

УДК 618.14:611.1/.8

НОСЕНКО О.М., КОСЮГА О.М., РУТИНСЬКА Г.В.
Одеський національний медичний університет, м.Одеса

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ РЕЦЕПТОРІВ ОКСИТОЦИНУ В МАТЦІ У ПАЦІЄНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ З АДЕНОМІОЗОМ

Аномальна скорочувальна активність матки може лежати в основі важливих репродуктивних розладів при аденоміозі, таких як безпліддя, недостатність імплантації, спонтанний викидень або передчасні пологи та інші великі акушерські синдроми.

Метою роботи стало вивчення експресії окситоцинових рецепторів в матці з аденоміозом у жінок репродуктивного віку в залежності від фази менструального циклу і відділу матки.

Матеріал і методи дослідження. Проведено морфологічне та імуногістохімічне вивчення видалених маток 62 хворих репродуктивного віку. До основної групи увійшли 32 жінки, прооперовані з приводу больової форми аденоміозу, а до контрольної групи – 30 пацієнток, гістеректомія яким була виконана з приводу CIN III або раку шийки матки I стадії без явищ ендометріозу. Імуногістохімічне вивчення експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні за допомогою поліклональних кролячих антитіл.

Результати дослідження. При аденоміозі експресія окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні істмічної області не показала значущої різниці з такою в контролі в проліферативну фазу менструального циклу ($0,212 \pm 0,006$ проти $0,195 \pm 0,005$ ум. од., $p > 0,05$), проте в секреторній фазі була значно вище ($0,165 \pm 0,008$ проти $0,112 \pm 0,004$ ум. од., $p < 0,01$). У матковій сполучній зоні дна матки експресія окситоцинових рецепторів при аденоміозі була статистично значуще вище, ніж в контролі, не тільки в проліферативну ($0,231 \pm 0,006$ проти $0,167 \pm 0,005$ ум. од., $p < 0,01$), але й в секреторну фазу менструального циклу ($0,177 \pm 0,005$ проти $0,138 \pm 0,004$ ум. од., $p < 0,01$). Передопераційне ультразвукове обстеження пацієнток показало, що в контрольній групі перистальтика матки спостерігалася з середньою швидкістю $1,22 \pm 0,06$ хвили / хвилину, тоді як в групі з аденоміозом – $2,23 \pm 0,11$ хвили / хвилину ($p < 0,01$). Контрактильність матки мала пряму кореляційну залежність від експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні дна матки ($r = 0,76$, $p < 0,01$).

Висновки. При аденоміозі реєструється підвищена експресія окситоцинових рецепторів в проліферативну фазу менструального циклу в матковій сполучній зоні дна матки, в секреторну фазу – як в матковій сполучній зоні істмічного, так і фундального відділів матки. Контрактильність матки поза вагітністю має пряму кореляційну залежність від експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні дна матки.

Ключові слова: аденоміоз, маткова сполучна зона, окситоцинові рецептори, імуногістохімія, контрактильність міометрія.

Аденоміоз – широко поширене захворювання, яке впливає на репродуктивне здоров'я жінки [1]. Його популяційна поширеність оцінюється в літературі в діапазоні від 5 до 70%. Сучасна дефініція аденоміозу – це захворювання, при якому спостерігається інвазія залоз і

строми ендометрія в міометрій на глибину більше за 2,5 мм від маткової сполучної зони.

Маткова сполучна зона також відома як внутрішня частина міометрія та являє собою перехідний інтерфейс між ендометрієм і зо-

внішнім міометрієм і як функціонально, так і структурно відрізняється від зовнішнього міометрію. У невагітній матці міометральні скорочення поширюються виключно з цього шару, і їх амплітуда, частота і орієнтація корелюють з фазою менструального циклу [2]. Ці скорочення матки грають життєво важливу роль в декількох репродуктивних процесах, включаючи регуляцію менструального циклу, швидке спрямоване інтратубарне перенесення сперми, успішну імплантацію і глибоку плацентацию [3].

Оцінка товщини маткової сполучної зони при магнітно-резонансній томографії на сьогодні вважається найкращим негативним прогностичним фактором імплантаційної недостатності, а збільшення товщини маткової сполучної зони зворотно корелює з частотою імплантації. Було встановлено, що збій в імплантації відбувається досить часто, коли середня товщина маткової сполучної зони перевищує 7 мм [4, 5]. Максимальна товщина і нерівномірність маткової сполучної зони у жінок з аденоміозом значно більше, ніж у жінок без аденоміозу. Товщина її більше за 12 мм з дуже високою часткою ймовірності вказує на наявність аденоміозу. У роботах останніх років показано, що тривимірна трансвагінальна сонографія може виявитися точним діагностичним інструментом, який може застосовуватися легко і багаторазово у пацієнток з аденоміозом [6].

