

УЧАСТИЕ МАКРОФАГОВ В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ СТЕНКИ МАТКИ ПРИ АДЕНОМИОЗЕ, ОСЛОЖНЕННОМ СИНДРОМОМ ТАЗОВОЙ БОЛИ

¹Оразов М.Р., ²Сулаева О.Н., ³Носенко Е.Н.

¹Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, ²Запорожский государственный медицинский университет, ³Одесский национальный медицинский университет

Резюме: Мета роботи – оцінити кількість і просторовий патерн макрофагів, встановити можливі механізми їх участі у ремоделюванні стінки матки при аденоміозі, ускладненому синдромом тазового болю. Проведено імуногістохімічний аналіз матеріалу, отриманого після гістеректомії 16 пацієнток з аденоміозом, з використанням моноклональних антитіл до CD68, VEGF, COX-2, ER, білкам нейрофібрилл. Результати обробляли в пакеті MedCalc. Показано, що аденоміоз супроводжується активацією ангиогенезу, ростом нервів і збільшенням числа макрофагів. Не виявлено прямого зв'язку між експресією ER, COX-2 і кількістю нервів чи чисельністю макрофагів. Проте, ріст нервів був асоційований з зростанням кількості судин ($p < 0,001$). Виявлено також зв'язок між кількістю судин і макрофагів ($r = 0,783$; $p < 0,001$), які ймовірно є основним джерелом VEGF.

Ключові слова: аденоміоз, тазовий біль, макрофаги, ангиогенез, нерви

Актуальность. Тазовая боль является одним из ведущих симптомов аденомиоза [3]. Непосредственной причиной развития болевого синдрома при этом считают рост нервов. Трактовка механизмов стимуляции роста нервов базирується на нескольких концепциях, которые предусматривают активацию центральных механизмов ноцицепции, роль эстрогенов, повышение продукции паракринных регуляторов, включая простагландины, фактор роста нервов и фактор роста сосудистого эндотелия [1, 5, 8, 10]. Одной из наиболее оригинальных трактовок патогенеза тазовой боли при аденомиозе является концепция «повреждение и репарации матки», предусматривающая формирование порочного круга, предопределяющего прогрессирующий рост эктопического эндометрия [9]. Согласно данной концепции, любые механические факторы, действующие на матку, могут вести к активации механизмов воспаления и репарации, сопровождающихся процессом ремоделирования стенки матки и стимуляцией роста сосудов и нервов.

Как известно, одним из ключевых участников процессов воспаления и ремоделирования разных органов являются макрофаги. Закономерно, что аденомиоз сопровождается повышением количества макрофагов в матке, являющихся источником продукции многочисленных цитокинов и факторов роста [5, 7]. Однако, какова связь и возможная роль макрофагов в перестройке структур матки при аденомиозе, ассоциированном с синдромом тазовой боли, известно мало. Целью данной работы стал

анализ участия макрофагов в ремоделировании стенки матки при аденомиозе.

Материал и методы. Для морфологического исследования использовали фрагменты стенки матки, полученные после гистерэктомии у 16 пациенток с диффузным аденомиозом 2-3 степени в фазе пролиферации, сопровождающимся выраженным болевым синдромом. В качестве контроля использовали материал, полученный от 5 пациенток с бессимптомной лейомиомой. После гистерэктомии участки стенки матки, включающие эндометрий и миометрий, фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине (pH 7,4) в течение 24 часов. После дегидратации материал заливали в высоко очищенный парафин с полимерными добавками (Richard-AllanScientific, США) при температуре не выше 60°C. Срезы толщиной 5 ± 1 мкм получали на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса срезов STS (CarlZeiss, 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. Для визуализации макрофагов использовали моноклональные антитела (МАТ) к CD68. Оценка иннервационного аппарата матки проводили с использованием МАТ к белкам нейрофиламентов, оценку чувствительности клеток разных тканей матки к эстрогенам использовали МАТ к ER. Учитывая известные данные о роли простагландинов и фактора роста сосудистого эндотелия в патогенезе болевого синдрома при эндометриозе, оценивали также экспрессию индуцибельной формы фермента синтеза

простагландинов – циклооксигеназы 2 типа (COX-2) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Для «демаскировки» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (ДАКО, Дания) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR при 450W 3 раза по 3,5 мин.

