

Распределение коллагена I, III и IV типов в стенке эндометриоидных кист яичников

Е. М. Алексанова, В. А. Аксененко, О. М. Пилавова

Ставропольский государственный медицинский университет

Цель исследования: изучить иммуногистохимические особенности распределения коллагена I, III и IV типов в стенке эндометриоидных кист яичников (ЭКЯ) в зависимости от наличия сопутствующей недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ).

Дизайн: открытое проспективное исследование.

Материалы и методы. В исследование включили 70 пациенток с ЭКЯ, их разделили на две группы: основную группу составили 35 женщин, у которых было выявлено более шести внешних фенотипических признаков НДСТ; группу сравнения — 35 больных с шестью признаками НДСТ и менее. Всем пациенткам проводили качественное иммуногистохимическое определение коллагена I, III и IV типов в стенке ЭКЯ с фиксацией срезов в 10%-ном нейтральном формалине. Для исследования внешнего фенотипа применяли модифицированную фенотипическую карту, включающую 63 показателя.

Результаты. У пациенток основной группы в сопоставлении с группой сравнения была установлена более выраженная экспрессия коллагена III типа, отмечалась слабоположительная реакция на коллаген I типа (при его умеренной экспрессии в группе сравнения), а также имела место более интенсивная экспрессия коллагена IV типа в субэндотелиальном слое стенок сосудов ЭКЯ. Все полученные различия были статистически значимыми.

Заключение. У больных с ЭКЯ в сочетании с НДСТ, по сравнению с пациентками без НДСТ, наблюдаются более активная васкуляризация стенки кисты и продолжающийся процесс неоангиогенеза.

Ключевые слова: эндометриоидные кисты яичников (ЭКЯ), дисплазия соединительной ткани, эндометриоз.

Distribution of Collagen Types I, III, and IV in Walls of Ovarian Endometriomas

E. M. Alexanova, V. A. Aksenenko, O. M. Pilavova

Stavropol State Medical University

Study Objective: To evaluate immunohistochemical distribution patterns of collagen types I, III, and IV in the walls of ovarian endometriomas (OE) and their correlation with undifferentiated types of connective tissue dysplasia (CTD).

Study Design: This was an open-label, prospective study.

Materials and Methods: The study included 70 female patients with OE, who were divided into two groups. The main group included 35 women who had more than 6 external phenotypic characteristics of undifferentiated types of CTD. The comparator group included 35 patients with OE who had 6 or less characteristics of undifferentiated types of CTD. In all patients, qualitative evaluation of collagen types I, III, and IV in the walls of OE was done by immunohistochemical analysis. Tissue samples were fixed in 10% neutral formalin. External phenotypical features were evaluated using a modified 63-item chart.

Study Results: Compared to the comparator group, the main group had a higher expression of collagen type III, a weakly-positive test for collagen type I (while it was moderately-positive in the comparator group), and a more significant expression of collagen type IV in the subendothelial layer of the vessels in OE walls. All observed differences were statistically significant.

Conclusion: In patients with OE and undifferentiated types of CTD, neoangiogenesis is going on and the cystic capsules are more vascularized than in patients who have OE with no signs of undifferentiated types of CTD.

Keywords: ovarian endometriomas (OE), connective tissue dysplasia (CTD), endometriosis.

Наружный генитальный эндометриоз является важной медицинской, социальной и экономической проблемой ввиду выраженного болевого синдрома и альгоменореи, заставляющих страдать миллионы женщин во всем мире и приводящих к нетрудоспособности [13–15].

К настоящему времени предложено более десяти классификаций наружных генитальных эндометриозов. Однако следует признать, что не существует классификации эндометриоза яичников (ЭЯ), в полной мере удовлетворяющей клиницистов. Очевидна наметившаяся в последнее десятилетие тенденция к возрастанию распространенности эндометриоза, в среднем на 12% [3, 17]. Нередко ЭЯ приводит к бесплодию. Частота случаев бесплодия при эндометриоидных кистах яичников (ЭКЯ) колеблется от 30–40 до 70–80% [2, 10, 12, 16].

