

**З.М.Дубоссарська
Л.П.Грек
В.Р.Скорик**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: еутопічний ендометрій, синдром хронічного тазового болю, імуногістохімічне дослідження, ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF.

*Надійшла: 21.08.2016
Прийнята: 12.09.2016*

УДК 618.14:618.132-071.4-036.1-008.6:618.112-097

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕУТОПІЧНОГО ЕНДОМЕТРІЮ У ПА- ЦІЄНТОК З АДЕНОМІОЗОМ ТА СИН- ДРОМОМ ХРОНІЧНОГО ТАЗОВОГО БОЛЮ

Реферат. Не зважаючи на значний перелік наукових робіт щодо синдрому хронічного тазового болю (ХТБ), залишається невизначеною роль патоморфологічних змін у еутопічному ендометрії для його розвитку. Мета - оцінити наявність зв'язків між морфологічними, імуногістохімічними (ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF) показниками та рівнем болю за ВАШ. В усіх досліджуваних випадках визначався аденоміоз. Порівняльний аналіз підгруп дозволив визначити певні тенденції та виявив статистично достовірні залежності ($p < 0,05$). Є необхідним подальше продовження досліджень з метою визначення статистично вагомих предикторних критеріїв формування ХТБ.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 129-134.

© З.М.Дубоссарська, Л.П.Грек, В.Р.Скорик, 2016

Dubossarskaya Z.M., Grek L.P., Skorik V.R. Morphological features eutopic endometrium in women with adenomyosis and chronic pelvic pain syndrome.

ABSTRACT. Background. Chronic pelvic pain syndrome is one of the most frequent pathologies that reduce quality of woman's life. The main reason for its occurrence is gynecological diseases (extragenital endometriosis, adenomyosis, uterine leiomyoma). But role of morphological changes in the endometrium for the occurrence of these diseases is still unexplored. **Objective.** Assess the links between morphological and immunohistochemical (markers ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF) features and the level of pain on VAS. **Methods.** 10 samples were divided according to expression of investigated marker in glands (ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF) and in stroma (ER, PGR, Ki-67). Rating staining immunohistochemical markers was conducted in at least 10 fields of view. Statistical processing of the data included nonparametric tests. **Results.** We observed heterogeneous expression of ER, PGR, more important role of high level expression PRG in stroma, increased proliferative activity in glands is focal in the most cases. Expression of VEGF is often higher, when the level of VAS is up. **Conclusion.** Formation of the CPP and adenomyosis is associated with hyperplastic processes of endometrium, increased proliferative activity, and severe expression of COX-2 ($p < 0.05$). **Key words:** Eutopic endometrium, chronic pelvic pain syndrome, immunohistochemical studies, ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF.

Citation:

Dubossarskaya ZM, Grek LP, Skorik VR. [Morphological features eutopic endometrium in women with adenomyosis and chronic pelvic pain syndrome]. *Morphologia*. 2016;10(3):129-34. Ukrainian.

Вступ

Синдром хронічного тазового болю (ХТБ) є однією з найчастіших причин значного погіршення якості життя жінок як репродуктивного віку, так і після менопаузи [1]. Частота скарг спостерігається у близько п'ятої частини жіночої популяції, що відповідає рівню звернень із астмою та болем у спині [2, 3]. Серед багатьох причин ХТБ лідером є гінекологічні захворювання, серед яких найчастіше зустрічаються зовнішній ендометріоз, лейоміома тіла матки, аденоміоз [4].

Механізм формування ХТБ включає сенситизацію периферійних нервових рецепторів та залучення їх «неактивованого» резерву з наступним підвищенням збудливості нейронів центральної нервової системи на фоні спонтанної акти-

вації периферійних рецепторів чи без неї. До причин зміни активності місцевих нервових рецепторів відносять їх довготривалу компресію та ушкодження через вrostання в останні, наприклад, ектопічного ендометрію, та, найбільш часто, формування вогнища запалення. Такий осередок є наслідком підвищення концентрації стероїдних гормонів, що збільшує проліферацію клітин, а отже і механічний вплив, та синтезу медіаторів запалення. Проте, опубліковані дані також наголошують на значенні стану еутопічного ендометрію, для формування саме центральної сенситизації, яка вже може бути не пов'язана із периферійними стимулами [5, 6]. Підґрунтям для зміни точки зору стало визначення в невеликому числі випадків периферійної

хронічної травматизації (травма, запалення, інфекції) як причини змін у корі мозку [7].

