

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В РАЗВИТИИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА ПРИ АДЕНОМИОЗЕ

Запорожский государственный медицинский университет

Для оценки участия макрофагов в развитии болевого синдрома при аденомиозе проведено пилотное изучение распределения в стенке матки нервных волокон и макрофагов, выявленных иммуногистохимически с использованием моноклональных антител к белкам нейрофиламентов и CD68. Показано наличие зональной гетерогенности количества и морфологических характеристик нервных волокон в миометрии при аденомиозе. Максимальное количество нервных волокон было выявлено вокруг крупных артерий сосудистого слоя миометрия и в периваскулярных зонах участков ремоделирования миометрия на фоне их лейкоцитарной инфильтрации. Оценка CD68+ клеток выявила большое количество макрофагов в периваскулярном компартменте и вокруг конусов роста эктопических желез эндометрия. Таким образом, развитие болевого синдрома при аденомиозе ассоциировано с увеличением количества нервных волокон и макрофагов в периваскулярном регионе и зонах ремоделирования миометрия.

Ключевые слова: аденомиоз, нервные волокна, ангиогенез, макрофаги

Работа является фрагментом НИР «Морфофункціональні особливості слизових оболонок і внутрішніх органів людини і тварин в нормі і після введення антигену», № гос. Регистрации 0103U00939.

Введение. Эндометриоз, занимающий 3-е место в структуре гинекологической патологии у женщин репродуктивного возраста, является актуальной проблемой медицины [1, 3]. Помимо угрозы бесплодия, данная патология может сопровождаться вращением эктопического эндометрия вглубь стенки матки (аденомиоз), что ассоциировано с развитием синдрома хронической тазовой боли [3]. Традиционная трактовка механизмов развития болевого синдрома при аденомиозе базируется на постулате об усилении роста нервных волокон. Действительно, в экспериментальных моделях аденомиоза выявлено увеличение плотности нервных окончаний в эндометрии и вокруг эктопических маточных желез [2]. Не менее интересной представляется концепция воспалительного ремоделирования стенки матки, сопровождающегося развитием лейомиоматоза и усилением ноцицепции [5]. Как известно, одним из важнейших участников

ремоделирования органов являются макрофаги, секретирующие не только широкий спектр цитокинов и ферментов, но и являющиеся источником факторов роста [6]. Однако какова роль макрофагов в формировании болевого синдрома при аденомиозе известно мало.

Цель исследования: определить участие макрофагов в ремоделировании стенки матки и развитии болевого синдрома при аденомиозе.

Материалы и методы. Для морфологического исследования использовали фрагменты стенки матки, полученные после гистерэктомии у 3 пациенток с диффузным аденомиозом 2-3 степени в фазе пролиферации, сопровождающимся выраженным болевым синдромом. После гистерэктомии участки стенки матки, включающие эндометрий и миометрий, фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине (рН 7,4) в течение 24 часов. После дегидратации материал заливали в высокоочищенный парафин (Richard-Allan Scientific, США). Срезы, толщиной 5 ± 1 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также с использованием иммуногистохимии. Для визуализации нервных волокон использовали моноклональные антитела (МАТ) к белкам нейрофиламентов, оценку количества и пространственного распределения макрофагов проводили с помощью МАТ к CD68 согласно стандартному протокола. Оценка количества клеток проводили в 10 полях зрения каждого препарата при увеличении $\times 200$ (окуляр 10, объектив 20) с участием двух независимых специалистов. Статистическую обработку данных проводили в программе MedCalc.

Результаты исследования и их обсуждение. Изучение иннервационного аппарата матки при аденомиозе, ассоциированным с выраженным болевым синдромом, выявило лишь единичные тонкие нервные волокна в области границы между эктопическим эндометрием и миометрием. Отдельные тонкие волокна визуализировались вокруг очагов эктопического эндометрия, преимущественно вокруг конусов роста маточных желез. Более многочисленными оказались нервные волокна в миометрии. Максимальное количество нервных волокон в стенке матки пациенток с аденомиозом было выявлено вокруг крупных артерий сосудистого слоя миометрия и в пространствах между ними (**рис. 1**). Кроме того, обширные разветвления тонких

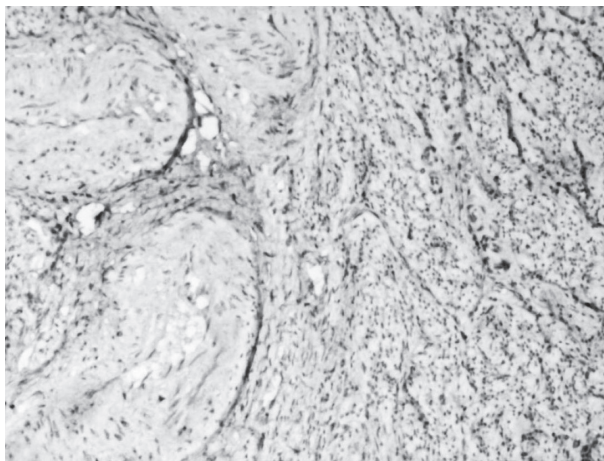


Рис. 1. Увеличение количества нервных волокон в миометрии при аденомиозе, сопровождающемся болевым синдромом.

Примечание. Иммуногистохимическое исследование с применением МАТ к белкам нейрофиламентов. Ув. 200.

нервных волокон были выявлены в зонах ремоделирования миометрия – по ходу мелких сосудов, расположенных в прослойках стромы между пучками гладких миоцитов.

Изучение внутриорганного сосудистого русла матки продемонстрировало усиление ангиогенеза в оболочках матки при аденомиозе. Эти изменения развивались на фоне лейкоцитарной инфильтрации эндометрия и миометрия, сопровождающей очаги аденомиоза, что, по сути, отражает ассоциацию эктопического роста маточных желез с воспалительным процессом. Однако эти факты не объясняют непосредственные причины развития болевого синдрома у пациенток с аденомиозом. Согласно современной концепции нейро-иммунных

взаимодействий, одной из потенциальных причин усиленного ангиогенеза, роста нервов и болевого синдрома может быть гиперактивация макрофагов [4, 6].

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить наличие диффузной сети макрофагов в эндометрии и миометрии пациенток с аденомиозом. При этом CD68 позитивные клетки определялись во всех слоях миометрия, как вокруг крупных кровеносных сосудов мезометрия, так и в прослойках стромы между пучками гладких миоцитов. Морфометрический анализ показал широкую вариабельность количества миометриальных макрофагов, численность которых варьировала в разных полях зрения от 4 до 22 при медиане $11,8 \pm 0,77$ (95 % ДИ 9,33-12,61). Оценка характера распределения признака выявила бимодальный характер (рис. 2А), указывающий на неоднородность оцениваемого показателя. В поисках причин данной неоднородности был проведен анализ пространственного распределения макрофагов в миометрии с учетом структурно-функциональной ассоциации и зональной гетерогенности миометрия. С этой целью был проведен подсчет количества CD68+ клеток в периваскулярном регионе, вокруг эктопического эндометрия и в толще гладкой мышечной ткани. Проведенный анализ выявил статистически значимые различия распределения макрофагов в разных функциональных зонах миометрия (рис. 2Б). Закономерно была преимущественно периваскулярная локализация CD68 позитивных клеток. Кроме того, в большом количестве макрофаги выявлялись в участках лейкоцитарной инфильтрации стромы – особенно вокруг очагов аденомиоза с признаками дистрофии и десквамации клеток (рис. 3). Менее многочисленными оказались свободные макрофаги, одиночно расположенные между пучками гладких миоцитов. Количественный анализ показал превалирование

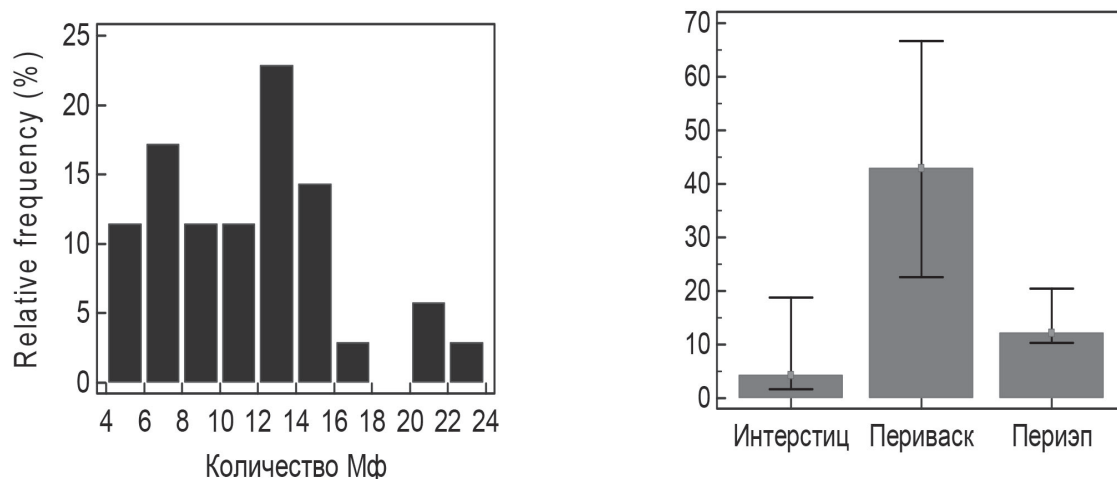


Рис. 2. Распределение макрофагов в стенке матки при аденомиозе. А – гистограмма распределения количества макрофагов при суммарном подсчете (по оси абсцисс – количество макрофагов в поле зрения (абс.), по оси ординат – частота регистрации признака в %). Б – количество макрофагов в разных функциональных компартаментах миометрия (по оси абсцисс – зоны миометрия, по оси ординат – количество CD68+ клеток).

