5.- С.3-12.
7. *Хмельницкий О.К.* Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний.- С.Петербург, 1994.- С.474.

Поступила 20.02.2008 г.

Сведения об авторах:

Булавенко Ольга Василівна – к.мед.н., доцент кафедри акушерства та гінекології №2 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова;

Біктіміров Віктор Васильович – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії та судової медицини, проректор з лікувальної роботи Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Адрес для переписки:

Булавенко Ольга Василівна, Вінницький національний медичний університет, вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018.
Тел. моб.: 8-067-623-16-71