Таким чином, дослідження статусу еутопічного ендометрію у пацієток із синдромом ХТБ, з одного боку, дозволить визначити діагностичну та патогенетичну роль змін в ньому під час формування ХТБ, а з іншого, покращить розуміння патогенезу розвитку аденоміозу та зовнішнього ендометріозу, як компонентів виникнення ХТБ.

Мета

Проаналізувати проліферативну та запальну активність залозистого та стромального компонентів еутопічного ендометрію, наявність в ньому нервових волокон, як механізмів формування ХТБ.

Матеріали та методи

До нашого дослідження увійшло 10 випадків еутопічного ендометрію пацієток із синдромом ХТБ, який було отримано під час діагностичного чи лікувально-діагностичного вишкрібання порожнини матки на базі КЗ «ДОПЦС» ДОР та гінекологічного відділення КЗ «КОШМД» ДОР за період 2012-2016рр.. Середній вік становив $38,89 \pm 2,07$ р. В усіх пацієток діагностовано аденоміоз. У 4 із 10 також визначено лейоміому тіла матки, у 2 з 10 – кісти яєчника (фолікулярна, лютеїнова). Силу больового синдрому оцінювали за допомогою візуально-аналогової шкали (ВАШ): всі пацієтки зазначили рівень болю вище помірного – із мінімальним значенням 55 балів та максимальним – 95, середній показник склав $77,7 \pm 4,67$. Морфологічний аналіз включав гістологічне дослідження мікропрепаратів еутопічного ендометрію, забарвлених за стандартною методикою гематоксиліном і еозином, та імуногістохімічне дослідження (на зрізах товщиною 4мкм відповідно до протоколів компанії-виробника ThermoScientific (TS) (США) із використанням системи візуалізації Quanto та DAB Chromogen). Оцінювання гістологічної будови та одержаних імуногістохімічних реакцій проводилось за допомогою мікроскопу LeicaDM 2000 при збільшенні 100x, 400x, 1000x. Для маркерів ER ab-1 (клон sp-1, TS, розведення 1:200), PGR (клон YR85, TS, розведення 1:200), Ki-67 (клон sp6, TS, розведення 1:250) як специфічна реакція розцінювалось коричневе ядерне забарвлення, для первинних антитіл VEGF ab-1 (поліклон, TS, розведення 1:800), COX-2 (клон sp21, TS, розведення 1:100), NF (DAKO Cytomation) - мембранне та/чи цитоплазматичне забарвлення залозистого компоненту ендометрію. Характер експресії імуногістохімічних маркерів аналізувався напівкількісним методом. Для Ki-67 підраховувався відсоток клітин із специфічним забарвленням із 100 клітин у не менш ніж 10 полях зору при збільшенні 400x [7]. Для маркерів ER, PGR, спираючись на відсоток позитивних клітин та ступінь інтенсивності їх забарвлення (слабкий (коєфіцієнт (k) - 1), помірний (k=2), виражений (k=3)),

розраховувався індекс H-score за формулою $[1 \times (\% \text{ клітин із } k=1) + 2 \times (\% \text{ клітин із } k=2) + 3 \times (\% \text{ клітин із } k=3)]$ [8]. За отриманим індексом випадки були розподілені на групу із низькою ($1+ = 100 > H > 0$), помірною ($2+ = 200 > H > 101$) та вираженою ($3+ = 300 > H > 201$) експресією. Характер реакції із VEGF, COX-2, оцінювались в залежності від відсотку забарвлених клітин, а саме: 1+ (від 0% до 25%), 2+ (26-50%), 3+(51-75%), 4+(>75%). Експресія NF вважалась позитивною за умови забарвлення більше 5% клітин [9, 10].