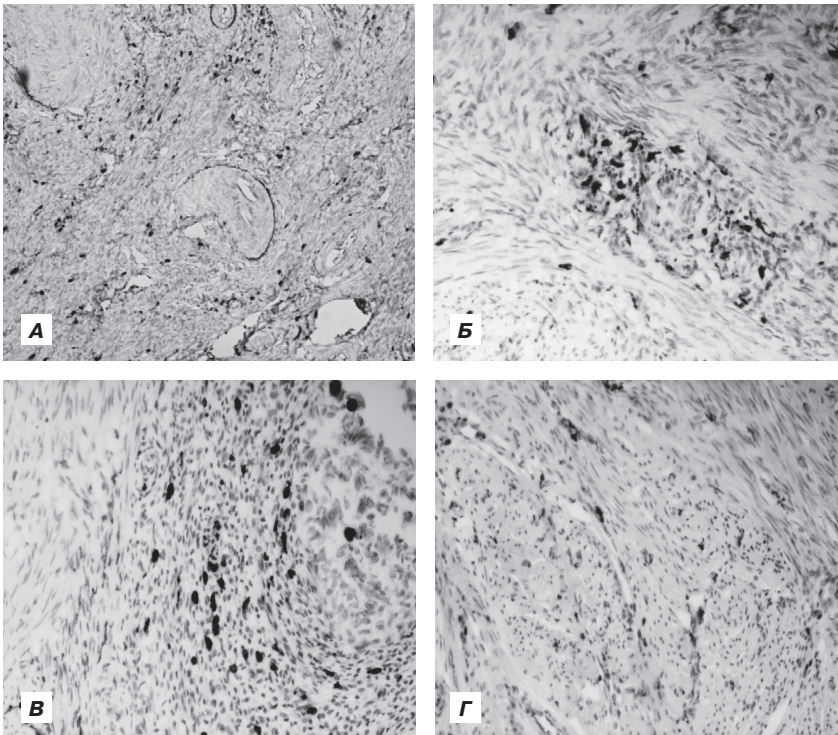


Рис. 3. Макрофаги в миометрії пацієнток з аденоміозом.
Примечание. Иммуногистохимическое исследование с использованием МАТ к CD68. А – макрофаги в мезометрии, ув. 80; Б – периваскулярные макрофаги в строме миометрия между пучками гладких миоцитов, ув. 200; В – макрофаги в зоне инфильтрации, ув. 200; Г – интерстициальные макрофаги миометрия, ув. 200.

макрофагов вокруг сосудов, их количество статистически значимо превышало численность макрофагов в интерстиции ($P=0,0007$) и вокруг зон роста эктопического эндометрия ($P=0,0023$). При

активации макрофагов при эндометриозе позволит разработать оптимальную стратегию профилактики прогрессирования заболевания и развития болевого синдрома.

Список литературы

1. Оразов М. Нейрососудистые отношения в стенке матки при аденомиозе, осложненном синдромом тазовой боли / М. Оразов, О. Н. Сулаева, Е. Н. Носенко // Morphologia. – 2015. – № 9, № 1. – С. 52-57.
2. Berkley K. J. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis / K. J. Berkley, N. Dmitrieva, K. S. Curtis, R. E. Papka // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2004. – Vol. 101 (30). – P. 11094-11098.
3. Leyendecker G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair / G. Leyendecker, L. Wildt, G. Mall // Arch. Gynecol. Obstet. – 2009. – Vol. 280 (4). – P. 529-538.
4. Origoni M. Neurobiological Mechanisms of Pelvic Pain / M. Origoni, U. L. R. Maggiore, S. Salvatore, M. Candiani // Biomed. Res. Int. – 2014. – Vol. 214. – P. 903848-56.
5. Wang G. Rich innervation of deep infiltrating endometriosis / G. Wang, N. Tokushige, R. Markham // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24(4). – P. 827-834.
6. Wang Y. The M2 polarization of macrophage induced by fractalkine in the endometriotic milieu enhances invasiveness of endometrial stromal cells / Y. Wang, Y. Fu, S. Xue // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2013. – Vol. 7 (1). – P. 194-203.

УДК 618. 13:07:612. 112. 3

РОЛЬ МАКРОФАГІВ У РОЗВИТКУ БОЛЬОВОГО СИНДРОМУ ПРИ АДЕНОМІОЗІ

Славчева О. С., Бондаренко С. О., Сулаєва О. М.

Резюме. З метою оцінки участі макрофагів у розвитку больового синдрому при аденоміозі проведено пілотне вивчення розподілу у стінці матки нервових волокон і макрофагів, виявлених імуногістохімічно з використанням моноклональних антитіл до білків нейрофіламентів і CD68. Показано наявність зональної гетерогенності кількості та морфологічних характеристик нервових волокон в міометрії за умов аденоміозу. Максимальна кількість нервових волокон була зафіксована навколо великих артерій судинного шару міометрію та в периваскулярних зонах ділянок ремоделювання міометрію на тлі їх лейкоцитарної інфільтрації.

этом различия между количеством интерстициальных ($4,20\pm 3,14$) и перигландулярных ($15,3\pm 5,19$) макрофагов оказались статистически незначимыми ($P=0,088$) за счет широкой вариабельности показателей. Ассоциация макрофагов с перигландулярными зонами наблюдалось вокруг конусов роста эктопических желез эндометрия, что может отражать участие макрофагов в инвазии эктопического эндометрия.

Выводы. Таким образом, проведенное исследование показало, что формирование синдрома тазовой боли при аденомиозе может быть связано не только с инвазией эктопического эндометрия вглубь стенки матки, но и с выраженной активацией макрофагов. Высокое содержание макрофагов в периваскулярном регионе может отражать участие макрофагов в стимуляции ангиогенеза и последующего роста нервных волокон.

Перспективы дальнейших исследований. Выяснение молекулярных механизмов

Оцінка CD68+клітин виявила переважну локалізацію макрофагів у периваскулярному компартменті і навколо конусів росту ектопічного ендометрію. Таким чином, розвиток больового синдрому при аденоміозі асоційований зі збільшенням кількості нервових волокон і макрофагів в периваскулярному регіоні та зонах ремоделювання біометрію.

Ключові слова: аденоміоз, нервові волокна, ангиогенез, макрофаги.

UDC 618.13:07:612.112.3

Role of Macrophages in Pain Syndrome Development at Adenomyosis

Slavcheva O. S., Bondarenko S. A., Sulaieva O. N.

Abstract. Endometriosis, which occupies the 3rd place in the structure of gynecological pathology among women of reproductive age, is an actual problem of current medicine. Nearly half of those affected have chronic pelvic pain, while in 70% pain occurs during menstruation. One of the reasons of the origin of this pain can be ingrowths of the ectopic endometrium deep into the uterine wall. Equally interesting is the concept of inflammatory remodeling of the uterine wall, with the participation of macrophages secreting not only a wide range of cytokines and enzymes, but is also a source of growth factors.

The aim of the research was to determine the role of macrophages in the remodeling of the uterine wall during the adenomyosis.

Material and methods. For morphological investigation we used fragments of the wall of the uterus after hysterectomy among women with adenomyosis. Assessment of the quantity and spatial distribution of nerve fiber and macrophages was performed using monoclonal antibodies to proteins of neurofilaments and to macrophageal marker CD68. The general morphological evaluation of sections was performed by Hematoxylin & Eosin Staining. Statistical data processing was performed in the program MedCalc.

Results of research. While studying the innervation apparatus of the uterine with adenomyosis accompanied by severe pain it was able to identify a variety of thickness, density and colour intensity of the nerve fibres. The greatest number of nerve fibres in the wall of the uterus in patients with adenomyosis were detected around the large arteries of the vascular layer of the myometrium and in the spaces between it. Research intraorganic of blood stream of the uterus revealed intense angiogenesis in the endometrium and myometrium on a background of leukocyte infiltration.

According to the modern concept of neuro-immune interactions, one of the potential causes of enhanced angiogenesis, the growth of the nerves and pain, and may be hyperactivation of macrophages. Immunohistochemical evaluation showed the presence of a diffuse network of macrophages in the endometrium and myometrium of patients with adenomyosis. During morphometric analysis revealed heterogeneity of distribution of macrophages in the different functional areas. Perivascular localization of CD68 positive cells was predominant. In addition, a large number of macrophages identified in regions of the leukocyte infiltration of stroma – especially around the out-breaks adenomyosis with signs of dystrophy and desquamation cells. A small number of single macrophages were located diffusely between bundles of smooth muscle cells in the stroma of the myometrium.

Conclusion. The data indicate that one of the key links of adenomyosis pain pathogenesis is immunopathological process, accompanied by increase in the number of macrophages in the wall of the uterus that leads to stimulation of angiogenesis and nerves growth.

Perspectives of future investigation. To sum up, in the future the elucidation the molecular mechanisms of activation of macrophages in endometriosis will develop an optimal strategy for the prevention of disease progression and the development of pain.

Keywords: adenomyosis, nerve fibres, angiogenesis, macrophages.

Стаття надійшла 18. 11. 2015 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування