
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ КОЛЛАГЕНОВ I И III ТИПОВ И ЭЛАСТИНА В СВЯЗОЧНОМ АППАРАТЕ МАТКИ ПРИ ОПУЩЕНИИ И ВЫПАДЕНИИ ВНУТРЕННИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

М.Л. Ханзадян, Р. Коннон

Кафедра акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины
ФПК МР Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Т.А. Демура

Кафедра патологической анатомии им академика А.И. Струкова
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Трубецкая ул., 8, Москва, Россия, 119991

Распространенность пролапса гениталий достаточно велика, варьирующая от 34,1 до 56,3% среди женской популяции некоторых стран, 28—38,9% в структуре гинекологических заболеваний и составляющая около 15% от больных гинекологических операций.

Патогенез развития ОиВВПО, и особенно морфологические изменения в связочном аппарате матки при пролапсе, изучены не достаточно подробно. Целью нашего исследования было изучить иммуногистохимические особенности коллагенов I и III типа и эластина в крестцово-маточной и круглой связках матки при ОиВВПО.

Исследование выполнено на материале биоптатов крестцово-маточных и круглых связок матки с обеих сторон от 15 женщин с опущением гениталий в возрасте от 42 до 65 лет, взятых в ходе влагалищной гистерэктомии. Контрольную группу составили биоптаты связок (крестцово-маточной и круглой) от 15 женщин без выпадения, которым также производилась гистерэктомия абдоминальным доступом, в возрасте от 35 до 52 лет. От каждой пациентки было получено по 4 образца ткани, биоптаты фиксировались в 10% нейтральном формалине и заливались в парафин, после чего изготавливались парафиновые срезы толщиной 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизон и фукселином по Вейгерту, а также проводились иммуногистохимические реакции с использованием первичных антител к коллагену I и III (NovusBiologicus, 1 : 100 и 1 : 200) и эластину (ThermoScientific, 1:100). Результаты иммуногистохимических реакций оценивали в баллах по проценту окрашенных клеток или по проценту окрашенного экстрацеллюлярного матрикса.

При морфологическом исследовании выявлено фибрирование и фрагментация эластики в связках при ОиВВПО. Кроме того, обнаружено изменение соотношения коллагенов I и III типа в сторону преобладания коллагена III типа и снижение экспрессии эластина по сравнению с контролем. Нарушение в распределении и строении эластических волокон, несомненно, отрицательно сказывается на развитии сосудистого русла, что приводит к ухудшению микроциркуляции, вероятно, проявляющееся развитием дезорганизации соединительной ткани. Необходимы дальнейшие исследования особенностей связочного аппарата матки при ОиВВПО, направленные на поиски диагностических маркеров, с помощью которых будет возможно выявлять группы риска женщин по развитию опущения гениталий.

Ключевые слова: выпадение и опущение внутренних половых органов, крестцово-маточная и круглая связка матки, коллаген I и III, эластин.

Актуальность настоящего исследования обусловлена тем, что распространенность пролапса гениталий (ПГ) достаточно велика, варьируя от 34,1 до 56,3% среди женской популяции некоторых стран, и 28—38,9% в структуре гинекологических заболеваний [3]. В структуре плановых показаний к оперативному лечению выпадение матки и влагалища занимает третье место после доброкачественных опухолей и эндометриоза.

Частота встречаемости ПГ значительно варьирует и зависит от многих внутренних и внешних факторов. Особое место занимает пролапс культи влагалища после гистерэктомии лапаротомным доступом у женщин, не имевших ранее пролапса гениталий, составляет 2—5% [15].

Если несколько десятков лет назад опущение и выпадение половых органов рассматривалось как патологический процесс, типичный для пожилых женщин, то современные исследования показали, что в общем числе больных пациентки репродуктивного возраста составляют не менее одной трети [12].

Пролапс гениталий сопровождается дисфункцией тазовых органов, среди которых наиболее часты: недержание мочи (70,1%), нарушение дефекации (36,5%), диспареуния (53,3%), приводит к тяжелым физическим и моральным страданиям, в конечном счете существенно ухудшая качество жизни у данного контингента населения [6, 12].

Хотя беременность и патологические роды через естественные родовые пути считаются основными причинами развития ПГ, эти факторы не полностью объясняют возникновение и прогрессирование дисфункции тазового дна у женщин [10]. В самом деле, ПГ отмечается и у нерожавших женщин, а отсутствие этого состояния было подтверждено у многих рожавших неоднократно женщин. Помимо акушерских причин факторами риска ОиВВПО являются заболевания кишечника и легких, сопровождающиеся хроническими запорами и кашлем, приводящим к резкому повышению внутрибрюшного давления, а также тяжелый физический труд, менопауза, гипоэстрогенные состояния, неврогенные дисфункции тазового дна, метаболический синдром, этническая принадлежность. Значительную роль в генезе ОиВВПО у молодых женщин играют нарушения в метаболизме соединительной ткани [7, 12]. Дезорганизация соединительно-тканых структур в большей степени наблюдается в связочном аппарате матки, что обуславливает высокую степень риска формирования патологии после гистерэктомии или рецидива после пластической операции.

До настоящего времени литературные публикации в поддержку точного вклада каждой из этиологических переменных в патогенез ОиВВПО малочисленны и носят спорадический характер, что ограничивает нашу способность разработать эффективные профилактические стратегии.

Несмотря на то, что для коррекции пролапса предложено много хирургических операций и модификаций, до сих пор частота рецидивов заболевания составляет 33—43% [6, 11].

В литературе сообщается о семейных случаях заболевания и расовых различиях в распространенности ОиВВПО. Указывается, что риск возникновения ОиВВПО достоверно выше у женщин, матери или сестры которых уже имеют такую патологию [15].

С целью изучения молекулярных и биохимических изменений, лежащих в основе ОиВВПО, ткани, которые образуют поддерживающие структуры диафрагмы таза, были проанализированы на моделях животных и человека. Большинство исследований было сосредоточено на анализе компонентов соединительной ткани и основано на гипотезе, что аномальные соединительные ткани тазового дна ассоциированы с ОиВВПО в качестве причины или следствия. Коллаген и эластин являются двумя основными белками, входящими в состав внутриклеточного

матрикса (ВКМ) соединительных тканей. Коллаген отвечает за прочность на разрыв и целостность, тогда как эластин обеспечивает эластичность и упругость тканей.

Несмотря на противоречивые данные, в целом у пациентов с ОиВВПО отмечается снижение содержания общего коллагена с более высоким показателем коллагена III типа и незрелого коллагена, более подверженного разрыву. Подобно коллагену общее содержание эластина, по всей видимости, снижается в тканях тазового дна у женщин с ОиВВПО. Необходимо подчеркнуть, что методики, используемые для измерения содержания коллагена и эластина, варьируют от исследования к исследованию. Кроме того, изучались различные структуры и места забора биопсийных образцов тазового дна (стенка влагалища, *arcus tendineous fascia pelvis*, парауретеральные ткани, параметрий и маточно-крестцовые связки), что может объяснять многочисленные расхождения и противоречия в литературе. Понимание патогенетических механизмов пролапса позволит разработать не только таргетную терапию, но и выявлять группы риска по развитию такого важного медико-социального заболевания.

Патогенез развития ОиВВПО и особенно морфологические изменения в связочном аппарате матки при пролапсе изучены не достаточно подробно, а также не исследованы особенности содержания коллагенов и эластина, как основных структурных компонентов связочного аппарата [9]. Целью нашего исследования было изучить иммуногистохимические особенности коллагенов I и III типов и эластина в крестцово-маточной и круглой связке матки при ОиВВПО.

Материалы и методы. Исследование выполнено на материале биоптатов крестцово-маточных и круглых связок матки с обеих сторон от 15 женщин с опущением гениталий в возрасте от 42 до 65 лет, взятых в ходе влагалищной гистерэктомии. Контрольную группу составили биоптаты связок (крестцово-маточной и круглой) от 15 женщин без выпадения, которым также производилась гистерэктомия абдоминальным доступом, в возрасте от 35 до 52 лет. От каждой пациентки было получено по 4 образца ткани: правая и левая крестцово-маточная связка и правая и левая круглая связка матки. Биоптаты фиксировались в 10% нейтральном формалине и заливались в парафин, после чего изготавливались парафиновые срезы толщиной 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизон и фукселином по Вейгерту. Изготавливались дополнительные неокрашенные срезы на полилизинных стеклах и проводились иммуногистохимические реакции по стандартной методике с тепловой демаскировкой антигенов с использованием первичных антител к коллагену I и III (NovusBiologicus, 1 : 100 и 1 : 200) и эластину (ThermoScientific, 1 : 100). Результаты иммуногистохимических реакций оценивали в баллах по проценту окрашенных клеток или проценту окрашенного экстрацеллюлярного матрикса.

Результаты исследования. При морфологическом исследовании крестцово-маточных и круглых связок выявлено, что они построены преимущественно из фиброзно-эластической ткани с включениями гладкомышечной и сосудистой. Различий в строении связок между правой и левой стороной выявлено не было, что позволило нам проводить дальнейшие иммуногистохимические реакции на образцах связок, взятых только с одной стороны.

При этом выявлены отличия гистологического строения связочного аппарата матки при ОиВВПО и в группе контроля. Так, при пролапсе и опущении отмечается преобладание фиброзирования соединительной ткани, наличие более грубых коллагеновых септ между пучками гладкомышечных волокон, а также дистрофические изменения отдельных гладкомышечных клеток. Кроме того, в 4 случаях было обнаружено развитие отека, набухания соединительной ткани (коллагеновых волокон) по типу дезорганизации, а также выраженный периваскулярный отек. В группе с пролапсом и выпадением отмечается менее развитое сосудистое русло в связках (рис. 1 а, б).

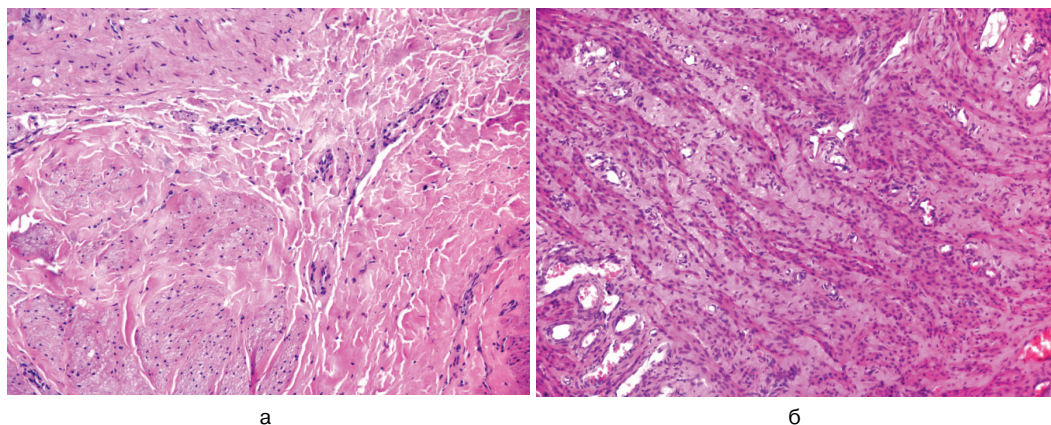
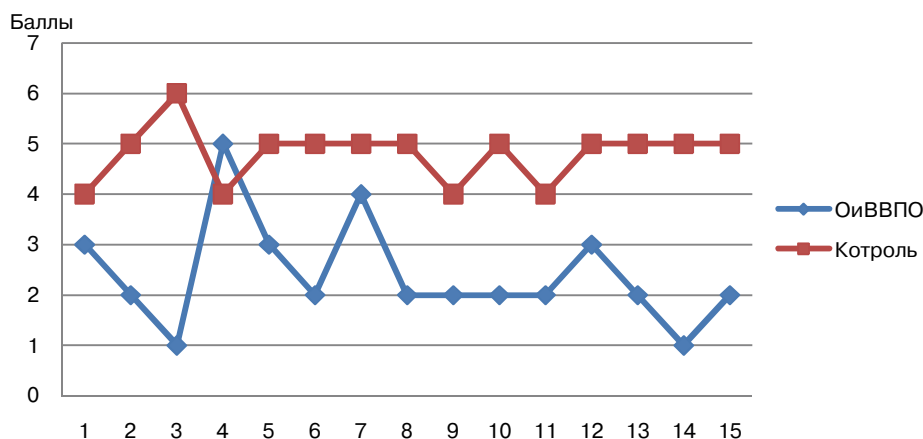
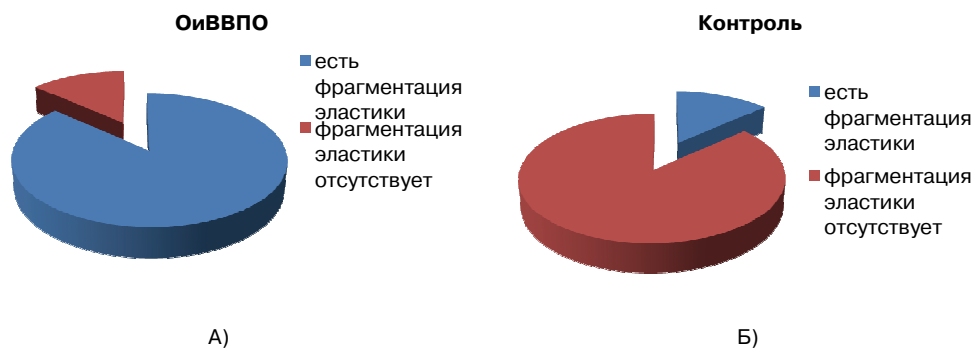


Рис. 1. Микрофотография строения крестцово-маточных связок, гематоксиллин и эозин, основной (а, $\times 200$) контрольной группы (б, $\times 200$)

При оценке эластических волокон с помощью гистохимической окраски фукселином по Вейгерту выявлено не только уменьшение количества волокон в крестцово-маточных и круглых связках матки с обеих сторон (гистограмма 1), но и их фрагментация. В группе контроля отмечалось равномерное распределение эластички в связках вдоль коллагеновых волокон, в стенках сосудов, а также отмечалось отсутствие их фрагментации (гистограмма 2).

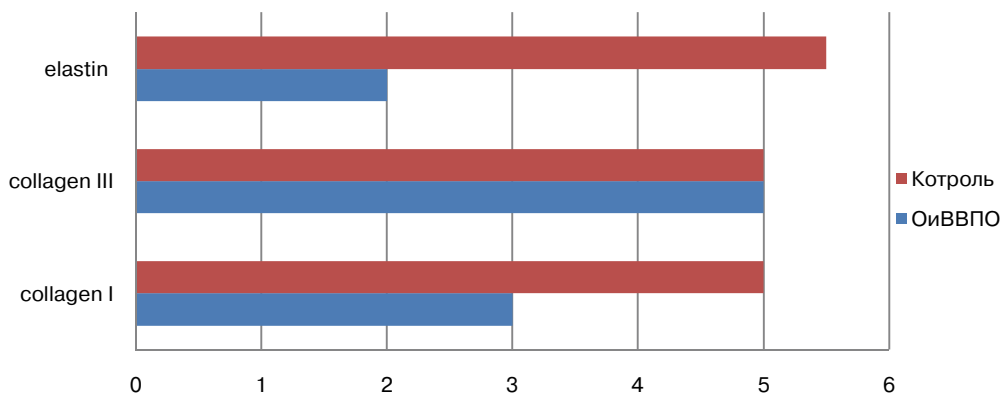


Гистограмма 1. Содержание эластических волокон в круглой связке матки в исследуемых группах



Гистограмма 2. (А и Б) фрагментация эластических волокон в круглой связке матки в исследуемых группах

В результате иммуногистохимического исследования экспрессии коллагенов I и III типа выявлено их высокое содержание в крестцово-маточных и круглых связках матки в группе контроля (5 и 5 баллов соответственно) и умеренное в группе с ОйВВПО (3 и 5 баллов соответственно) (рис. 2 а, б). При опущении и выпадении изменяется соотношение коллагенов в сторону преобладания коллагена III типа, что отличается от контрольной группы (гистограмма 3).



Гистограмма 3. Иммуногистохимическая экспрессия коллагенов I и III и эластина

При изучении иммуногистохимической экспрессии эластина выявлена умеренная экспрессия маркера при ОйВВПО, и высокая в группе контроля (рис. 2 в). Но при исследовании локализации и характера распределения продукта реакции с эластином в исследуемых группах установлены различия. При ОйВВПО отмечается очаговая локализация маркера в виде глыбок в экстрацеллюлярном матриксе, преимущественно вокруг сосудов (см. гистограмму 3). В связках в группе контроля маркер выявлялся в виде линейного и равномерного прокрашивания волокон экстрацеллюлярного матрикса, а также вдоль стенок сосудов.

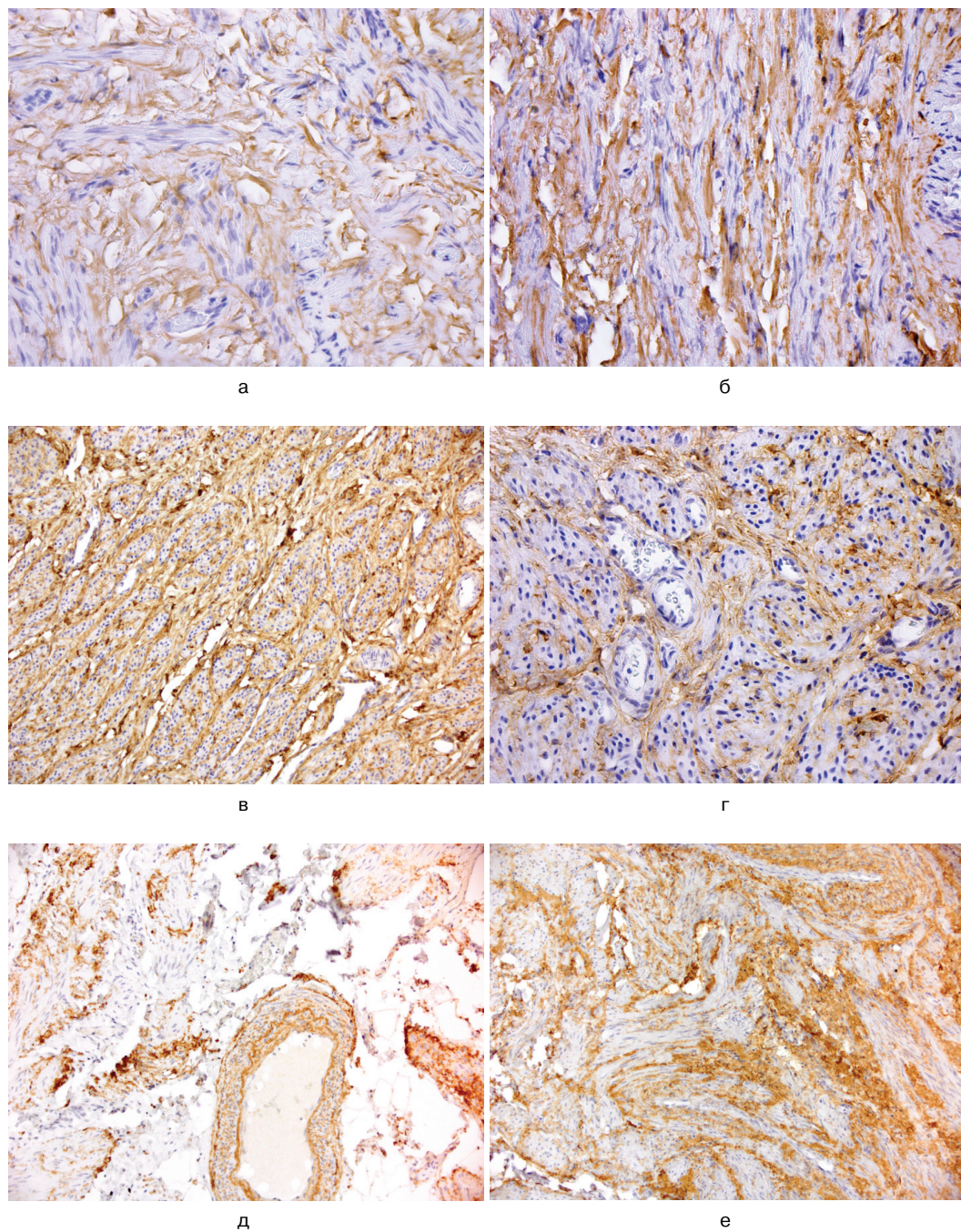


Рис. 1. Коллаген I и III и эластин в крестцово-маточных связках основной и контрольно группы:
а — коллаген I в основной группе, $\times 200$; б — коллаген I в контрольной группе, $\times 200$; в — коллаген III, в основной группе, $\times 200$; г — коллаген III в контрольной группе, $\times 200$; д — эластин в основной группе, $\times 400$; е — эластин в контрольной группе, $\times 200$

Таким образом, при ОиВВПО развивается нарушение морфологического строения связочного аппарата матки, проявляющееся развитием фиброзирования, отека, дистрофическими изменениями гладкомышечных клеток, а также нарушением соотношения коллагенов I и III типа в сторону преобладания коллагена III типа. Кроме того, развивается разрыхление соединительной ткани, проявляющееся ее дезорганизацией, что обнаруживается при морфологическом исследовании. Для прочности соединительной ткани не менее важно соотношение различных типов коллагенов, особенно I и III, а в нашем исследовании установлено, что при ОиВВПО происходит нарушение этого баланса в сторону преобладания коллагена III, относящегося к группе эмбриональных белков. Особое значение в патогенезе ОиВВПО имеет снижение количества и изменение качества эластических волокон, с развитием их фрагментации, что также подтверждается данными гистохимического и иммуногистохимического исследования с эластином. В основной группе эластин выявляется в виде небольших глыбок в экстрацеллюлярном матриксе, тогда как в контроле отмечается его более значительное накопление по ходу коллагеновых волокон. Возможно, нарушение распределения эластина и изменение его количества изначально связано с нарушенным содержанием коллагеновых волокон, так как, по данным литературы, установлено, что развитие эластического каркаса начинается на коллагеновых волокнах (Шехтер А.Б.). Нарушение в распределении и строении эластических волокон, несомненно, отрицательно сказывается на развитии сосудистого русла, что приводит к ухудшению микроциркуляции, вероятно, проявляющемуся развитием дезорганизации соединительной ткани.

Необходимы дальнейшие исследования особенностей связочного аппарата матки при ОиВВПО, направленные на поиски диагностических маркеров, с помощью которых будет возможно выявлять группы риска женщин по развитию опущения гениталий.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Bortolini M.A., D'aa E.E.* Rizk (2011) — Genetics of pelvic organ prolapse: crossing the bridge between bench and bedside in urogynecologic research // *IntUrogynecol J* 22:1211—1219.
- [2] *Bortolini M.A., Drutz H.P., Lovatsis D., Alarab M.* (2010) Vaginal delivery and pelvic floor dysfunction: current evidence and implications for future research // *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 21(8):1025—1030.
- [3] *Crepin G., Cosson M., Lucot J.P., Colinet P.* Genital prolapse in young women: a topical issue // *Bull AcadNatl Med.* 2007 Art-May; 191(4—5): 827—36; discussion 836.
- [4] *Drutz H.P., Alarab M.* (2006) Pelvic organ prolapse: demographics and future growth prospects // *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 17(Suppl 1): S6—S9.
- [5] *Duru C., Jha S., Lashen H.* Urodynamic outcomes after hysterectomy for benign conditions: A systematic review and meta-analysis // *Obstet. GynecolSurv.* — 2012. — Vol. 67, № 1. — P. 45—54.
- [6] *Dzanaeva D.B.* Complex treatment of complicated genital prolapse: thesis, PhD. 2008.
- [7] *Ilyina I.U.* Diagnostics and management of patients with connective tissue dysplasia and gynecological pathology. Thesis abstract PhD. — Moscow, 2013. p. 30.
- [8] *Kerkhof M.H., Hendriks L., Brölmann H.A.* (2009) Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse — a review of the current literature // *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 20(4):461—474.

- [9] *Klutke J., Ji Q., Campeau J. et al* (2008) Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse. *ActaObstetGynecolScand* 87:111—115.
- [10] *Kovaleva L.A., Balan V.E., Goncharovskaya Z.L.* Violation of urination estimation in pregnant // *Akusherstvo i Gynecologiya*. — 2009. — № 3. — P. 55—58.
- [11] *Shalaev O.N., Radzinsky V.E., Zarkov P.V. et al.* // *Problemi Reprodukci*. Special addition. Technologies of the XXI century in gynecology. — Moscow, 2008. p. 127.
- [12] *Smolnova T.U.* Clinico-pathological aspects of female genital prolapsed and pelvic structures pathology in women with connective tissue dysplasia // *Thesis*. — Moscow, 2009 — p. 221.
- [13] *Stothers L., Friedman B.* Risk factors for the development of stress urinary incontinence in women // *Curr. Urol. Rep.* — 2011. — Vol. 12, № 5. — P. 363—369.
- [14] *Tennstedt S.L., Fitzgerald M.P.* Quality of life in women with stress urinary incontinence // *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* — 2007. — Vol. 18, № 5. — P. 543—549.
- [15] *Yasthuk A.G.* Scientifically based rehabilitation in women with genital prolapsed and practical realization (clinic-genetical aspects): Thesis abstract PhD. — Moscow, 2009. P. 3, 15.

IMMUNIHISTOCHEMICAL ANALYSES OF COLLAGEN I AND III AND ELASTIN IN UTERI LIGAMENTS IN FEMALE GENITAL PROLAPSE

M.L. Khanzadyan, R. Konnon

The Department of Obstetrics and Gynecology with course of Perinatology
Faculty of Medicine
Peoples' Friendship University of Russia
Miklooho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

T.A. Demura

Anatomic Pathology department
Sechenov First Moscow State Medical University
Trubetskaya str., 8, Moscow, Russia, 119991

The frequency of the female genital prolapse varies from 34,1% to 56,3% in different countries. Pathogenesis and morphological changes in uteri ligaments in female genital prolapse are not clear and have to be investigated.

The goal of our study was to investigate uteri ligaments in female genital prolapse by immunohistochemical analyses of collagen I and III and elastin.

The study was performed on biopsies of sacro-uterine and round ligaments from 15 women with genital prolapse and 15 women without prolapse. The tissues were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut for the slide. Immunohistochemistry was done with primary antibodies collagen I and III (Novus Biologicus, 1:100 и 1:200 and elastin (Thermo Scientific, 1:100).

Morphological analyses of ligaments in prolapse showed fibrosis and elastic fibers fragmentation. Immunohistochemical analyses revealed collagens disbalance: with prevalence of collagen III and decrease in elastin compared with control. Impairment in elastic fibers quantity and distribution affects microcirculation and results in connective tissue desorganisation in uterine ligaments, leading to genital prolapse. Further investigations are needed to reveal diagnostic markers and women at risk.

Key words: female genital prolapse, sacro-uterine and round ligaments, collagen I and III, elastin.