Золотым стандартом диагностики ЭЯ является гистологическое исследование удаленных макропрепаратов. Особую важность имеет гетерогенность составных компонентов стенки ЭКЯ, требующая более углубленного исследования. Присутствие соединительнотканых компонентов в стенке кисты представляет основу для изучения особенностей ее строения у пациенток в зависимости от наличия или отсутствия недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ).

В настоящее время дисплазия соединительной ткани трактуется как группа генетически гетерогенных и клинически полиморфных патологических состояний, характеризующихся нарушением формирования соединительной ткани в эмбриональном и постнатальном периодах [6]. Множество исследований подтверждают значимость НДСТ в развитии гинекологических заболеваний [1, 4–7].

Алексанова Екатерина Мильтиадовна — ассистент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО СтГМУ Минздрава России. 355100, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310. E-mail: alexanova@mail.ru

Аксененко Виктор Алексеевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО СтГМУ Минздрава России. 355100, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310. E-mail: alexanova@mail.ru

Пилавова Оксана Мильтиадовна — ассистент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО СтГМУ Минздрава России. 355100, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310. e-mail: alexanova@mail.ru

Учитывая, что НДСТ представляет собой аномалию тканевой структуры с уменьшением содержания отдельных видов коллагена или нарушением их соотношения, вызывающую снижение механической прочности ткани, что может приводить к нарушению течения процессов репарации, интерес представляет изучение иммуногистохимических особенностей стенки кисты при НДСТ с выявлением возможных предикторов возникновения рецидивирования ЭКЯ.

Однако в доступной литературе нами не найдена информация о гетерогенности строения стенки ЭКЯ в зависимости от наличия сопутствующей НДСТ. Особое значение имеет распределение коллагена различных типов.

Цель исследования: изучить иммуногистохимические особенности распределения коллагена I, III и IV типов в стенке ЭКЯ в зависимости от наличия сопутствующей НДСТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 70 пациенток с ЭКЯ, их разделили на две группы: *основную группу* составили 35 женщин, у которых было выявлено более шести внешних фенотипических признаков НДСТ; *группу сравнения* — 35 больных с шестью признаками НДСТ и менее. В обеих группах для исследования внешнего фенотипа применяли модифицированную фенотипическую карту, включающую 63 показателя [9]. Всем исследуемым женщинам проведены клиничко-лабораторное и инструментальное обследования, лечебно-диагностическая лапароскопия. Диагноз ЭКЯ подтвержден гистологически.

Всем пациенткам проводили качественное иммуногистохимическое определение коллагена I, III и IV типов в стенке ЭКЯ с фиксацией срезов в 10%-ном нейтральном формалине. Иммуногистохимические реакции ставили по общепринятой методике с демаскировкой антигенов в СВЧ-печи на серийных парафиновых срезах. Из парафиновых блоков по обычной технологии готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые фиксировали на стеклах, предварительно покрытых адгезивом (APES-ацетоном). Эндогенную пероксидазу блокировали 3%-ным раствором пероксида водорода в депарафиновых срезах. Далее проводили демаскировку антигена в СВЧ-печи в течение 20 минут при 600 В в растворенном цитратном буфере с pH = 6,0. В качестве первичных специфических антител использовали поликлональные антитела кролика, специфичные к коллагену человека I, III и IV типов («Имтек», Россия). В качестве вторичных антител применяли универсальный набор, содержащий конъюгат пероксидазы хрена с антителами овцы, специфичными к IgG, IgA, IgM кролика («Имтек», Россия). Результаты иммуногистохимических реакций для коллагена I, III и IV типов оценивали в баллах полуколичественным методом по проценту окрашенных клеток (табл. 1) [11].

Системный морфометрический анализ удаленных препаратов выполняли с помощью аппаратно-программного комплекса «Видео-Тест Морфология 5.0», состоящего из цифровой цветной системы ввода CF 2/3 (разрешение — 1360 × 1024), полифункционального микроскопа Olympus BX41 и компьютера PENTIUM IV, с использованием программного обеспечения «ВидеоТест-Морфология 5.0» (Санкт-Петербург, Россия).

