

АНАЛИЗ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ И ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ ER И PR В ЯИЧНИКАХ ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

ВВЕДЕНИЕ

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) – одна из наиболее частых причин бесплодия у женщин репродуктивного возраста, встречающаяся в 5–15% случаев [1]. Одним из критериев патологии является наличие олиго-ановуляторных менструальных циклов. По данным исследований частота хронической ановуляции встречается в 25–45% случаев [2]. Тактика гинекологов при ведении пациенток с СПКЯ направлена, прежде всего, на индукцию овуляции с целью лечения бесплодия. Однако подтвержден тот факт, что неоднократные стимуляции овуляции препаратами ряда антиэстрогенов (кломистилбегит) приводят к слабому ответу на стимуляцию [3, 4].

АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ И ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Несомненно, овуляция зависит от процессов фолликулогенеза, а также от структуры и функции яичников, которая претерпевает изменения вследствие патологических процессов при СПКЯ. Современная классификация фолликулов основана на гистологическом строении, а также на чувствительности фолликулов к воздействию гипофизарных гонадотропинов. Относительно биологического действия гонадотропных гормонов следует отметить, что для СПКЯ характерна так называемая относительная недостаточность фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), которая приводит к нарушению конверсии андрогенов в эстрогены. Нарастающий уровень овариальных андрогенов в свою очередь увеличивает уровень метаболитических эстрогенов в крови. Атретичные фолликулы, длительно персистируя в яичниках, секретируют одинаковое количество эстрогенов в течение всего менструального цикла. Характерная для СПКЯ монотонная секреция эстрогенов поддерживает эндометрий в состоянии длительной пролиферации. Состояние хронической овуляции, обусловленное отсутствием желтого тела и низким уровнем продукции прогестерона, приводит к исключению фазы секреторной трансформации эндометрия. Такие измене-

ния в эндометрии являются благоприятным фоном для развития в нем гиперпластических процессов.

Этапы трансформации фолликулов разделяют на гормонально нечувствительную и гормонально чувствительную фазы. Переход от примордиальных до преантральных (первичных и вторичных) фолликулов считается гормонально независимым, а последующее формирование доминантного фолликула – гормонально зависимым [5]. Именно нарушение гормонально зависимой фазы фолликулогенеза является причиной хронической ановуляции при СПКЯ. В основе процессов созревания доминантного фолликула лежит ответная рецепторная деятельность его ткани на действие гормонов, в частности эстрогена и прогестерона.

Гормоны реагируют с рецепторами путем образования стероидно-рецепторного соединения, в результате которого синтезируются специфические белки, участвующие в регуляции различных репродуктивных процессов [6, 7]. Исследования, направленные на изучение экспрессии рецепторов половых стероидов в ткани яичника, помогут раскрыть патогенетические механизмы формирования СПКЯ.

Цель нашего исследования – оценить гистологическую картину яичников, экспрессию рецепторов половых гормонов и ее влияние на фертильность женщин с СПКЯ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на клинической базе кафедры акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета (гинекологического отделения городской клинической больницы № 9 г. Одессы). Группу исследования составили 23 пациентки с бесплодием на фоне СПКЯ, которым, в результате неэффективности предложенной консервативной терапии, было выполнено хирургическое лечение бесплодия. Все пациентки были сопоставимы по возрасту, выраженности клинических проявлений синдрома, показателей гормонального гомеостаза. Группу контроля составили 15 фертильных больных с нормальным овуляторным менструальным циклом, которым было



В.Н. ЗАПОРЖАН

д. мед. н., профессор, академик НАМН Украины, вице-президент НАМН Украины, ректор Одесского национального медицинского университета МЗ Украины, заведующий кафедры акушерства и гинекологии № 1

Н.Н. РОЖКОВСКАЯ

д. мед. н., профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета

Ю.В. ОНИЩЕНКО

аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета

произведено хирургическое вмешательство по поводу кист яичников. Хирургическое лечение было выполнено путем проведения лапароскопии, согласно классической методике и существующего протокола, утвержденного приказом МЗ Украины № 676 от 31 декабря 2004 года «Об утверждении клинических протоколов по акушерскому и гинекологическому кровотечению» [8].

Всем пациенткам было проведено предоперационное обследование, согласно протокола, и иммунохимический анализ с электрохемилюминесцентной детекцией (ECLIA) содержания гормонов в плазме крови – уровней эстрадиола, прогестерона, общего тестостерона, лютеинизирующего гормона (ЛГ), ФСГ, антимюллерова гормона, тиреотропного гормона и пролактина.

Лапароскопия осуществлялась под эндотрахеальным наркозом с использованием специальных наборов оборудования и инструментов производства «Olympus» (Япония), «Karl Storz» (Германия). Пациенткам основной группы производились следующие виды оперативного вмешательства – клиновидная резекция яичника, каутеризация и овариальный дреллинг. В группе контроля выполнялась резекция яичника, энуклеация кисты яичника. С целью гемостаза использовалась моно- и биполярная коагуляция. Технических сложностей во время операций, а также послеоперационных осложнений не было.

Макропрепараты, полученные в результате оперативных вмешательств, фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине и по общепринятой методике готовый материал заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы готовились на микротоме Nestion ERM3100 (Япония), толщиной 4–5 мкм (не менее двух срезов на каждое гистологическое стекло), окрашивали гематоксилин-эозином. Фоторегистрация препаратов осуществлялась при помощи микроскопа N306 (Япония) с цифровой фотокамерой DM800 (Япония).

Иммуногистохимическое исследование блоков основывалось на результатах исследования препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином. Для дальнейшего иммуногистохимического исследования отбирались участки яичниковой ткани с наличием фолликулярного аппарата. Так как при СПКЯ рост фолликулов останавливается на уровне первичных или малых зреющих фолликулов (диаметр 0,5–1,0 см в окружении 8–10 слоев фолликулярного эпителия), то в обеих группах изучению подвергались участки яичниковой ткани, содержащие именно такие фолликулы, и подлежащая к ним строма. Срезы толщиной 3–4 мкм наклеивали на чистые тонкие предметные стекла, затем проводили иммуногистохимические реакции с антителами: демаскирование антигенов; ингибирование эндогенной пероксидазы; инкубация антител 1 час; промывание; специфичный агент мышиных антител; использование HRP-полимера; визуализация результатов реакции с помощью хромогена. В качестве первичных специфичных антител в процессе иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела: clone EP1 к ER (Dako, Германия) и clone PgK 636 к PR (Dako Cytomation, Дания).

При взаимодействии моноклональных антител с рецепторами эстрогена или прогестерона происходило окрашивание. Обнаружение окрашенных клеток считали положительным результатом. Он градировался в баллах

методом «знаковой» оценки, с учетом интенсивности окраски и процента окрашенных клеток. В каждом случае подсчитывали процент окрашенных ядер на 100 клеток. Оценка окрашивания интенсивности и распределения проводилась по количеству вступивших в реакцию клеток: от 1 до 10 – слабopоложительная, от 11 до 20 – умеренная, а более 20 – выраженная. Результат оценивали в полях зрения, с наибольшим скоплением окрашенных клеток. Если реакции взаимодействия в препарате не было, то результат считался отрицательным.

Статистическое обеспечение работы выполнено с использованием U-критерия Манна-Уитни для независимых групп и критерия Уилкоксона для зависимых (ненормальное распределение данных и малочисленность групп). Для сравнения качественных данных применили двухсторонний критерий Фишера. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$ [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении данных анамнеза средний возраст обследуемых был сопоставим в обеих группах – $25,76 \pm 0,75$ лет в основной группе и $26,59 \pm 0,78$ в группе контроля ($p = 0,4648$). Отличительной особенностью был средний возраст наступления менархе. В группе контроля он не отличался от общепринятых норм – $12,42 \pm 0,17$ лет, тогда как в основной группе составил $15,40 \pm 0,14$ лет, что является характерной чертой развития СПКЯ ($p < 0,0001$). Первичное бесплодие в основной группе встречалось наиболее часто – 19 (82,6%) случаев. В группе контроля жалоб со стороны репродуктивной функции не было, пациентки имели от 2 до 3 беременностей в анамнезе. Обследование гормонального фона пациенток основной группы выявило характерные изменения для СПКЯ – повышение пиковой концентрации уровня ЛГ у 14 (60,9%) больных, индекса ЛГ/ФСГ у 13 (56,5%) и общего тестостерона у 18 (78,2%) по сравнению с женщинами контрольной группы ($p < 0,001$).

Гистологическая картина яичников обследуемых основной группы существенно отличалась от группы контроля. Согласно анализу полученных патоморфологических данных, характерными особенностями для СПКЯ были фиброматоз стромы яичника, с наличием множественных рубцовых тел (рис. 1) и стаз сосудов с миграцией форменных элементов в периваскулярные пространства (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о возможной роли нарушения кровоснабжения яичников в патогенезе хронической ановуляции.

Иммуногистохимическое исследование срезов показало различную степень экспрессии рецепторов стенки фолликулов и стромы. При исследовании экспрессии рецепторов к эстрогену (ER) и к прогестерону (PR) в стенке фолликулов группы контроля реакция была преимущественно умеренной или выраженной в 86,7 и 93,3% случаев соответственно. Таким образом, можно судить о согласованной реакции уровней эстрогена и прогестерона и их рецепторов. В клетках стромы также отмечено преимущественно выраженную экспрессию рецепторов ER (80%) и PR (73,3%). Слабopоложительной или отрицательной реакции не наблюдалось. Следовательно, взаимодействие рецепторов ER и PR с моноклональными

антителами у женщин контрольной группы оценивали как умеренную или выраженную реакцию в стенке фолликулов и клетках стромы.

Для основной группы была характерна следующая картина: в стенке фолликулов экспрессия рецептора ER была аналогична показателям группы контроля, то есть реакция была умеренной или выраженной практически в 82,6% случаев (19 больных). В то время как экспрессия рецепторов PR показала абсолютно противоположную реакцию, в 21,7% наблюдалась умеренная и в 73,9% слабоположительная реакция. В строме яичников также наблюдалась положительная реакция рецепторов ER и PR, однако в отличие от группы контроля чаще встречалась умеренная и выраженная: ER – 52,2 и 39,1%; PR – 65,2 и 34,7% соответственно.

Данные иммуногистохимического анализа представлены в таблице 1.

Таким образом, при сравнении групп исследуемых можно сделать вывод, что для ановуляторного бесплодия на фоне СПКЯ характерны следующие особенности: в стенках фолликула – умеренная или выраженная экспрессия рецепторов ER и преимущественно слабовыраженная экспрессия рецепторов PR. В клетках стромы яичника – экспрессия ER и PR не имеет существенных отличий сравнительной и контрольной групп.

ВЫВОДЫ

Гистологическая картина ткани яичника при СПКЯ имеет свою специфичность – фиброматоз стромы, появление множественных рубцовых тел и стаз сосудов. Можно предположить, что нарушения системы микроциркуляции гемодинамики в ткани яичника в сочетании с фиброматозом капсулы являются патогенетическими факторами в процессе возникновения хронической ановуляции при СПКЯ. Нарушение процессов экспрессии половых стероидов при СПКЯ может быть основой для формирования патогенетического механизма отрицательного ответа на гормональное лечение данной патологии.

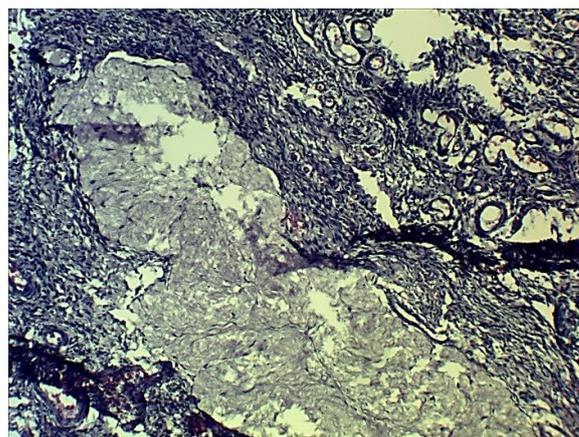


РИСУНОК 1.
ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ТКАНИ ЯИЧНИКА С ФИБРОМАТОЗОМ СТРОМЫ И НАЛИЧИЕМ МНОЖЕСТВЕННЫХ РУБЦОВЫХ ТЕЛ

Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение × 10

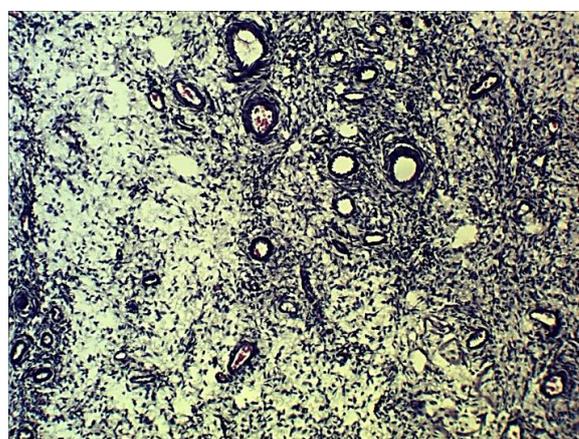


РИСУНОК 2.
ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ТКАНИ ЯИЧНИКА СО СТАЗОМ СОСУДОВ

Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение × 10

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕАКЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ РЕЦЕПТОРОВ ER И PR В ТКАНИ ЯИЧНИКА

| Экспрессия рецепторов | Реакция, % | Основная группа (СПКЯ), n = 23 | | Контрольная группа, n = 15 | |
|-----------------------|--------------------|--------------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| | | Стенка фолликула | Строма яичника | Стенка фолликула | Строма яичника |
| PR | Отрицательная | 4,3 | 0 | 0 | 0 |
| | Слабоположительная | 73,9 | 0 | 0 | 0 |
| | Умеренная | 21,7 | 65,2 | 6,7 | 26,7 |
| | Выраженная | 0 | 34,7 | 93,3 | 73,3 |
| ER | Отрицательная | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Слабоположительная | 0 | 8,7 | 0 | 0 |
| | Умеренная | 82,6 | 52,2 | 86,7 | 20 |
| | Выраженная | 17,4 | 39,1 | 13,3 | 80 |

Наиболее важным прогностическим маркером эффективности дальнейшей терапии является экспрессия ER и PR в стенках фолликулов, поскольку для стромы яичника характерна цикличность процессов. Выявленная в исследовании слабовыраженная экспрессия PR может свидетельствовать о прогестероновой недостаточности организма у больных с СПКЯ.

При составлении прогноза наступления овуляции и разработке способов коррекции нарушений овуляции у пациенток с ановуляторным бесплодием на фоне СПКЯ после хирургического лечения целесообразно использовать комплекс результатов эндоскопического изучения яичников, морфометрического и иммуногистохимического исследований биоптатов яичников и определения гормонального профиля крови.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dewailly D.

«Definition of polycystic ovary syndrome.» Hum Fertil Camb, 3(2000):73-76.

2. Шепелькевич А.П.

Эндокринология. Современные подходы к диагностике и лечению синдрома поликистозных яичников // ARS MEDICA. – 2012. – № 15(70). – С. 98–105.

Shepelkevich A.P.

«Endocrinology. Current approaches to diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome.» ARS MEDICA, 15(70) (2012):98-105.

3. López E. et al.

«Ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome: randomized trial of clomiphene citrate versus low-dose recombinant FSH as first line therapy.» Reprod. Biomed. Online. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK, 9(4) (2004):382-390.

4. Burgers J. et al.

«Oligoovulatory and anovulatory cycles in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): what's the difference?» J. Clin. Endocrinol. Metab, 95(12) (2010):E485-9.

5. Li Y., Wei L.-N., Liang X.-Y.

«Follicle-stimulating hormone suppressed excessive production of antimullerian hormone caused by abnormally enhanced promoter activity in polycystic ovary syndrome granulosa cells.» Fertil. Steril. Elsevier, 95(7) (2011):2354-8, 2358.e1.

6. Quezada S. et al.

«Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome.» Fertil. Steril. Elsevier, 85(4) (2006):1017-1026.

7. Lessey B.A. et al.

«Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women.» Reprod. Biol. Endocrinol, 4 (Suppl, № Supp (1) (2006): 59.

8. Наказ МОЗ України № 676 від 31 грудня 2004 року

«Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної кровотечі» м. Київ: МОЗ України. – 2004. – С. – 148. Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/print/dn_20131128_0.html.

Order of the MOH Ukraine № 676 of 31 December 2004

«About approval of clinical protocols for obstetric and gynecological bleeding» Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2004. P. 148. Access: http://www.moz.gov.ua/ua/print/dn_20131128_0.html.

9. Методология и технология современного анализа данных на STATISTICA.

Электронный ресурс. Режим доступа: http://www.statsoft.ru/academy/courses/general/detail.php?ELEMENT_ID=799.

Methodology and technology of modern analysis of the data at STATISTICA.

Electronic resource. Access: http://www.statsoft.ru/academy/courses/general/detail.php?ELEMENT_ID=799.

АНАЛІЗ ГІСТОЛОГІЧНОЇ КАРТИНИ ТА ЕКСПРЕСІЇ РЕЦЕПТОРІВ СТАВЕРИХ ГОРМОНІВ ER ТА PR У ЯЄЧНИКАХ ПРИ СИНДРОМІ ПОЛІКІСТОЗНИХ ЯЄЧНИКІВ

В.М. Запорожан, д. мед. н., професор, академік НАМН України, віце-президент НАМН України, ректор Одеського національного медичного університету МОЗ України, завідувач кафедри акушерства та гінекології № 1

Н.М. Рожковська, д. мед. н., професор кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету

Ю.В. Онищенко, аспірант кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету

Аналіз гістологічної картини тканини яєчника при синдромі полікістозних яєчників (СПКЯ) визначив специфічні маркери, що є патогенетичними чинниками в процесі виникнення хронічної ановуляції. Імуногістохімічне дослідження експресії рецепторів статевих гормонів в тканині яєчників при СПКЯ виявило характерні зміни експресії рецепторів естрогену (ER) і прогестерону (PR) в стромі та фолікулах. Встановлено, що зміни експресії статевих гормонів у фолікулах і стромі яєчників можуть відігравати важливу роль в процесі фолікулогенезу і фертильності жінок із СПКЯ.

Ключові слова: синдром полікістозних яєчників, безпліддя, рецептори естрогену і прогестерону, імуногістохімія.

ANALYSIS OF HISTOLOGY AND EXPRESSION OF SEX HORMONE RECEPTORS ER AND PR IN THE OVARIES AT POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

V.N. Zaporozhan, MD, professor, academician of NAMS of Ukraine, Vice-President of NAMS of Ukraine, Rector of the Odessa National Medical University

N.N. Rozhkovskaya, MD, professor, Obstetrics and Gynecology Department number 1, Odessa National Medical University

Y.V. Onishchenko, postgraduate student of the Obstetrics and Gynecology Department № 1, Odessa National Medical University

Histologic analysis of ovarian tissue at polycystic ovary syndrome (PCOS) identified specific markers that are pathogenic factors in the case of chronic anovulation. Immunohistochemical research of expression sex hormones receptors in the ovarian tissue in PCOS showed characteristic changes of the expression of estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) in the stroma and follicles There was revealed that changes of the expression of sex hormones in the follicles and ovarian stroma can play the important role in the process of folliculogenesis and fertility for women with PCOS.

Key words: polycystic ovary syndrome, infertility, estrogen and progesterone receptors, immunohistochemistry.