Маткова сполучна зона є гормонзалежним компартментом матки і вузькоспеціалізовані хвилі скорочення відбуваються виключно з неї і беруть участь в регуляції різних репродуктивних подій, таких як транспорт сперматозоїдів, імплантація ембріона, глибока плацентация і менструальна кровотеча. Загальновідомо, що окситоцин може значно збільшувати частоту перистальтичних скорочень матки і є одним з найбільш важливих медіаторів для регуляції скорочення матки не тільки під час вагітності, але і під час невагітного стану. Окситоцинові рецептори широко експресуються в епітеліальних і гладком'язових клітинах матки, в ендометріюїдних гетеротопіях [3]. Ультразвукові дослідження в реальному часі продемонстрували перистальтичні рухи, які залежать від рівня окситоцину, обмежені ендометрієм і матковою сполучною зоною в невагітній матці [7]. Показані зміни амплітуди, частоти і напрямку скоро-

чень МСЗ в нормальній матці і матці з аденоміозом у відповідності з фазами менструального циклу [3], а також більш високий рівень окситоцину в сироватці крові й більш висока частота скорочень матки у пацієнток з аденоміозом [8].

Аномальна скорочувальна активність матки може лежати в основі важливих репродуктивних розладів при аденоміозі, таких як безпліддя, недостатність імплантації, спонтанний викидень або передчасні пологи. Найбільш переконливо про роль аденоміозу в патогенезі невиношування вагітності свідчать результати проспективних досліджень, проведених в циклах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). При штучному заплідненні показник викиднів першого триместру вище у жінок з аденоміозом у порівнянні з контролем [9, 10]. У пацієнток з аденоміозом при ДРТ з донорством ооцитів частота викиднів значуще вище в групі аденоміозу (13,1%), ніж в групі аденоміоз + ендометріоз (6,1%) і контролі (7,2%) [11].

МЕТОЮ роботи стало вивчення експресії окситоцинових рецепторів в матці з аденоміозом у жінок репродуктивного віку в залежності від фази менструального циклу і відділу матки.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено морфологічне та імуногістохімічне вивчення видалених маток 62 хворих репродуктивного віку. До основної групи А увійшли 32 жінки, прооперовані з приводу больової форми аденоміозу, а до контрольної групи Б – 30 пацієнток з регулярним менструальним циклом, гістеректомія яким була виконана з приводу цервікальної інтраепітеліальної неоплазії III (CIN III) або раку шийки матки I стадії без явищ генітального ендометріозу. Аналогічний вибір контрольної групи вказується в інших дослідженнях, присвячених вивченню експресії окситоцинових рецепторів в клітинах гладкої мускулатури матки [13, 20]. Пацієнтки груп А і Б на протязі 6 місяців до операції не отримували будь-яку гормональну терапію, не використовували внутрішньоматкові спіралі, не мали в цей період будь-яких вагітностей і внутрішньоматкових маніпуляцій.

Усі жінки пройшли повне інструментальне та лабораторне передопераційне обстеження. Оперативні втручання були проведені в плановому порядку. Серед пацієнток групи А 17 осіб були прооперовані в проліферативну фазу менструального циклу, 15 – в секреторну; групи Б – відповідно 14 і 16. У всіх випадках діагноз був підтверджений гістологічно.

Зразки операційних матеріалів, що містили ендометрій і маткову сполучну зону, були вирізані з істмічних і фундальних областей передньої стінки матки після її розтину в сагітальній площині. Отримані зразки тканин поміщали в нейтральний забуферений 10% розчин формаліну (рН 7,4) и фіксували протягом доби. После дегідратації шматочки заливали в парафін. На ротаційному мікротомі Microm HM325 з системою переносу зрізів STS («Carl Zeiss», Німеччина) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 4 мкм і обробляли їх для імуногістохімічного фарбування. Після депарафінізації і регідратації зрізи нагрівали в мікрохвильовій печі (700 Вт) в цитратно-буферному сольовому розчині (9,0) протягом 12 хв. і охолоджували при кімнатній температурі для отримання антигену. Кожен розділ інкубували з краплею 3% H₂O₂ деіонізованої води (PV-6000, Wuxi, Китай) протягом 20 хв. при температурі 37°C. Після двох промивок з фосфатно-сольовим буфером зрізи інкубували з поліклональними кролячими антитілами до окситоцинових рецепторів (розведення 1:100, bs-1314R, Bioss, Китай) протягом ночі при температурі 4°C. Секції негативного контролю обробляли шляхом пропускання первинного

антитіла. В якості позитивного контролю використовували міометрій вагітної матки після кесарського розтину.