Статистическую обработку полученных данных делали на компьютере PENTIUM IV с применением программы Statistica 6.0 [8]. Нами выполнялся расчет элементарных статистик: средних значений (M), ошибки средних (m), долей (%), стандартной ошибки доли (N). Качественные параметры в исследуемых группах сравнивали с помощью непараметрических методов χ^2 , критерия Фишера с поправкой Йейтса;

количественные показатели — с помощью непараметрического критерия Манна — Утн. Критерием статистической значимости получаемых выводов считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке уровней экспрессии коллагена I, III и IV типов подсчитывали средние арифметические показатели балльных оценок интенсивности иммуногистохимической реакции с последующей сравнительной оценкой в зависимости от наличия НДСТ (табл. 2).

При иммуногистохимическом выявлении коллагена I типа было установлено, что в капсуле ЭКЯ пациенток с НДСТ отмечается слабopоложительная реакция на этот коллаген. В капсуле ЭКЯ больных группы сравнения экспрессия коллагена I типа была умеренной и статистически значимо более интенсивной, чем в основной группе (см. табл. 2, рис. 1).

При определении коллагена III типа во всех ЭКЯ отмечена иммунопозитивная реакция в цитоплазме фибробластов, однако ее балльная оценка была статистически значимо выше при наличии НДСТ (см. табл. 2). Рыхлые коллагеновые волокна и насыщенная антигеном цитоплазма фибробластов в основной группе свидетельствовали о превалировании в стенке ЭКЯ при НДСТ рыхлой неоформленной соединительной ткани (рис. 2).

При выявлении коллагена IV типа в стенке ЭКЯ имела место отрицательная реакция во всех клеточных и волокнистых элементах соединительной ткани, вне зависимости от наличия НДСТ. Однако у пациенток основной группы, в отличие от больных группы сравнения, наблюдалась резко положительная реакция на коллаген IV типа в субэндотелиальном слое стенки некоторых сосудов (см. табл., рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении особенностей распределения коллагена различных типов в стенке эндометриоидных кист яичников (ЭКЯ)

Таблица 1

Балльная оценка интенсивности иммуногистохимической реакции

Баллы	6	4	2	0
Обозначение	+++	++	+	–
Количество положительных клеток, %	более 40	40–20	менее 20	–

Таблица 2

Балльная оценка интенсивности экспрессии коллагена I, III и IV типов в капсуле эндометриоидных кист яичников в зависимости от наличия недифференцированной дисплазии соединительной ткани, баллы ($M \pm m$)

Типы коллагена	Основная группа (n = 35)	Группа сравнения (n = 35)	P
I	2,94 ± 0,36	3,89 ± 0,24	0,005
III	5,66 ± 0,22	4,48 ± 0,37	0,042
IV	2,69 ± 0,30	1,28 ± 0,22	0,024

Рис. 1. Распределение коллагена I типа в капсуле эндометрионидных кист яичников в зависимости от наличия недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Окраска гематоксилином, 400-кратное увеличение. Фото авторов.

Примечание. А — основная группа: слабо выраженная экспрессия коллагена I типа. Б — группа сравнения: умеренно выраженная экспрессия коллагена I типа

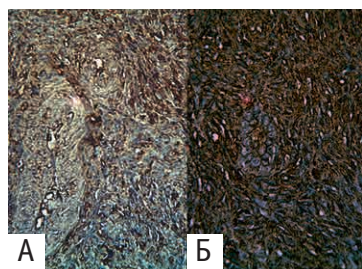


Рис. 2. Распределение коллагена III типа в капсуле эндометрионидных кист яичников в зависимости от наличия недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Окраска гематоксилином, 400-кратное увеличение. Фото авторов.

Примечание. А — основная группа: выраженная экспрессия коллагена III типа. Б — группа сравнения: умеренная экспрессия коллагена III типа

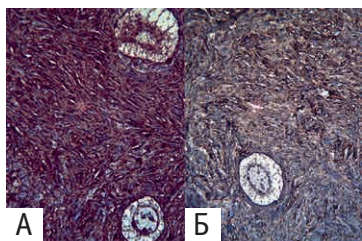
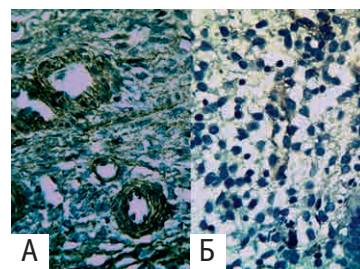


Рис. 3. Распределение коллагена IV типа в капсуле эндометрионидных кист яичников в зависимости от наличия недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Окраска гематоксилином, 600-кратное увеличение. Фото авторов.

