

В. И. Гладчук, Т. Я. Москаленко, Т. Н. Адамовская

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ, АПОПТОЗА И ИММУННОЙ РЕАКТИВНОСТИ В ТКАНИ ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ У ЖЕНЩИН С ВНУТРИМАТОЧНОЙ ПЕРЕГОРОДКОЙ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

nymba@mail.ru

Summary. V. I. Gladchuk, T. Ya. Moskalenko, T. N. Adamovskaya **EXPRESSION OF PROLIFERATIVE, APOPTOTIC FACTORS AND FACTORS OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN DECIDUA OF WOMEN WITH INTRAUTERINE SEPTUM.** - *Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine.*

The expression of proliferative factor (Ki67), factor of apoptosis – active Caspase-3 (aCasp3), as well as the expression of factors of immunological reactivity – marker of natural killers (CD56) and macrophages (CD68) in the different parts of deciduas in women with complete intrauterine septum who had infertility period, which lasted not less than 5 years (from 5,0 up to 13,5 years) with the consequent first trimester miscarriage have been investigated. It was established that expression of aCasp3 in stromal cells of basal part of decidua (BD) was significantly less (by 35,8%) when compared with the control ($P<0,05$). The level of expression of Ki67 in stromal cells of BD exceeded such one in the control group by 1,95 times ($P<0,05$). The expression of CD56 in the secretory decidua endometrium and in parietal deciduas (PD) exceeded analogous indices in control group by 1,98 and 1,77 times correspondently ($P<0,05$), while the expression of CD68 in PD was higher than in control group by 2,2 times ($P<0,05$). The mentioned changes are analyzed from position of their significance for clarifying pathogenesis of the infertility and miscarriage in women intrauterine septum.

Key words: intrauterine septum, infertility, miscarriage active caspase-3; Ki67; immunological reactivity.

Реферат. В. И. Гладчук, Т. Я. Москаленко, Т. Н. Адамовская **ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ, АПОПТОЗА И ИММУННОЙ РЕАКТИВНОСТИ В ТКАНИ ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ У ЖЕНЩИН С ВНУТРИМАТОЧНОЙ ПЕРЕГОРОДКОЙ.** - *Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина.*

У женщин с полной внутриматочной перегородкой, у которых наблюдался период бесплодия период бесплодия составил не менее 5 лет (от 5,0 до 13,5 лет) с последующим спонтанным прерыванием беременности в первом триместре, исследовали экспрессию факторов пролиферации (Ki67), апоптоза (aCasp3), а также иммунологической реактивности – маркеры натуральных киллеров (CD56) и макрофагов (CD68) в различных участках децидуальной оболочки. Установлено, что экспрессия активной каспазы -3 (aCasp3) в стромальных клетках базальной части (БД) была достоверно меньшей (на 35,8%) в сравнении с контролем ($P<0,05$). Уровень Ki67, в стромальных клетках БД в 1,95 раза превышал показатель, группы контроля ($P<0,05$). Экспрессия CD56 в секреторном эндометрии децидуальной оболочки и париетальной части децидуальной оболочки (ПД) была выше таковой в группе контроля в 1,98 и в 1,77 раза соответственно ($P<0,05$), в то время как экспрессия CD 68 в ПД была выше, чем в контроле в 2,2 раза ($P<0,05$). Указанные изменения рассматриваются в контексте патогенеза бесплодия и невынашивания у женщин с внутриматочной перегородкой.

Ключевые слова: внутриматочная перегородка, бесплодие, невынашивание, активная каспаза-3; фактор пролиферации Ki67; иммунологическая реактивность

Реферат. В. І. Гладчук, Т. Я. Москаленко, Т. Н. Адамовська ЕКСПРЕСІЯ ФАКТОРІВ ПРОЛИФЕРАЦІЇ, АПОПТОЗУ І ІМУННОЇ РЕАКТИВНОСТІ В ТКАНИНІ ДЕЦИДУАЛЬНОЇ ОБОЛОНКИ У ЖІНОК З ВНУТРІШНЬОМАТОЧНОЮ ПЕРЕГОРОДКОЮ. - Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна.