Вивчення гістологічних препаратів в світлі проводили на мікроскопі Olympus AX70 (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50, з'єднаною з персональним комп'ютером. Ряд з 4 випадкових зображень на декількох ділянках був узятий для кожного імунозабарвленого параметра для отримання середнього значення. Фарбування визначалося інтенсивністю кольору по оптичній щільності. Імуногістохімічні параметри оцінювали в області, яка визначалася повною оптичною щільністю і середньою оптичною щільністю, що еквівалентно інтенсивності фарбування в позитивних клітинах. Мікрофотографування і морфометрію виконували з використанням програми «ANALYSIS Pro 3.2» («SoftImainq», Німеччина). Отримані дані статистично обробляли за допомогою програм EXCEL.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні дослідження спостерігали цитоплазматичне імунозабарвлення окситоцинових рецепторів у коричневий колір. Виявлено, що середня оптична щільність окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні в контрольній групі в проліферативну фазу циклу в істмічному відділі перевищувала таку в дні матки в 1,17 раза, тоді як в фазу секреції була нижче в 1,23 (рис. 1).

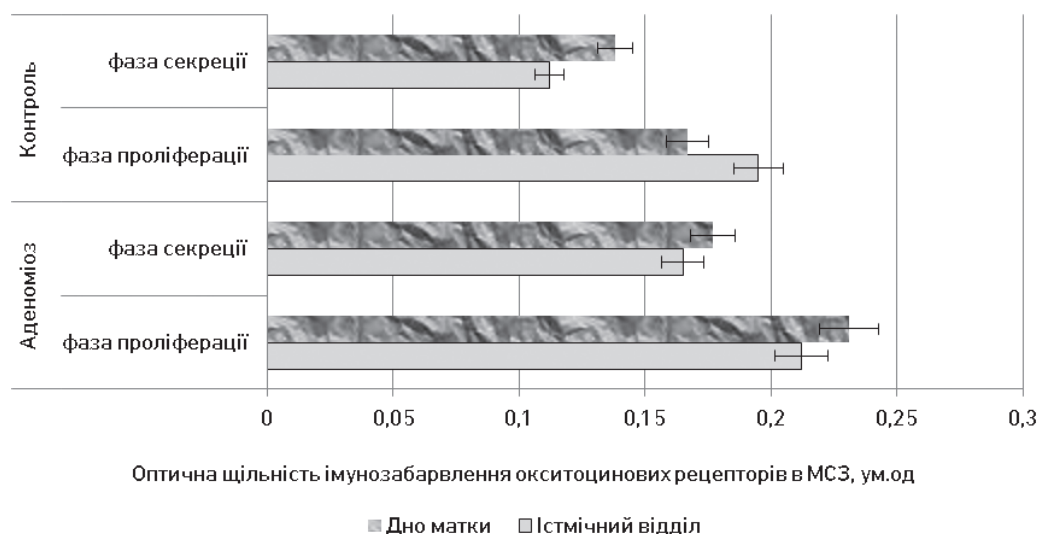


Рис.1 Розподіл експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні (МСЗ) в залежності від фази менструального циклу і відділу матки.

Кількість окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні в контрольній групі як в області перешийка, так і дна матки в проліферативну фазу перевищувала аналогічну в секреторну фазу менструального циклу відповідно в 1,74 і в 1,21 раза. Отримані дані відповідають даним літератури, згідно за якими експресія окситоцинових рецепторів в міометрії індукується стимуляцією естрадіолом і знижується під впливом прогестерону, відповідно їх кількість вище під час проліферативної фази в порівнянні з секреторною [3, 9].

При аденоміозі експресія окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні матки в істмічній області не показала значущої різниці з такою в контролі в проліферативну фазу менструального циклу ($0,212 \pm 0,006$ проти $0,195 \pm 0,005$ ум. од., $p > 0,05$), проте в секреторній фазі була значно вище ($0,165 \pm 0,008$ проти $0,112 \pm 0,004$ ум. од., $p < 0,01$). У матковій сполучній зоні дна матки експресія окситоцинових рецепторів при аденоміозі була статистично значуще вище, ніж в контролі, не тільки в проліферативну ($0,231 \pm 0,006$ проти $0,167 \pm 0,005$ ум. од., $p < 0,01$), але й в секреторну фазу менструального циклу ($0,177 \pm 0,005$ проти $0,138 \pm 0,004$ ум. од., $p < 0,01$).

Передопераційне ультразвукове обстеження пацієнток показало, що в контрольній групі перистальтика матки спостерігалася з середньою швидкістю $1,22 \pm 0,06$ хвили / хвилину, тоді як в групі з аденоміозом – $2,23 \pm 0,11$ хвили / хвилину ($p < 0,01$). Статистично значуще збільшення контрактильності матки у пацієнток з аденоміозом у порівнянні з жінками, які не страждають на хворобу, можна пояснити підвищеною кількістю окситоцинових рецепторів при аденоміозі, що може привести до репродуктивних порушень. Отримані дані узгоджуються з даними літератури, згідно з якими частота перистальтичної активності при аденоміозі подвоюється на ранній і середній стадії менструального циклу в порівнянні з нормальними жінками [14]. При цьому, частота перистальтичної активності подібна частоті, що реєструється у нормальних жінок з внутрішньовенною ін'єкцією окситоцину [15].

При кореляційному аналізі виявлено, що контрактильність матки має пряму кореляційну залежність від експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні дна матки ($r = 0,76$, $p < 0,01$). Закон цієї відповідності найкраще апроксимується поліноміальною залежністю (рис. 2).

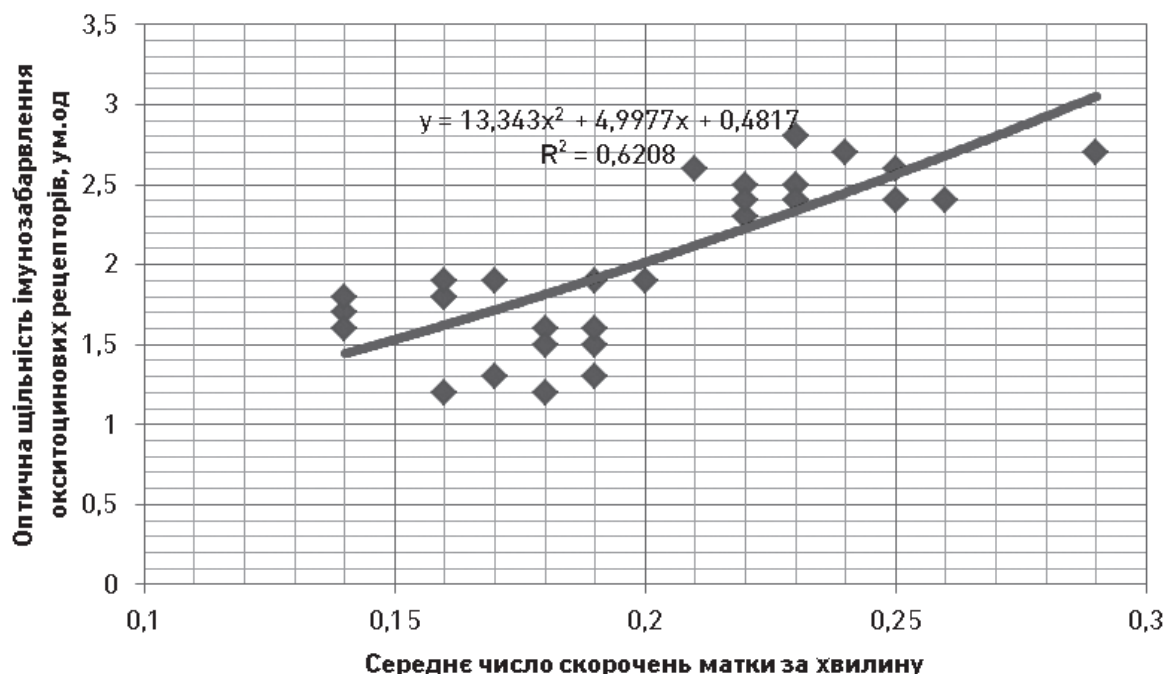


Рис. 2 Кореляційне поле, формула регресії та коефіцієнт апроксимації рівнів експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні дна матки та контрактильності матки.