Примечание. А — основная группа: выраженная экспрессия коллагена IV типа в стенке сосудов капсулы кисты. Б — группа сравнения: экспрессия коллагена IV типа в единичных сосудах капсулы кисты



было установлено преобладание экспрессии коллагена III типа фибробластами в капсуле кист при недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ), что указывает на наличие неоформленной соединительной ткани, характеризующейся высокой степенью васкуляризации. О продолжающемся неопластическом процессе свидетельствует и статистически значимо более интенсивная экспрессия коллагена IV типа в субэндотелиальном слое стенок сосудов ЭКЯ пациенток с НДСТ.

Вышеуказанное свидетельствует о значимом вкладе НДСТ в появление ЭКЯ, в то время как вопросы комплексной оценки влияния НДСТ на возникновение и прогрессирование эндометриоза яичников (ЭЯ) недостаточно изучены.

Углубленное исследование изменений, происходящих у пациенток с сопутствующей НДСТ, возможно, позволит расширить представления о патогенезе ЭЯ, разработать патогенетически обоснованную схему терапии, а также выделить группы риска возникновения рецидива.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В. С. Эндометриоз как проблема системной генетики // Журн. акушерства и женских болезней. 2013. Т. LXII, № 1. С. 71–78.
2. Брусицина В. Ю. Генетический полиморфизм и эндометриоз (обзор литературы) // Вестн. Уральской мед. акад. науки. 2009. № 4. С. 7–10.
3. Верещагина Г. Н. Системная дисплазия соединительной ткани. Метод. пособие для врачей. Новосибирск, 2008. 35 с.
4. Громова О. А., Торшин И. Ю. Дисплазия соединительной ткани, клеточная биология и молекулярные механизмы воздействия магния // Рус. мед. журн. 2008. Т. 16. № 1. С. 1–10.
5. Земцовский Э. В. Диспластические фенотипы. Диспластическое сердце. СПб., 2007. 80 с.
6. Кадурина Т. И., Горбунова В. Н. Дисплазия соединительной ткани. СПб., 2009. 701 с.
7. Клеменов А. В. Недифференцированные дисплазии соединительной ткани. М., 2005. 136 с.
8. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2002. 312 с.
9. Ягода А. В., Гладких Н. Н. Оценка комплекса внешних фенотипических признаков для выявления малых аномалий сердца // Клин. мед. 2004. Т. 82. № 7. С. 30–33.
10. Bulun S. E. Endometriosis // N. Eng. J. Med. 2009. Vol. 360. N 3. P. 268–279.
11. Colvin R. B., Bhan A. K., Cluskey R. T. Diagnostic immunopathology. N. Y., 1995. 820 p.
12. Fourquet J., Báez L., Figueroa M., Iriarte R. I. et al. Quantification of the impact of endometriosis symptoms on health-related quality of life and work productivity // Fertil. Steril. 2011. Vol. 96. N 1. P. 107–112.
13. Giuliani E., Parkin K. L., Lessey B. A., Young S. L. et al. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis // Am. J. Reprod. Immunol. 2014. Vol. 72. N 3. P. 262–269.
14. Nnoaham K. E., Hummelshoj L., Webster P., d'Hooghe T. et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries // Fertil. Steril. 2011. Vol. 96. N 2. P. 366–373.
15. Practice bulletin no. 114: management of endometriosis // Obstet. Gynecol. 2010. Vol. 116. N 1. P. 223–236.
16. Rimbach S., Ulrich U., Schweppe K. W. Surgical therapy of endometriosis: challenges and controversies // Geburtshilfe Frauenheilkd. 2013. Vol. 73. N 9. P. 918–923.
17. Yuan M., Wang W. W., Li Y., Gao L. et al. Risk factors for recurrence of ovarian endometriomas after surgical excision // J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. 2014. Vol. 34. N 2. P. 213–219. 