У жінок з повною внутрішньоматочною перегородкою, у яких спостерігався період безпліддя, період безпліддя склав не менш 5 років (від 5,0 до 13,5 років) з наступним спонтанним перериванням вагітності в першому триместрі, дослідили експресію факторів проліферації (Ki67), апоптозу (aCasp3), а також імунологічної реактивності – маркери натуральних килерів (CD56) і макрофагів (CD68) у різних ділянках децидуальної оболонки. Встановлено, що експресія активної каспази -3 (aCasp3) в стромальних клітинах базальної частини (БД) була достовірно меншою (на 35,8%) у порівнянні з контролем (P<0,05). Рівень Ki67, в стромальних клітинах БД в 1,95 раз перевищував показник, групи контролю (P<0,05). Експресія CD56 в секреторному ендометрії децидуальної оболонки і паристальної частини децидуальної оболонки (ПД) була вище такої ж у групі контролю у 1,98 і в 1,77 рази відповідно (P<0,05), в той час як експресія CD 68 в ПД була вище, ніж у контролі в 2,2 рази (P<0,05). Вказані зміни розглядаються в контексті патогенезу безпліддя і невиношування у жінок з внутрішньоматочною перегородкою.

Ключові слова: внутрішньоматочна перегородка, безпліддя, невиношування, активна каспаза-3; фактор проліферації Ki67; імунологічна реактивність

В розвитку бесплодия, а также невынашивания у женщин с внутриматочной перегородкой, кроме анатомических особенностей строения матки, могут играть важную роль метаболические, гормональные факторы, обуславливающие нарушение её развития [1, 2, 7]. К числу подобных факторов можно отнести таковые, обуславливающие особенности ремоделирования сосудистой сети при имплантации [6, 15]. В подобных процессах важную роль, кроме собственно ангиогенных факторов, играют фактор пролиферации Ki67 [9, 10] и апоптоза – энзимов семейства каспаз [4, 5, 11].

Кроме того, важную роль играют факторы иммунной природы: показано, что инвазия иммунокомпетентных клеток является важнейшим процессом, который наблюдается в первые недели с момента имплантации [7, 13]. Так, число иммунных клеток увеличивается с 8% от общего числа стромальных клеток в течение менструального цикла до 30% в течение первого триместра. Причем, около 70% этих лейкоцитов представляют собой натуральные киллеры и еще 10% - макрофаги [8].

Поэтому целью настоящего исследования было изучение экспрессии Ki67, aCasp3, CD56, CD68 стромальными клетками в различных участках децидуальной оболочки, полученной у женщин с внутриматочной перегородкой, у которых в анамнезе присутствовал период бесплодия с последующим периодом невынашивания. При этом исследования проводились в образцах децидуального секретирующего эндометрия (ДСЭ), париетальной децидуальной оболочке (ПД), а также в базальной децидуальной оболочке (БД), что обеспечивает достаточную информативность подобных исследований [8].

Материалы и методы исследований. В работе наблюдали 17 женщин, у которых была диагностировано наличие внутриматочной перегородки, страдавшие бесплодием на протяжении от 1,0 до 3,0 лет, после чего наступала беременность заканчивавшаяся самопроизвольным абортom в первом триместре. Таким образом, критериями включения женщин в наблюдение были: 1) подтвержденный диагноз внутриматочной перегородки; 2) наличие периода бесплодия в анамнезе не более 3-х лет; 3) наличие самопроизвольного прерывания беременности в первом триместре, наблюдавшегося после периода бесплодия и отмечавшегося у женщины не менее двух раз. Выполнение требований, в соответствии с приведенными критериями, позволяло устанавливать взаимосвязь исследуемых показателей не только с факторами, обуславливавшими невынашивание, но и рассматривать их связь с бесплодием. Контролем служили ткани децидуальной оболочки практически здоровых женщин (12 пациенток), которым проводили искусственный аборт в сопоставимые с основной группой сроки первого триместра беременности. Все исследования проведены в соответствии с требованиями приказа МЗ Украины № 281 от 01.11.2000 г. и одобрены комиссией по биоэтике Одесского национального медицинского университета.