ВИСНОВКИ

При аденоміозі рееструється підвищена експресія окситоцинових рецепторів в проліферативну фазу менструального циклу в матковій сполучній зоні дна матки, в секреторну фазу – як в матковій сполучній зоні істмічного, так і фундального відділів матки. Контрактильність матки поза вагітністю має пряму кореляційну залежність від експресії окситоцинових рецепторів в матковій сполучній зоні дна матки ($r=0,76$, $p<0,01$). Аномальна картина експресії рецепторів окситоцину в матковій сполучній зоні у жінок з аденоміозом може привести до підвищеної та дискоординованої контрактильності матки, зниження фертильності та виношування вагітності.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Garavaglia E, Audrey S, Annalisa I, et al. Adenomyosis and its impact on women fertility. *Iran J Reprod Med.* 2015 Jun; 13(6): 327–336. -20
2. De ZD, Bulletti C, Farichin R, et al. Contractility of the non-pregnant uterus: the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 943: 172–84.
3. Zhang Y, Yu P, Sun F, et al. Expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone in women with adenomyosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2015; 94(4): 412-8.
4. Maubon A, Fauray A, Kapella M, et al. Uterine junctional zone at magnetic resonance imaging: a predictor of in vitro fertilization implantation failure. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010; 36: 611–618.
5. Harada T, Khine YM, Kaponis A, et al. The Impact of Adenomyosis on Women's Fertility. *Obstet Gynecol Surv.* 2016; 71(9): 557–568.
6. Puente J M, Fabris A, Patel J, et al. Adenomyosis in infertile women: prevalence and the role of 3D ultrasound as a marker of severity of the disease. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016; 14: 60.
7. Lesny P, Killick SR. The junctional zone of the uterus and its contractions. *BJOG.* 2004; 111(11):1182–9.
8. He Y, Wu H, He XJ, et al. Administration of atosiban in patients with endometriosis undergoing frozen-thawed embryo transfer: a prospective, randomized study. *Fertil Steril.* 2016; 106(2):416–22.
9. Salim R, Riris S, Saab W, et al. Adenomyosis reduces pregnancy rates in infertile women undergoing IVF. *Reprod BioMed Online.* 2012; 25: 273–277. -16
10. Vercellini P, Consonni D, Drudi D, et al. Uterine adenomyosis and in vitro fertilization outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2014; 29: 964–977. -15
11. Martinez-Conejero JA, Morgan M, Montesinos M, et al. Adenomyosis does not affect implantation, but is associated with miscarriage in patients undergoing oocyte donation. *Fertil Steril.* 2011;96:943–950. -14

12. Guo SW, Mao XY, Ma QL, Liu XS. Dysmenorrhea and its severity are associated with increased uterine contractility and overexpression of oxytocin receptor (OTR) in women with symptomatic adenomyosis. *Fertil Steril.* 2013;99:231–40.
13. Zhang Y, Yu P, Sun FJ, Li TC, et al. Expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone in women with adenomyosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2015;94(4):412–8.
14. Richter ON, Bartz C, Dowaji J, et al. Contractile reactivity of human myometrium in isolated non-pregnant uteri. *Hum Reprod.* 2006;21(1):36–45.
15. Leyendecker G, Kunz G, Noe M, et al. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update.* 1998; 4(5): 752–62

РЕЗЮМЕ

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ОКСИТОЦИНА В МАТКЕ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С АДЕНОМИОЗОМ

НОСЕНКО Е.Н., КОСЮГА О.Н.,
РУТИНСКАЯ А.В.

Аномальная сократительная активность матки может лежать в основе важных репродуктивных расстройств при аденомиозе, таких как бесплодие, недостаточность имплантации, спонтанный выкидыш или преждевременные роды и другие большие акушерские синдромы.

Целью работы стало изучение экспрессии окситоциновых рецепторов в матке с аденомиозом у женщин репродуктивного возраста в зависимости от фазы менструального цикла и отдела матки.

Материал и методы. Проведено морфологическое и иммуногистохимическое изучения удаленных маток 62 пациенток репродуктивного возраста. В основную группу вошли 32 женщины, прооперированные по поводу болевой формы аденомиоза, а в контрольную группу - 30 пациенток, гистерэктомию которым была выполнена по поводу CIN III или рака шейки матки I стадии без явлений эндометриоза. Иммуногистохимическое изучение экспрессии окситоциновых рецепторов в маточной соединительной зоне проводили с помощью поликлональных кроличьих антител.

Результаты. При аденомиозе экспрессия окситоциновых рецепторов в маточной соединительной зоне истмической области не показала значимой разницы с таковой в контроле в пролиферативную фазу менструального

цикла ($0,212 \pm 0,006$ против $0,195 \pm 0,005$ усл. ед., $p < 0,05$), однако в секреторной фазе была значительно выше ($0,165 \pm 0,008$ против $0,112 \pm 0,004$ усл. ед., $p < 0,01$). В маточной соединительной зоне дна матки экспрессия окситоциновых рецепторов при аденомиозе была статистически значимо выше, чем в контроле, не только в пролиферативную ($0,231 \pm 0,006$ против $0,167 \pm 0,005$ усл. ед., $p < 0,01$), но и в секреторную фазу менструального цикла ($0,177 \pm 0,005$ против $0,138 \pm 0,004$ усл. ед., $p < 0,01$). Предоперационное ультразвуковое обследование пациенток показало, что в контрольной группе перистальтика матки наблюдалась со средней скоростью $1,22 \pm 0,06$ волны / мин, тогда как в группе с аденомиозом - $2,23 \pm 0,11$ волны / мин ($p < 0,01$). Контрактильность матки имела прямую корреляционную зависимость от экспрессии окситоциновых рецепторов в маточной соединительной зоне дна матки ($r = 0,76$, $p < 0,01$).

Выводы: при аденомиозе регистрируется повышенная экспрессия окситоциновых рецепторов в пролиферативную фазу менструального цикла в маточной соединительной зоне дна матки, в секреторную фазу - как в маточной соединительной зоне истмического, так и фундального отделов матки. Контрактильность матки вне беременности имеет прямую корреляционную зависимость от экспрессии окситоциновых рецепторов в маточной соединительной зоне дна матки.

Ключевые слова: аденомиоз, маточная соединительная зона, окситоциновые рецепторы, иммуногистохимия, контрактильность миометрия.

SUMMARY

PECULIARITIES OF EXPRESSION OF OXYTOCIN RECEPTORS IN UTERUS IN PATIENTS OF REPRODUCTIVE AGE WITH ADENOMYOSIS

NOSENKO OM, KOSYUGA OM,
RUTINSKAYA GV

Abnormal contractile activity of the uterus can underlie important reproductive disorders in adenomyosis, such as infertility, inadequate implantation, spontaneous miscarriage or premature birth and other great obstetric syndromes.

The aim of the study was to study the expression of oxytocin receptors in the uterus with

adenomyosis in women of reproductive age, depending on the phase of the menstrual cycle and the uterine department.

Material and methods. Morphological and immunohistochemical studies of remote uteri of 62 women of reproductive age were carried out. The main group included 32 women operated on for the painful form of adenomyosis, and in the control group - 30 patients, a hysterectomy which was performed for CIN III or cervical cancer of the 1st stage without the phenomena of endometriosis. Immunohistochemical studies of the expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone were carried out using polyclonal rabbit antibodies.

Results. In adenomyosis, the expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone of the isthmus region showed no significant difference with that in control in the proliferative phase of the menstrual cycle (0.212 ± 0.006 vs 0.195 ± 0.005 units, $P < 0.05$), but in the secretory phase it was significantly higher (0.165 ± 0.008 against 0.112 ± 0.004 conventional units, $p < 0.01$). In the uterine junctional zone of the uterine fundus, the expression of oxytocin receptors in adenomyosis was statistically significantly higher than in the control, not only in the proliferative (0.231 ± 0.006 vs 0.167 ± 0.005 UU, $p < 0.01$), but also in the secretory phase of the menstrual cycle (0.177 ± 0.005 vs 0.138 ± 0.004 standard units, $p < 0.01$). Pre-operative ultrasound examination of patients showed that in the control group the peristalsis of the uterus was observed at an average rate of 1.22 ± 0.06 wave / min, whereas in the group with adenomyosis it was 2.23 ± 0.11 wave / min ($p < 0.01$). Uterine contracture had a direct correlation dependence on the expression of oxytocin receptors in the uterine connective zone of the uterine fundus ($r = 0.76$, $p < 0.01$).

Conclusions: at adenomyosis increased expression of oxytocin receptors in the proliferative phase of the menstrual cycle in the uterine junctional zone of the uterine fundus is recorded, in the secretory phase - both in the uterine connective zone of the isthmus and fundamental uterine regions. Hysterectomy outside of pregnancy has a direct correlation dependence on the expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone of the uterine fundus.

Key words: adenomyosis, uterine junctional zone, oxytocin receptors, immunohistochemistry, contractility of myometrium.