Для статистичної обробки даних використовувались варіаційні методи (середня арифметична, стандартна похибка середньої арифметичної), екстенсивні показники (відсоткова частка, %), непараметричний критерій кореляції Спірмена, що обчислювались за допомогою програми Statistica 17.0.

Результати та їх обговорення

До гістологічних особливостей всіх досліджуваних спостережень ендометрію можна віднести наступні: збільшення співвідношення залози-stroma до 2:1; зміну розміру та форми залоз (збільшення, утворення папіл, звитість); проліферація епітелію (псевдостратифікація, рівний апікальний край клітин, деякі ядра є світлими із конденсованим хроматином, наявність поодиноких нормальних мітозів) (рис. 1).

Наведені зміни відповідають мікроскопічним критеріям порушення проліферації ендометрію (8 випадків) та у 2-х випадках — із більш вираженими змінами (співвідношення залози:stroma більше 3:1) гіперплазії [12]. Щодо стромі: ядра клітин нормохромні чи світлі, переважно, округлі чи витягнуті, із помітною прозорою цитоплазмою. Такі зміни по типу «децидуїзації» є проявом збільшення впливу прогестерну. Спираючись на вищенаведене, ми можемо говорити, що наявність аденоміозу та ХТБ асоціюється із гіперпластичними процесами в еутопічному ендометрії.

До панелі досліджуваних імуногістохімічних маркерів відносились: визначення стероїдних рецепторів ER, PGR, аналіз проліферативної активності стромі та залоз за експресією Ki-67, характеристика рівня продукції клітинами ендометрію факторів ангіогенезу VEGF та прозапальних ензимів COX-2, та наявність нервових волокон у стромі (NF), як достовірного показника розповсюдження ендометрію [13]. Отримані дані наведено у таблиці 1.

Експресія ER у залозистому епітелії мала гетерогенний характер у 6 спостереженнях (із 10 випадків, 60%), тобто забарвлення низької інтенсивності виначалось у більшості клітин, тоді як виражений ступінь мали поодинокі клітини, із загальною кількістю не більше 10%. Отже, за шкалою H-score експресія знаходилась в межах від 2+ (127) до 3+ (229) за умови наявності 92% і 96% забарвлених клітин відповідно.

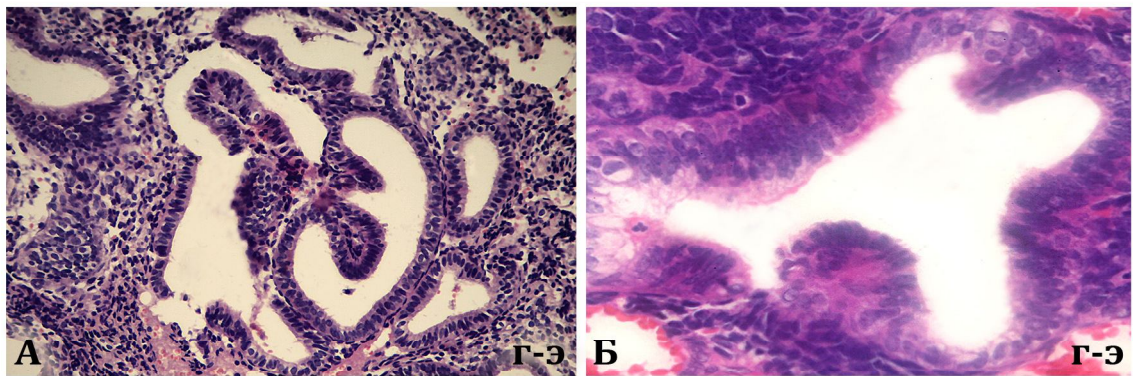


Рис. 1. Випадок ендометрію із гіперпластичними змінами, забарвлення гематоксиліном та еозином. А. Збільшення співвідношення залози-stroma, збільшення розміру залоз, утворення папіл, звитість. $\times 400$. Б. Змінення розміру та форми залоз, псевдостратифікація. $\times 1000$.

Таблиця 1
Експресія ER, PGR, Ki-67, COX-2, VEGF в еутопічному ендометрії

№	Експресія ER				Експресія PGR				Експресія Ki-67		Експресія VEGF	Експресія COX2	ВАНШ
	залози		stroma		залози		stroma		залози	stroma			
	Н	%	Н	%	Н	%	Н	%	%	%			
1	18	14	36	28	51	39	86	52	6	13	2+	3+	90
2	127	92	108	47	186	83	174	79	21	9	3+	1+	65
3	194	89	173	68	219	93	197	86	11	4	1+	3+	90
4	132	84	79	36	102	76	123	48	6	3	3+	2+	70
5	203	92	184	79	209	95	193	91	7	2	3+	2+	95
6	153	86	131	72	133	81	126	77	19	11	2+	1+	75
7	112	74	91	51	118	76	169	81	14	12	1+	3+	55
8	229	96	203	91	248	97	216	94	21	13	3+	0	95
9	131	61	87	42	143	68	104	49	10	2	0	0	67
10	207	94	179	81	229	96	181	77	13	8	1+	0	75
p*	0,627	0,415	0,567	0,482	0,445	0,509	0,482	0,485	0,039	0,085	0,376	0,027	

*Примітка. Залежність вірогідна при $p < 0,05$.

У стромі H-score для ER становив від 1+ до 2+ та у 1 випадку - 3+. При порівнянні особливостей експресії ER у залозистому компоненті та у стромі ми помітили наступні тенденції. У 4 із 10 випадків (40%) експресія у стромі як за відсотком позитивних клітин, так і за індексом Н, нижче за забарвлення епітелію на ER до 10%, що відповідає співвідношенню у нормальному ендометрію в фазі проліферації [13]. Але в інших 6 спостереженнях (60%) строма мала значно нижчий показник (до 50%), аніж епітелій, що вказує на більшу активність залоз, ніж стромі. Тобто можна припустити, що фактором розповсюдження ендометрію поза внутрішній шар матки є підвищення функціональної активності залоз на ER. Також треба помітити, що найвищі показники Н для ER зустрічались у випадках із високим ВАНШ (від 75 до 95) (рис. 2 А), хоча статистичної вірогідної залежності не встановлено між експресією ER у стромі, залозах та ВАНШ ($p > 0,05$ за всіма показниками).

Щодо PGR, його експресія також супроводжувалась ефектом гетерогенності. У 4 випадках (40%) забарвлення вираженого ступеня було характерне не більше ніж для 10% клітин епітелію. У 3 із 10 випадків (30%) реакція у стромі більш виражена, ніж у залозах. На користь чого в цих випадках свідчить визначення ознак децидуації стромі. З одного боку, таку картину можна спостерігати в нормальному ендометрії під час середньої фази проліферації, проте розбіжність між забарвленням строма/залози є значно меншою (до 10%). Приблизно схожий результат забарвлення на PGR у стромі і у залозах отримано у 4 випадках (40%), а більшу експресію в епітелії, ніж у стромі - у 3 спостереженнях (30%) (рис. 2 Б). Таким чином, за реакцією із PGR активність стромі та залоз мають відносно рівнозначні ролі у можливому розповсюдженні ендометрію та формуванні больового синдрому. Щодо статистичного аналізу: не підтверджено зв'язку із рівнем ВАНШ ($p > 0,05$ за всіма показниками).