Образцы децидуальной оболочки, полученные из вакуумного аспирата, фиксировали в формалине и затем парафинизировали. В последующем проводили

окрашивание серий срезов с помощью гематоксилин-флоксин-сафрана. Гематоксилин (50 г калий-алюминиевого сульфата, 1 г гематоксилина, 500 мг лимонной кислоты, 25 г хлоралгидрата, 200 мг NaJO_3 в 1000 мл дистиллированной воды) окрашивал ядра клеток и в фиолетово-пурпурный цвет; флоксин (0,25 г флоксина в 100 мл дистиллированной воды) окрашивал цитоплазму клеток в розовый цвет; сафранин (3 г сафранина в 1000 мл 100% алкоголя) применяли для окрашивания коллагеновых волокон в оранжево-желтый цвет. Подобное окрашивание позволяло дифференцировать децидуальную оболочку и секреторную ее части – децидуальный секретирующий эндометрий (ДСЭ). Базальную и париетальную части децидуальной оболочки (БД и ПД соответственно) различали на основании наличия или отсутствия неворсинчатого трофобласта при использовании анти – цитокератинового окрашивания [8]. В наблюдении анализировали результаты, полученные у женщин с точной верификацией всех компонентов децидуальной оболочки (ДСЭ, БД и ПД).

Перед проведением иммуногистохимических исследований срезы депарафинизировали, эндогенную пероксидазу инактивировали с помощью 3% раствора перекиси водорода и метанола, а неспецифическое связывание подавляли путем инкубации срезов с 5% бычьим сывороточным альбумином (BSA). В исследовании применяли первичные поликлональные кроличьи антитела. Вторичные антитела были представлены: биотинилированные лошадиные анти-мышинные антитела (разведение 1:300, BA-2000, Vector, США), биотинилированные ослиные анти-кроличьи антитела (1:300, RPN1004, Amersham Biosciences) и биотинилированные кроличьи анти-козьи антитела (1:300, E-0466, DakoCytomation, США). Образцы инкубировали с первичными антителами при 48° С в течение ночи, после чего в течение часа инкубировали со вторичными биотинилированными антителами. Связывание антител верифицировали с помощью стрептавидина в комплексе с биотинилированной пероксидазой (K0377, DakoCytomation, Glostrup, Дания) и NovaRED™ субстрата (SK-4800, Vector, США) в соответствие с протоколом производителя.

Имуногистохимическое окрашивание CD56 и CD68 оценивали путем подсчета числа позитивно окрашенных клеток и общего числа стромальных клеток (для Ki67, aCasp-3) в 10 полях зрения площадью отдельного поля 16 мм² в расчете на один вид ткани на одного пациента. При этом рассчитывали среднее относительное число позитивно окрашенных клеток к числу стромальных клеток, а также в расчете на 1 мм². Иммуногистохимическое окрашивание оценивали путем определения индекса окрашивания (ИО): пропорцию окрашенных клеток умножали на интенсивность окрашивания. При этом пропорцию окрашенных клеток представляли в виде дискретных величин - 0, 1, 2 или 3, что соответствовало окрашиванию (присутствию антигена в клетках) соответственно в 0; 10; 10-50 и у 50% клеток по отношению к общему их числу, принятому за 100%. ИО выражали по трехбалльной шкале, приняв за 1 балл- слабое, 2-средней степени выраженности и 3-интенсивное окрашивание. Таким образом, минимальная величина рассчитываемого показателя составлял «0», а максимальная – «9». Для оценки принимали среднее значение ИО, определяемое по результатам соответствующих измерений двумя независимыми экспертами и обрабатывали статистически с применением общепринятых в медико-биологических исследованиях критериев оценки различий.

Полученные результаты обрабатывали статистически с применением общепринятых в медико-биологических исследованиях критериев различий между группами.