После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (ДАКО) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (ДАКО) наносили первичные антитела (RTU). Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции ДАКО EnVision+. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (ДАКО). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетической среде Permanent Mounting Medium (ДАКО). С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный морфометрический анализ, который проводили с помощью специального программного обеспечения Image Tool 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). Оценку результатов иммуногистохимического изучения экспрессии COX-2, ER и VEGF проводили с использованием Q-N шкалы [6]. Для оценки количества нервных волокон использовали квадратно-узловую тест-систему.

Среднее количество нервов, ассоциированных с очагами аденомиоза, оценивали следующим образом. Общее количество нервов в поле зрения при увеличении $\times 200$ делили на количество квадратов, попадающих на участки расположения эктопического эндометрия [12]. Аналогичным способом оценивали плотность нервных волокон в миометрии пациенток с аденомиозом и лейомиомой. При этом учитывали пространственную сопряженность нервных волокон с железами эндометрия, гладкими миоцитами, сосудами. Результаты представляли в виде среднего арифметического ($\pm SD$) количества нервов на миллиметр площади среза отдельно в эутопическом и эктопическом эндометрии, а также в миометрии.

Процедуру подсчета выполняли дважды при участии двух независимых экспертов

(двойное слепое исследование), неосведомленных о диагнозе и клинических характеристиках пациенток. Уровень конкордантности морфометрических результатов, полученных от независимых экспертов, составлял более 95%. Полученные данные обрабатывали в пакете MedCalc.

Результаты исследования.

Учитывая, эстроген-зависимый механизм развития аденомиоза, на первом этапе была проведена оценка чувствительности к эстрогенам. Выявлено наличие высокой экспрессии ER в эпителии эутопического и эктопического эндометрия, структурах стромы, умеренная реакция в гладких миоцитах миометрия. Но при этом рецепторы к эстрогенам не определялись ни в эндотелии, ни в гладких миоцитах сосудов матки, хотя в адвентиции сосудов была выявлена локальная экспрессия ER в ядрах отдельных клеток. Данные клетки визуализировались как вокруг крупных артерий миометрия, так и вдоль тонкостенных мелких сосудов, сопровождающих прослойки стромы в зонах ремоделирования миометрия, независимо от их связи с очагами эктопического эндометрия. Независимо от принадлежности ER-экспрессирующих клеток к той или иной линии, важно признать, что эстрогены могут напрямую влиять на иннервационный аппарат матки. Как известно, эстрадиол оказывает влияние на чувствительность периферических сенсорных нейронов, а также на активность симпатических нервов матки. С этих позиций интересным представлялся поиск ответа на вопрос, связана ли экспрессия ER с ростом нервов, который считают ведущим механизмом формирования болевых ощущений при аденомиозе. При визуализации иннервационного аппарата матки была выявлена пространственная диссоциация между ростом нервов и чувствительностью к эстрогенам.

Наименьшее количество нервов было выявлено на границе между эндометрием и миометрием, немногочисленными оказались также нервы вокруг эктопического эндометрия. В то же время максимум разветвлений нервных волокон был выявлен вокруг сосудов, которые, как было указано выше, характеризовались слабой экспрессией ER. Единственной зоной взаимной высокой экспрессии нейрофиламентов и рецепторов к эстрогенам был периваскулярный регион в зонах ремоделирования миометрия, где вокруг зон неоангиогенеза выявлялись нервные волокна и клетки с выраженной реакцией на

ER. Данные клетки могут относиться как к клеткам стромы, включая лейкоциты и макрофаги, участвующие в процессах ремоделирования, так и глиоцитами, сопровождающими и модулирующими рост нервов [1]. Учитывая наличие лимфо-гистиоцитарных инфильтратов в периваскулярном регионе, а также тот факт, что неотъемлемым участником процесса ремоделирования являются макрофаги, целесообразным представлялось оценить количество и распределение данных клеток в стенке матки при аденомиозе. Визуализация CD68 позитивных клеток выявила наличие большого количества диффузно расположенных макрофагов в эутопическом эндометрии – преимущественно в строме при отсутствии ассоциации с железами и сосудами. Несколько иной оказалась картина при анализе CD68 позитивных клеток в очагах аденомиоза. Здесь макрофаги выявлялись вокруг сосудов и эктопических желез. Неожиданной находкой оказалось увеличение количества макрофагов в миометрии пациенток с аденомиозом, по сравнению с таковым при лейомиоме ($p < 0,001$).

При этом CD68 позитивные клетки выявлялись во всех слоях миометрия, как вокруг крупных кровеносных сосудов мезометрия, так и в прослойках стромы между пучками гладких миоцитов, но в большей мере – вокруг сосудов. Кроме того, в большом количестве макрофаги определялись в участках лимфоцитарной инфильтрации стромы – особенно вокруг очагов аденомиоза с признаками дистрофии и десквамации клеток. Менее многочисленными оказались свободные макрофаги, одиночно расположенные между пучками гладких миоцитов. В целом, в миометрии определялась тесная ассоциация макрофагов с периваскулярным регионом. Учитывая, что макрофаги являются источником многочисленных медиаторов воспаления, а также принимая во внимание известные факты о роли простагландинов в развитии синдрома тазовой боли, была проведена оценка экспрессии ЦОГ-2.

Выявлено, что экспрессия ЦОГ-2 была максимально сопряжена с эу- и эктопическим эндометрием. Парадоксально, но, несмотря на наличие лейкоцитарной инфильтрации стромы

эндометрия и миометрия, в ней выявлялись лишь единичные клетки, экспрессирующие ЦОГ-2. Наличие ЦОГ-2 была выявлена лишь в единичных клетках, расположенных в/или вблизи стенки мелких сосудов миометрия. Не удивительно, что при данном распределении не было выявлено взаимосвязи между экспрессией ЦОГ-2 и макрофагами. Не выявлено взаимосвязи между распределением экспрессии ЦОГ-2, нервами и сосудами.

Хотя при этом параметры экспрессии ЦОГ-2 были умеренно сопряжены с сенситивностью структур матки к эстрогенам ($r_{\text{COX-2/ER}} = 0,812$, $p < 0,001$). В трактовке данного феномена целесообразно обсудить роль ЦОГ-2 и простагландинов в локальном повышении уровня эстрадиола, считающегося ключевым стимулятором процесса заживления при повреждении. Эксперименты на животных показали, что повреждение тканей сопровождается локальной продукцией эстрадиола из предшественников. Данный эффект обусловлен ИЛ-1 стимулированной активацией ЦОГ-2 и продукцией ПГЕ₂, который в свою очередь активирует STAR (steroidogenic acute regulatory protein – стероидогенный регуляторный белок) и P450 ароматазу [10, 11]. Благодаря этому тестостерон может локально превращаться под действием ароматазы в эстрадиол, оказывающий стимулирующий эффект на пролиферацию клеток и процессы репарации через ER2 [10]. Исходя из этого можно заключить, что экспрессия ЦОГ-2 и эстрогенов в большей мере связаны с ростом эктопического эндометрия, а не с ремоделированием сосудистого русла и иннервационного аппарата матки.

Учитывая сопряженность части нервов с сосудами и зафиксированный факт увеличения количества сосудов в миометрии [7], важно было также проанализировать источники продукции ключевого стимулятора ангиогенеза – фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Как показали результаты иммуногистохимического исследования, основным источником VEGF при аденомиозе являются эпителиальные структуры эндометрия, хотя значимая реакция на данный фактор роста определялась и в структурах миометрия.

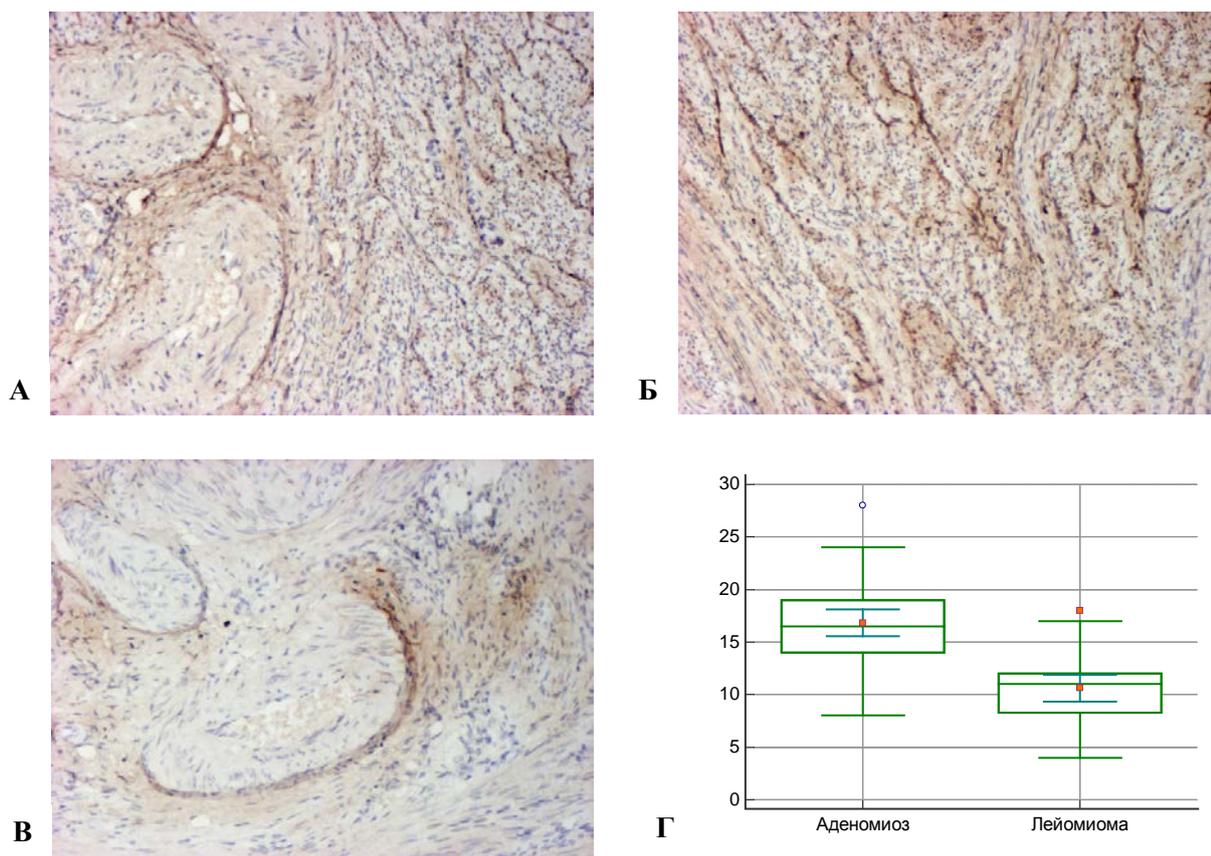


Рис. 1. Увеличение количества периваскулярных и интерстициальных нервных волокон у пациентки с аденомиозом.

Иммуногистохимическое исследование с применением МАТ к нейрофиламентам. Ув. 200. А – периваскулярные и Б – интерстициальные нервные волокна в миометрии пациенток с аденомиозом, В – нервные волокна в миометрии пациенток с лейомиомой, Г – Количество нервных волокон у пациенток с аденомиозом и лейомиомой.

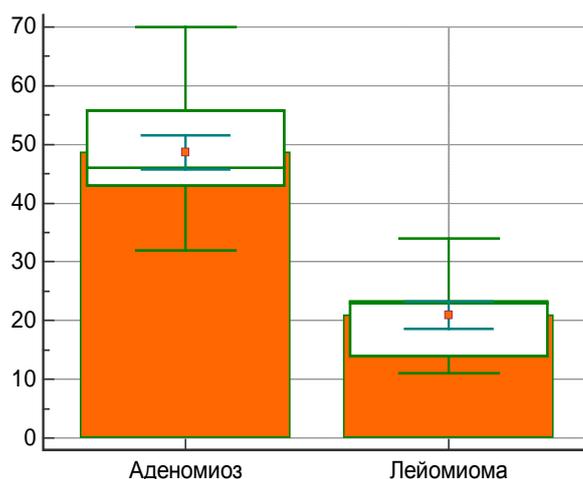


Рис. 2. Выраженность экспрессии ЦОГ-2 в эндометрии пациенток с аденомиозом и лейомиомой.

Примечание. По оси абсцисс – группы обследованных пациенток, по оси ординат – выраженность экспрессии, оцененная по Q-N шкале (в усл. ед.).

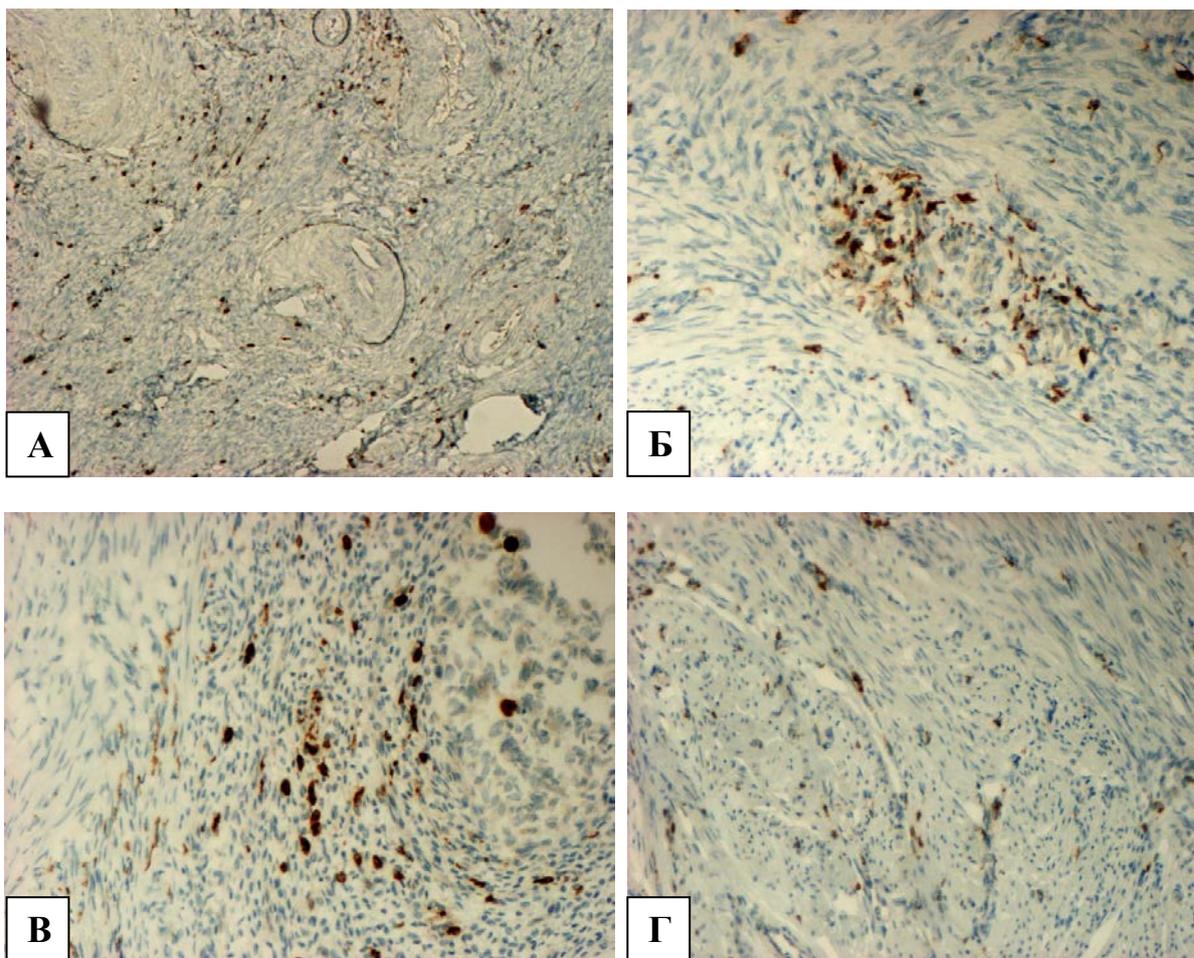


Рис. 3. Макрофаги в эндометрии и миометрии пациенток с аденомиозом. Иммуногистохимическое исследование с использованием МАТ к CD68. А – макрофаги в мезометрии, ув. 80; Б – периваскулярные макрофаги в строме миометрия между пучками гладких миоцитов, ув. 200; В – макрофаги в зоне инфильтрации, ув. 200; Г – интерстициальные макрофаги миометрия, ув. 200.

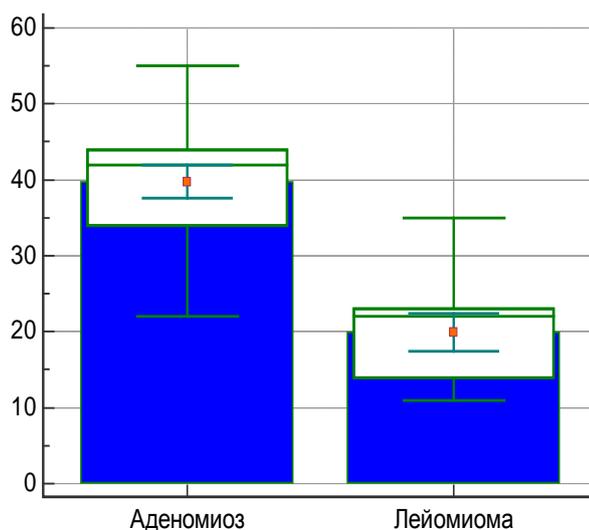


Рис. 4. Увеличение количества макрофагов в миометрии при аденомиозе по сравнению с лейомиомой. По оси абсцисс – исследуемые группы, по оси ординат – количество макрофагов.

Характерно, что экспрессия VEGF как в эндометрии ($p < 0,01$), так и в миометрии ($p < 0,001$) пациенток с аденомиозом, статистически значимо превышала аналогичный показатель у больных с лейомиомой. Этот факт позволяет утверждать наличие выраженной стимуляции ангиогенеза при аденомиозе, что учитывая структурно-функциональную ассоциацию сосудов и нервов, вероятно, является одним из ключевых факторов развития синдрома тазовой боли. Наиболее значимым продуцентом VEGF в эндометрии был покровный и железистый эпителий. В строме экспрессия данного фактора роста была ниже – лишь в 2% клеток стромы эутопического эндометрия определялась позитивная реакция на VEGF. Более обширной, в сравнении с эндометриальной стромой, оказалась экспрессия VEGF в миометрии пациенток с аденомиозом. Здесь большинство клеток имели слабую или умеренную цитоплазматическую реакцию на VEGF.

Интересно, что в мезометрии экспрессия VEGF была обнаружена как в цитоплазме гладких миоцитов, так и в стенке сосудов, где продуцентами данного фактора роста чаще всего являлись гладкие миоциты и клетки адвентиции. При этом выявлена тесная взаимосвязь между экспрессией VEGF с одной

стороны и количеством сосудов ($r = 0,712$, $p < 0,001$), нервов ($r = 0,589$, $p < 0,01$) и макрофагов ($r = 0,832$, $p < 0,001$) с другой.

Данные связи являются вполне закономерными, учитывая тот факт, что макрофаги являются одними из ключевых продуцентов VEGF, как впрочем, и других факторов роста. Учитывая отсутствие взаимосвязи количества макрофагов с экспрессией ЦОГ-2 при наличии сильной корреляции с VEGF, вероятно, ведущим типом макрофагов в стенке матки при аденомиозе является M2-фенотип [13]. Это, с одной стороны может отражать роль данных клеток в стимуляции ангиогенеза и роста нервов при аденомиозе. А с другой, может объяснять предрасположенность пациенток с аденомиозом к неопластической патологии.

Выводы: Полученные данные свидетельствуют о том, что при аденомиозе имеет место иммунопатологический процесс, сопровождающийся увеличением количества макрофагов в стенке матки. Причем данные клетки ассоциированы не только с зонами роста эктопического эндометрия, но и с перестройкой периваскулярного региона миометрия, являющегося носителем нервов и центром процессов ремоделирования стенки матки при данной патологии.

Список литературы

1. Benagiano G., Brosens I., Habiba M. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis // *Hum. Reprod. Update.* – 2014. – Vol. 20(3). – P. 386-402.
2. Berkley K. J., Dmitrieva N., Curtis K. S., Papka R. E. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2004. – Vol. 101(30). – P. 11094-11098.
3. Berkley K.J., Rapkin A.J., Papka R.E. The pains of endometriosis // *Science.* – 2005. – Vol. 308(5728). – P. 1587-1589.
4. Brosens I., Pijnenborg R., Benagiano G. Defective myometrial spiral artery remodelling as a cause of major obstetrical syndromes in endometriosis and adenomyosis // *Placenta.* – 2013. – Vol. 34(2). – P. 100-105.
5. Burney R.O., Giudice L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis // *Fertil. Steril.* – 2012. – Vol. 98(3). – P. 511-519.
6. Capobianco A., Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 9-12.
7. Cetin C., Serdaroglu H., Tuzlali S. The importance of endometrial nerve fibers and macrophage cell count in the diagnosis of endometriosis // *Iran J. Reprod. Med.* – 2013. – Vol. 11(5). – P. 405-414.
8. Goteri G., Lucarini G., Montik N. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha), and microvessel density in endometrial tissue in women with adenomyosis // *Int. J. Gynecol. Pathol.* – 2009. – Vol. 28(2). – P. 157-163.
9. Leyendecker G., Wildt L., Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2009. – Vol. 280(4). – P. 529-538.

10.Maia H. Jr., Casoy J., Correia T., Freitas L. Effect of the menstrual cycle and oral contraceptives on aromatase and cyclooxygenase-2 expression in adenomyosis // Gynecol. Endocrinol. – 2006. – Vol. 22(10). – P. 547-551.

11.Origoni M., Maggiore U.L.R., Salvatore S., Candiani M. Neurobiological Mechanisms of Pelvic Pain // Biomed. Res. Int. – 2014: 2014: 903848.

12.Wang G., Tokushige N., Markham R., Fraser I.S. Rich innervation of deep infiltrating endometriosis // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24(4). – P. 827-834.

13.Wang Y., Fu Y., Xue S. The M2 polarization of macrophage induced by fractalkine in the endometriotic milieu enhances invasiveness of endometrial stromal cells // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2013. – Vol. 7(1). – P. 194-203.

Impact of macrophages on uterus remodeling under adenomyosis complicated with pelvic pain syndrome

Abstract. The aim of the study was to define number and distribution of macrophages, as well as mechanisms of their impact on uterus remodeling under adenomyosis. The immunohistochemical investigation using monoclonal antibodies to CD68, VEGF, COX-2, ER and neurofilaments was conducted after hysterectomy among 16 patients with adenomyosis. Data were assessed using MedCalc. It was shown that adenomyosis is associated with activation of angiogenesis, nerves growth and increase of macrophages count. We have not found the relation between ER, COX-2 expression and number of nerves. Their growth was associated with blood vessels number($p<0,001$). We have demonstrated the relation between number of blood vessels and macrophages, which could be considered as the main source of VEGF($r=0,783$, $p<0,001$).

Key words: adenomyosis, pelvic pain, macrophages, angiogenesis, nerves