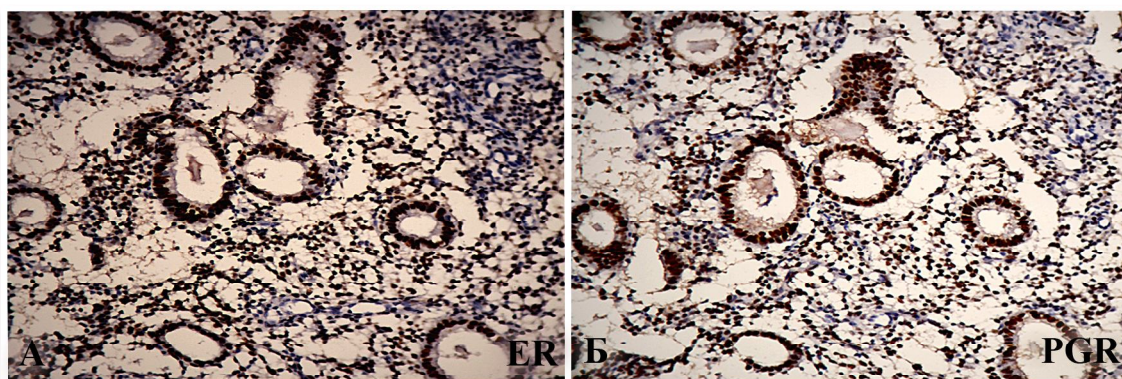


Рис. 2. Випадок ендометрію із гіперпластичними змінами, забарвлення імуногістохімічним методом, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра ($\times 400$). А. Виражена експресія (3+) ER у залозах, помірно виражена (2+) – у стромі. Б. Виражена експресія (3+) PGR у залозах, помірно виражена (2+) – у стромі.

При порівнянні експресії ER та PGR ми визначили наступне. По-перше, строма, забарвлена на PGR, у половині випадків (50%) має вищі показники відсотку клітин із реакцією та за H-score, аніж строма, забарвлена ER, а в інших 5 спостереженнях – результати, що несуттєво відрізняються від ER. По-друге, лише в 1 випадку визначено більший H-індекс та загальний відсоток позитивних клітин для ER порівняно з PGR. Такі особливості експресії свідчать в якості підтвердження значення прогестерон-активованої стромі для розповсюдження ендометрію та виникнення хронічного болю.

Характеристика проліферативної активності за експресією Ki-67 у залозах у більшості випадків знаходилась в інтервалі від 10 до 20% (2 із 10 випадків, 20%). Менше 10% та більше 20% епітеліоцитів, що вийшли із фази G₀, спостерігалося у 2 випадках для кожного показника. Необхідно помітити, що для більшості спостережень була характерна осередкова значно підвищена проліферація у залозах (6 із 10 випадків, 60%), тоді як високий індекс Ki-67 рівномірно у всіх залозах зустрічався лише у двох спостереженнях (рис. 3 А). У стромі проліферативна активність мала розбіг від 2% до 13%. При чому найбільші показники були отримані в тих випадках, де визначалась і вища експресія Ki-67 у залозах, окрім 1 випадку, де строма мала більший індекс проліферації, аніж залози. Отже, забарвлення на Ki-67 визначило значну активацію залозистого епітелію, яка носить повсякчасний чи осередковий характер, та відповідну проліферацію стромі, що має прямий слабкої сили зв'язок із рівнем ВАШ ($p < 0,05$).

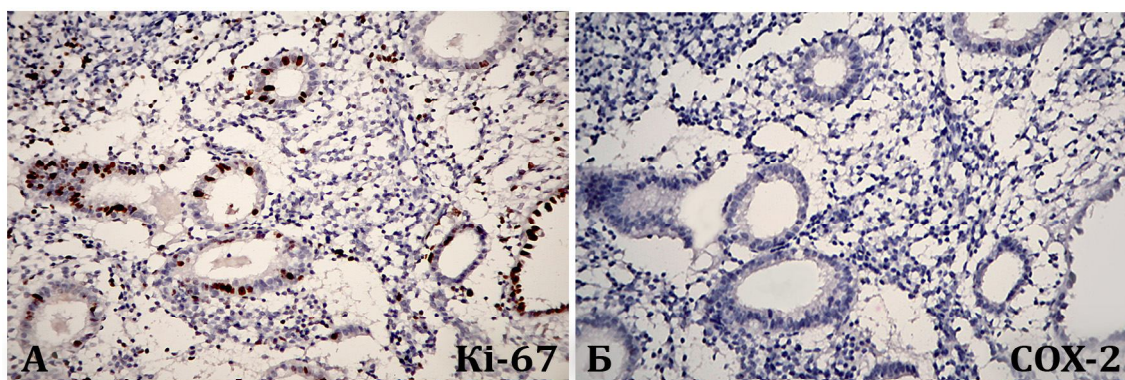


Рис. 3. Випадок ендометрію із гіперпластичними змінами, забарвлення імуногістохімічним методом, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра ($\times 400$). А. Експресія Ki-67 $> 10\%$, осередковий характер. Б. Відсутність забарвлення на COX-2.

Маркер COX-2 визначає циклооксигеназу-2 в клітині, концентрація якої збільшується внаслідок стимулювання цитокінами, що відіграє важливу роль у продукції простагландинів та формування осередку запалення [9]. У залозах було відмічено його виражену (3+) та помірно виражену (2+) експресію у половині спостережень (5 із 10 випадків, 50%). У другій половині – визначались слабкої інтенсивності та негативний характер експресії (2 (20%) та 3 (30%) випадки відповідно) (рис. 3 Б). Враховуючи той факт, що циклооксигеназа-2 також відіграє роль у відпові-

жену (2+) експресію у половині спостережень (5 із 10 випадків, 50%). У другій половині – визначались слабкої інтенсивності та негативний характер експресії (2 (20%) та 3 (30%) випадки відповідно) (рис. 3 Б). Враховуючи той факт, що циклооксигеназа-2 також відіграє роль у відпові-

ді клітини на дію факторів росту, підвищення її кількості у епітеліоцитах, з одного боку, є відображенням збільшеної стимуляції естрогеном, а з іншого, показником первинності активації залоз, з наступним залученням стромі. Також потрібно відмітити, що у випадках із вираженою та помірно вираженою експресією COX-2 визначався високий рівень ВАШ. Цю залежність було підтверджено статистично: $p < 0,05$.

У 5 з 6 випадків (83,3%) із високим рівнем ВАШ визначалась виражена чи помірно виражена експресія VEGF, хоча статистичного підтвердження такої залежності не отримано ($p > 0,05$). Фенотип спостереження із VEGF(1+)-статусом та значенням ВАШ 90 характеризувався високими цифрами експресії стероїдних гормонів (2+/3+(ER 194/ PGR 219)), високою осередковою проліферацією епітеліоцитів та вираженим забарвленням на COX-2 (3+). Тому, можливо, високий больовий рівень у даної пацієнтки аргументовано, у комплексі, збільшеною експресією зазначених маркерів. Таким чином, ми можемо наголосити на наступних тенденціях. По-перше, епітелій залоз відіграє значну роль в стимуляції ангиогенезу в більшості випадків (60%). По-друге, больовий синдром можуть обумовлювати досліджувані чинники як окремо, так і в комбінації між собою.

В жодному випадку ми не визначили забарвлення на маркер нервової тканини NF, що дозволяє стверджувати відсутність проростання нервових волокон та утворення «нервового спру-

тингу» у ендометрії за умови наявності ХТБ та аденоміозу.

Висновки

Аналіз гістологічних та імуногістохімічних особливостей еутопічного ендометрію у пацієток із аденоміозом та синдромом ХТБ дозволив зробити наступні висновки:

1. Аденоміоз та ХТБ асоційовані із гіперпластичними змінами ендометрію, які виражаються у збільшенні гетерогенності експресії стероїдних гормонів.

2. Статистично достовірного значення між рівнем експресії VEGF, ER, PGR (у залозах та стромі) не встановлено, проте для 90% випадків характерним є вираженіше забарвлення стромі на PGR, ніж на ER.

3. Відповідно до збільшення проліферативної активності залозистого епітелію за Ki-67 та підвищення експресії COX-2 зростає рівень болю за ВАШ ($p < 0,05$ за всіма показниками).

4. Відсутність забарвлення на один з досліджуваних маркерів не є критерієм відсутності розповсюдження ендометрію та розвитку ХТБ, через можливість впливу на ці процеси інших показників.

Перспективи подальших розробок

Вищезазначені дані свідчать про необхідність продовження пошуку показників, що статистично достовірно вважатимуться предикторними критеріями для розповсюдження ендометрію та формування ХТБ.

Літературні джерела References

1. Romao AP, Gorayeb R, Romao GS, PoliNeto OB, dos Reis FJ, Rosa-e-Silva JC, Nogueira AA. High levels of anxiety and depression have a negative effect on quality of life of women with chronic pelvic pain. *International Journal of Clinical Practice*. 2009; 63:707-711. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2009.02034.x

2. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, Boulet LP. Global asthma prevalence in adults: Findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012; 12:204. DOI: 10.1186/1471-2458-12-204

3. Hoy D, Bain C, Williams G, March L, Brooks P, Blyth F, Woolf A, Vos T, Buchbinder R. A systematic review of the global prevalence of low back pain. *Arthritis and Rheumatism*. 2012; 64:2028-2037. DOI: 10.1002/art.34347

4. Ahangari A. Prevalence of chronic pelvic pain among women: an updated review. *Pain Physician*. 2014; 17(2): E141-E147. PMID: 24658485

5. Chin ML, Fillingim RB, Ness TJ. *Pain in Women*. Oxford University Press. 2013. 334p.

6. Kaya S, Hermans L, Willems T, Roussel N,

Meeus M. Central sensitization in urogynecological chronic pelvic pain: a systematic literature review. *Pain Physician*. 2013; 16(4): 291-308. PMID: 23877446

7. Baranowski AP, Abrams P, Berger RE, Buffington CA, de CWAC, Hanno P, Loeser JD, Nickel JC, Wesselmann U. Urogenital pain-time to accept a new approach to phenotyping and, as a consequence, management. *Eur Urol* 2008; 53:33-36. PMID: 17961909 DOI: 10.1016/j.eururo.2007.10.010

8. McCarty KS, Miller LS, Cox EB, Konrath J, and McCarty KS. Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med*. 1985; 109: 716-721. PMID:3893381.

9. Buchweitz O, Staebler A, Wulfing P, Hausman E, Greb R, Kiesel L. COX-2 overexpression in peritoneal lesions is correlated with nonmenstrual chronic pelvic pain. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;124(2):216-221. PMID: 16309818 DOI: 10.1016/j.ejogrb.2005.09.016

10. Barcena de Arellano ML, Wagner MF, Ol-

deweme J, Arnold J, Ebert A, Schneider A, Mechsner S. Neurotrophin expression is not affected in uteri of women with adenomyosis. *J Mol Neurosci.* 2012b;47:495-504.

11. Robert JK, Maria LC, Simon H, Robert HY. WHO Classification of tumors of female reproductive organs. Lyon: International Agency for research on Cancer Press; 2014. 307 p.

12. Stratton P, Berkley KJ. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the rela-

tionship and implications. *Human reproduction update* 2011; 17(3): 327-346. PMID: 21106492
PMCID: PMC3072022 DOI: 10.1093/humupd/dmq050

13. Ashhab MH, Vladimirseva AL, Shelastyna NN, Babychevko YY. [Immunohistochemical study of steroid hormone receptor expression in the endometrium of women in the normal menstrual cycle]. *Vestnik Russian University of friendship of people. Series: Medicine.* 2002;(1) 54-59. Russian

Дубоссарская З.М., Грек Л.П., Скорик В.Р. Морфологические особенности эутопичного эндометрия у пациенток с аденомиозом и синдромом хронической тазовой боли.

Реферат. Несмотря на большой перечень научных работ по синдрому хронической тазовой боли (ХТБ), остается неопределенной роль патоморфологических изменений в эутопичном эндометрии для его развития. Цель - оценить наличие связей между морфологическими, иммуногистохимическими (ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF) показателями и уровнем боли по ВАШ. Во всех исследуемых случаях определялся аденомиоз. Сравнительный анализ подгрупп позволил определить некоторые тенденции и обнаружил статистически достоверные зависимости ($p < 0,05$). Является необходимым дальнейшее продолжение исследований с целью определения статистически значимых предикторных критериев формирования ХТБ.

Ключевые слова: эутопичный эндометрий, синдром хронической тазовой боли, иммуногистохимическое исследование, ER, PGR, Ki-67, VEGF, COX-2, NF.