Результаты исследования и их обсуждение. Оценка экспрессии активной каспазы -3 (aCasp3) показала, что в участках ДСЭ и ПД децидуальной оболочки наблюдается незначительная тенденция к снижению указанного показателя, в то время как в базальной части (БД) исследуемый показатель был достоверно меньшим (на 35,8%) в сравнении с аналогичным показателем в группе контроля ($P<0,05$) (Рис. 1).

Уровень маркера пролиферации Ki67, в стромальных клетках БД достоверно – в 1,95 раза превышал показатель, который регистрировался в контроле ($P<0,05$) (Рис. 2). При этом в стромальных клетках ДСЭ и ПД регистрировалась незначительная тенденция снижения экспрессии Ki67 в сравнении с таковой в группе контроля ($P>0,05$).

Исследование экспрессии маркера натуральных киллеров CD56 показало, что в ДСЭ и ПД данный показатель превышал таковой, регистрировавшийся в группе контроля в 1,98 и в 1,77 раза соответственно ($P<0,05$) (Рис. 3). В то же время, в БД отмечалась незначительная тенденция к снижению исследуемого показателя – на 10,4% ($P>0,05$).

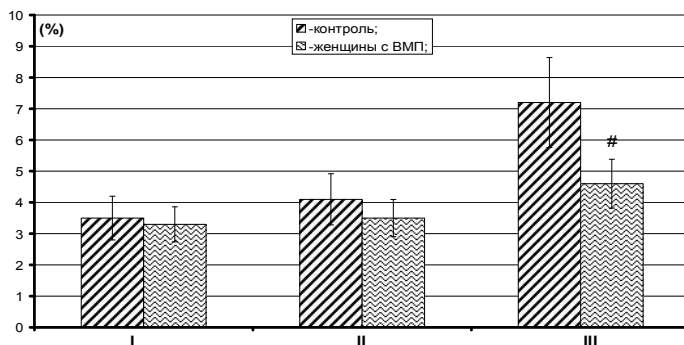


Рис. 1. Экспрессия активной каспазы-3 (aCasp3) – маркера апоптоза в стромальных клетках децидуальной оболочки.

Обозначения: по оси абсцисс - I-ДСЭ; II-ПД; III-БД; по оси ординат- число положительно окрашенных стромальных клеток (в %) по отношению к общему числу, принятому за 100%.

#- $P < 0,05$ в сравнении с показателем в группе контроля (метод ANOVA + Newman-Keuls тест).

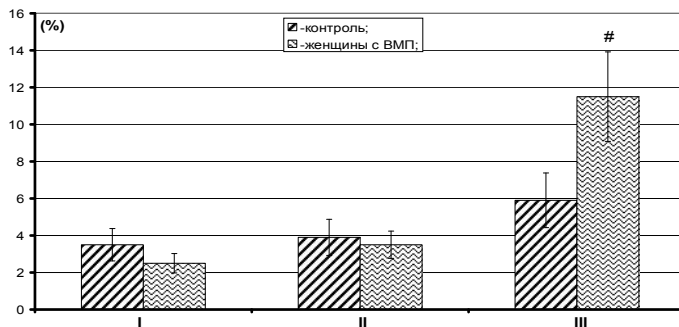


Рис. 2. Экспрессия Ki67 – маркера пролиферации в стромальных клетках децидуальной оболочки.

Обозначения: те же, что на Рис.1.

#- $P < 0,05$ в сравнении с показателем в группе контроля (метод ANOVA + Newman-Keuls тест).

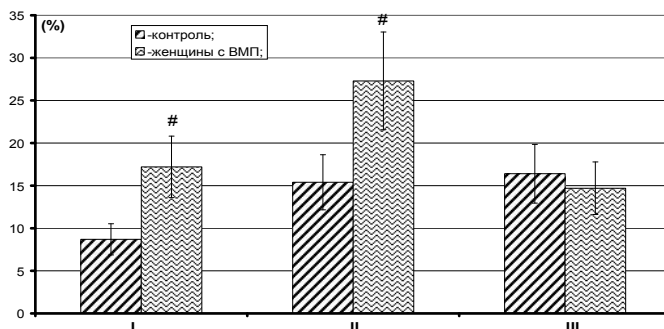


Рис. 3. Экспрессия CD56 – маркера натуральных киллеров в различных отделах децидуальной оболочки.

Обозначения: те же, что на Рис.1.

#- $P < 0,05$ в сравнении с показателем в группе контроля (метод ANOVA + Newman-Keuls тест).

Экспрессия маркера макрофагов CD 68 в ПД превышала аналогичный показатель в

группе контроля в 2,2 раза ($P < 0,05$) (Рис. 4). При этом в ДСЭ и БД тенденции к изменению величины исследуемого показателя не достигали уровня достоверных различий ($P > 0,05$) (Рис. 4).

Таким образом, полученные результаты показывают, что контроль пролиферации, а также процессов апоптоза, наблюдающихся в различных участках децидуальной оболочки, осуществляется по-разному у женщин с внутриматочной перегородкой и практически здоровых. При этом у женщин с ВМП экспрессия активной каспазы -3 (aCasp3) в стромальных клетках базальной части (БД) была достоверно меньшей (на 35,8%) в сравнении с контролем ($P < 0,05$). Уровень Ki67, в стромальных клетках БД в 1,95 раза превышал показатель, группы контроля ($P < 0,05$). Подобный характер изменений может свидетельствовать о преобладании процессов пролиферативного характера над процессами апоптоза, что также отмечается у пациенток с привычным невынашиванием [8].

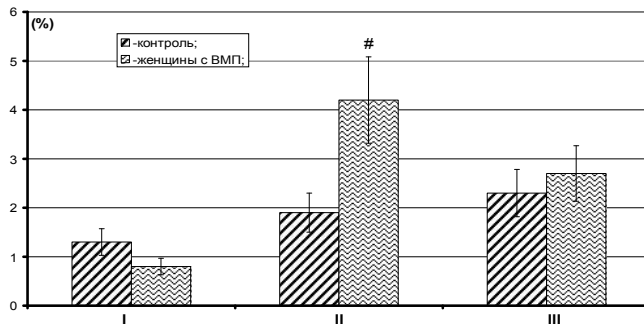


Рис. 4. Экспрессия CD68 – маркера макрофагов в различных отделах децидуальной оболочки.

Обозначения: те же, что на Рис.1.

#- $P < 0,05$ в сравнении с показателем в группе контроля (метод ANOVA + Newman-Keuls тест).

Учитывая ведущую роль неоангиогенеза в тканях децидуальной оболочки существенно возможно полагать, что действие как факторов пролиферации, так и апоптоза реализуется в тесном взаимодействии с регуляторами васкулогенеза. Подобное предположение справедливо и в отношении исследованных факторов иммунологической реактивности - CD56 и CD68. Так, экспрессия CD56 в ДСЭ и ПД была выше таковой в группе контроля в 1,98 и в 1,77 раза соответственно ($P < 0,05$), в то время как экспрессия CD 68 в ПД была выше, чем в контроле в 2,2 раза ($P < 0,05$). Сходное число маркеров натуральных киллеров было обнаружено у женщин с привычным невынашиванием в ткани ПД и БД, но их число было более высоким в ДСЭ [8]. Следует отметить, что у женщин с привычным невынашиванием в эндометрии отмечалось увеличение содержания натуральных киллеров [12]. Избыточная представленность экспрессии маркера натуральных киллеров, отмеченная в нашем исследовании, также подтверждает возможную реализацию подобного механизма у женщин с ВМП. Причем, миграция клеток данного типа представляет собой гормон-регулируемый процесс [14]. Число макрофагов в эндометрии также коррелирует с невынашиванием [8]. В нашей работе отмечено увеличение числа макрофагов в стромальных клетках ПД, в то время как в участке соседствующем с зоной имплантации отличий не наблюдалось.

Следует подчеркнуть, что, полученные результаты представляются существенно важными не только для понимания патогенеза невынашивания у женщин с ВМП, но и для понимания механизмов бесплодия, поскольку критерием включения пациенток в исследование было наличие подобного периода в анамнезе.

Выводы. 1. У женщин с внутриматочной перегородкой, у которых в анамнезе период бесплодия составил не менее 5 лет (от 5,0 до 13,5 лет) в стромальных клетках базальной части децидуальной оболочки уменьшалась экспрессия активной каспазы -3 (aCasp3) (на 35,8%), а экспрессия Ki67 возрастала в 1,95 раза в сравнении с контролем ($P < 0,05$).

2. Экспрессия маркера натуральных киллеров CD56 возрастала в ДСЭ и ПД в 1,98 и в 1,77 раза соответственно ($P < 0,05$), в то время как экспрессия маркера макрофагов CD68 в ПД превышала аналогичный показатель в группе контроля в 2,2 раза ($P < 0,05$).

Литература:

1. Воробйова І. І. Особливості функціонального стану ендометрія і кровотоку в судинах матки у жінок з невиношуванням вагітності / І. І. Воробйова, Я. О. Сопко, С. П. Писарева // Репродуктивное здоровье женщины. – 2007. – № 4. – С. 88–90.
2. Демченко Н. С. Патогенез невынашивания беременности: роль сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF – А) / Н.С.Демченко, Н.В.Башмакова, Т.Б.Третьякова // Уральский медицинский журнал. – 2012. — № 11. – С. 26–30.
3. Профиль локальной экспрессии генов ростовых факторов и цитокинов в эндометрии периода «имплантационного окна» при хроническом эндометрите / В. К. Таболова, И. Е. Корнеева, А. Е. Донников и соавт. // Акушерство и гинекология. – 2014. - N 12. - С.74 - 78.
4. Caspase-8 Is Involved in neovascularization-promoting progenitor cell functions/ D.Scharner, L. Rossig, G. Carmona et al.// Arterioscler Thromb Vasc Biol.- 2009.- Vol.29.- P.571-578.
5. Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis/ X. Liu, Y. He, F. Li et al.// Molecular cell.- 2015.- Vol.58.- P.284-296.
6. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor/ Zygmunt M., Herr F., Keller-Schoenwetter S. et al.// J. Clin. Endocrinol. Metab.- 2002.- Vol.87.- P.5290–5296.
7. Complex regulation of decidualisation: a role for cytokines and proteases —a review/ L.A.Salamonsen, E.Dimitriadis, R.L.Jones, G.Nie // Placenta. - 2003. - Vol.24.-S76–S85.
8. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions /M. Plaisier, I. Dennert, E. Rost et al. // Human Reproduction.-2009.- Vol.24, No.1.- P. 185–197.
9. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors/ A.A.Tadbir, S.Pardis, Z.J.Ashkavandi et al.// Asian Pac.J.Cancer.Prev.- 2012.- Vol.13, N10.- P.5155-5159.
10. Expression of VEGF-A, HIF-1 A, CD34 and KI67 in clear cell renal ce;; carcinomas and their relationship with conventional prognostic markers/ M.V.Bürgesser, V.Riva, S.M.Ojeda et al.// Revista de la Facultad de Ciencias Medicas.- 2014.- Vol.71(1).- P.7-15.
11. Inhibition of caspase-1 activation in endothelial cells improves angiogenesis: a novel therapeutic potential for ischemia/ J.Lopez-Pastrana, L.M.Ferrer, X.Xiong et al.// J. Biol. Chem. – 2015.- Vol. 290, N28.- P.17485-17494.
12. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage / E.Tuckerman, S.M.Laird, A.Prakash, T.C.Li // Hum. Reprod.- 2007.- Vol.22. – P. 2208–2213.
13. Smith S.K. Angiogenesis and implantation / S.K.Smith // Hum. Reprod. -2000.- Vol.15, (Suppl 6).- P. 59–66.
14. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human / M.J.Van den Heuvel, S.Chantakru, X.Xuemei et al.// Immunol. Invest.- 2005.-Vol.34.- P.273–293.
15. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage/ P.Vuorela, O.Carpen, M.Tulppala, E.Halmesmaki // Mol. Hum. Reprod.- 2000.- Vol. 6.- P.276–282.

Работа поступила в редакцию 03.10.2015 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования