

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ТКАНИ ТАЗОВЫХ СПАЕК У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА

А. Н. Рыбалка, А. Н. Сулима, А. А. Давыдова, Е. К. Яковчук*, С. С. Анин

Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского

Россия, 295006, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

* email: miss.yakovchuk@mail.ru

В статье представлены данные в сравнительном аспекте об особенностях экспрессии и распределения провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α) в ткани интактной брюшины малого таза и спайках у женщин репродуктивного возраста с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ). При иммуногистохимическом исследовании (ИГХ) тканей интактной париетальной брюшины провоспалительные цитокины ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α определялись лишь в единичных клетках, что расценено как отрицательный результат, и свидетельствует об отсутствии воспаления в брюшной полости и органах малого таза. В ткани спаек пациенток с хроническими ВЗОМТ отмечалась низкая экспрессия маркеров ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α . Низкая экспрессия провоспалительных цитокинов в спайках при хронических ВЗОМТ свидетельствует об угнетении эксудативной фазы воспалительного процесса и активации процессов ремоделирования фиброзной ткани с усилением коллагенообразования и формированием плотных грубоволокнистых сращений.

Определение экспрессии и исследование провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α) в тканях спаек при хронических ВЗОМТ может оказать существенную помощь в прогнозировании их образования и рецидива после хирургического лечения.

Ключевые слова: цитокины, спайки, репродуктивный возраст, хронические воспалительные заболевания органов малого таза.

FEATURES OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES EXPRESSION IN PELVIC ADHESIONS TISSUE AT WOMEN WITH PELVIC CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES

A. N. Rybalka, A. N. Sulima, A. A. Davydova, Y. K. Yakovchuk*, S. S. Anikin

V.I. Vernadsky Crimean Federal University

5/7 Lenin Avenue, 295006, Simferopol, Russia

* email: miss.yakovchuk@mail.ru

The data in a comparative perspective about the peculiarities of expression and distribution of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-2, IL-6 and TNF- α) in tissue of intact peritoneum and pelvic adhesions in women of reproductive age with chronic inflammatory diseases of the pelvic organs (PID) are described in this article. In immunohistochemical study of intact parietal peritoneum the proinflammatory cytokines IL-1, IL-2, IL-6 and TNF- α was determined only in a few cells, which is regarded as a negative result and indicated the absence of inflammation in the abdominal cavity and pelvic organs. Low expression of markers of IL-1, IL-2, IL-6 and TNF- α was observed in the tissue of adhesions in patients with chronic PID. Low expression of proinflammatory cytokines in adhesions in chronic PID indicates the inhibition of the exudative phase of the inflammatory process and activation of the fibrous tissue remodeling processes with increased collagen formation and the formation of coarse-fibered adhesions. The definition of proinflammatory cytokines expression (IL-1, IL-2, IL-6 and TNF- α) in adhesions' tissue at chronic PID can provide substantial assistance in predicting their formation and recurrence after surgical treatment.

Keywords: cytokines, adhesions, reproductive age, pelvic chronic inflammatory diseases.

Актуальность работы

В структуре гинекологической заболеваемости воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) занимают второе место после миомы матки, поражая каждую четвертую пациентку репродуктивного возраста на планете и приводя к функциональным и структурным изменениям в репродуктивной системе [1, 2]. Многочисленные исследования достоверно доказывают, что ВЗОМТ развивается на фоне нарушенного иммунного равновесия. Трудности ведения таких пациенток связаны с чрезвычайно вариабельной клинической картиной и тяжестью течения заболевания [3, 4, 5]. В большинстве случаев необходима разработка плана долговременного ведения пациенток с целью получения максимального эффекта от проводимого лечения, профилактики рецидива и повторных оперативных вмешательств.

Большинство работ по ВЗОМТ посвящены изучению цитокинов в перitoneальной жидкости, работ по изучению цитокинов в тканях спаек в литературе нет [6, 7, 8].

Цель исследования

Изучить в сравнительном аспекте особенности экспрессии и распределения провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α) в ткани интактной брюшины малого таза и спайках у женщин репродуктивного возраста с ВЗОМТ.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили фрагменты операционного материала, а именно участки интактной париетальной брюшины, спайки и их участки, полученные

у 68 женщин репродуктивного возраста при проведении оперативной лапароскопии, которые были разделены на две группы. 30 участков ткани интактной париетальной брюшины от пациенток, которым была проведена добровольная хирургическая стерилизация и не имеющих в анамнезе гинекологические заболевания, вошедших в контрольную группу. Основная группа – 38 спаек от пациенток, имеющих в анамнезе хронические ВЗОМТ. Каждая пациентка была подробно информирована об исследовании и предоставляла информированное согласие на участие в нем.

Ткань париетальной брюшины и спайки малого таза с целью исследования получали при проведении лапароскопии по следующей методике: ткань брюшины и спайка малого таза после рассечения и коагуляции вытягивалась через троакар, промывались в физиологическом растворе (0,9% хлорида натрия) с последующей консервацией материала в 10% нейтральном растворе формалина (50 мл) в течение 24 часов. Во время проведения морфологического исследования участки париетальной брюшины и спайки подвергали проводке по стандартной методике с использованием парафиновой заливки и окрашивали гематоксилином и эозином [9, 10]. Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартной методике с использованием парафиновых блоков, реактивов компании Dako и моноклональных антител к ФНО- α (Anti-TNF alpha antibody (ab6671)) и ИЛ-1 (Anti-IL-1alpha antibody [as5] (ab17281)) компании Abcam с автоматической системой окрашивания DakoCytomation [11]. Исследование препаратов в проходящем свете проводили на исследовательском микроскопе OLYMPUS CX 41 с фотокамерой DCM 130. Для оценки результатов иммуногистохимического исследования проводили подсчет количества позитивно-окрашенных клеток в 10 полях зрения на 400-кратном увеличении микроскопа, с учетом интенсивности окрашивания клеток. Интенсивность иммуногистохимической реакции к интерлейкинам оценивали в цитоплазме и мембранных структурах клеток по методу гистологического счета HScore по формуле: $S=1a+2b+3c$, где a – % слабоокрашенных клеток, b – % умеренно окрашенных клеток, c – % сильно окрашенных клеток. 1,2,3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах. Степень выраженности экспрессии интерлейкинов расценивали: 0 – 10 баллов – отсутствие экспрессии; 11 – 100 баллов – слабая экспрессия; 101 – 200 баллов – умеренная экспрессия; 201 – 300 баллов – выраженная экспрессия.

Группировка, анализ и статистическая обработка цифрового материала, полученного в результате исследований, осуществляли методами вариационного анализа с использованием статистических пакетов Statistica for Windows 6.0. Во время группового сравнения относительных и средних величин использован критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони (эффекты считали достоверными при $p < 0,05$, корреляционная связь оценивалась по коэффициенту Пирсона).

Результаты исследования

Все пациентки исследуемых групп находились в возрастном диапазоне от 19 до 49 лет, средний возраст в основной группе составил $32,9 \pm 0,1$ года, в контрольной – $33,8 \pm 0,4$ года. Средний возраст начала менархе в группах составил $13,2 \pm 0,3$ года без отсутствия достоверных отличий между показателями во всех группах. Достоверной разницы в частоте экстрагенитальной патологии у обследованных пациенток в обеих группах выявлено не было.

При ИГХ исследовании тканей париетальной брюшины у женщин контрольной группы провоспалительные цитокины ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α определялись лишь в единичных клетках, что необходимо расценивать как отрицательный результат, и свидетельствует об отсутствии воспаления в интактной брюшной полости и органах малого таза у этих женщин. (Рис.1, Рис. 2)

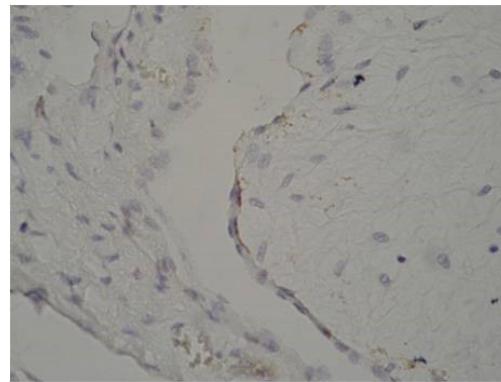


Рис. 1. Единичные гранулы позитивно окрашенного материала (ИЛ-1) в мезотелиальных клетках интактной брюшины. ИГХ. Увел. 400 \times

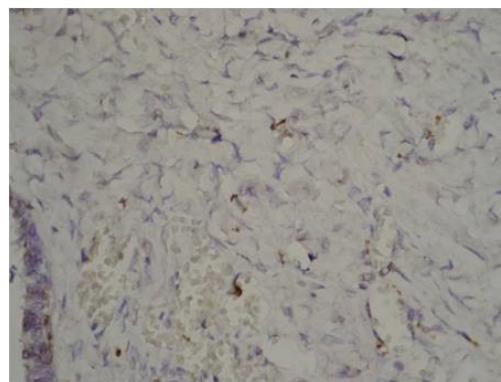


Рис. 2. Единичные ИЛ-6 слабоокрашенные клетки в интактной брюшине. ИГХ. Увел. 400 \times

Отмечена слабовыраженная экспрессия ФНО- α , составлявшая $35,0 \pm 0,2$ балла. Позитивное окрашивание выявлялось, прежде всего, в цитоплазме мезотелиоцитов, покрывающих спайку, реже в лимфоидно-макрофагальных скоплениях (Рис. 3).

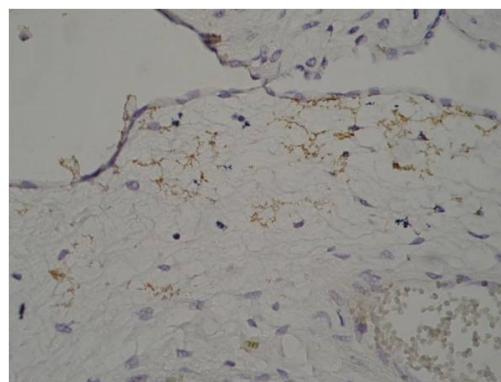


Рис. 3. Слабо выраженная экспрессия ФНО- α в ткани спаек воспалительного характера. ИГХ. Увел. 100 \times

ИЛ-1 также выявлялся в скучных количествах, преимущественно в цитоплазме мезотелиальных клеток и составлял $17,2 \pm 0,1$ балла (Рис. 4).

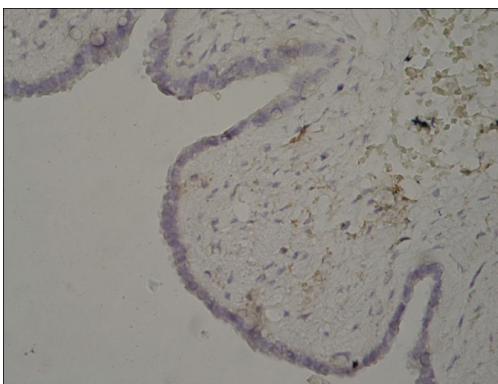


Рис. 4. Слабо выраженная экспрессия ИЛ-1 в цитоплазме фибробластов на фоне расстройства кровообращения в спайке воспалительного генеза. ИГХ. Увел. 400^х

Слабая экспрессия наблюдалась и в отношении ИЛ-2, составлявшая $19,0 \pm 0,5$ баллов. Позитивное окрашивание выявлялось, прежде всего, в цитоплазме периваскулярно расположенных лимфоцитов и рыхлой соединительной ткани (Рис. 5).

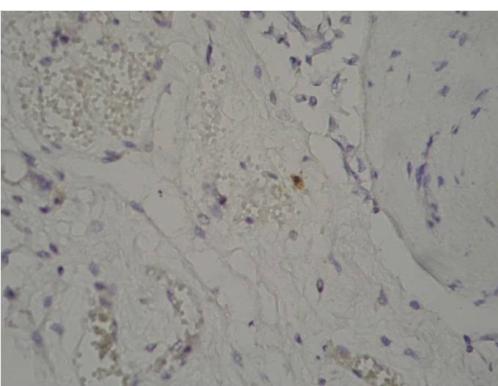


Рис. 5. Единичные периваскулярно расположенные ИЛ-2 позитивные клетки в послеоперационной спайке. ИГХ. Ув. 400^х

ИГХ ткани спаек у женщин, имевших в анамнезе воспалительные заболевания органов малого таза, характеризовались слабой, реже умеренной, экспрессией ИЛ-6, составлявшей $65,0 \pm 0,3$ балла. Позитивное окрашивание выявлялось, прежде всего, в цитоплазме мезотелиоцитов, покрывающих спайку и стенках артерий. Слабая и очаговая умеренная экспрессия ИЛ-6 определялась в полях рыхлой соединительной ткани, в цитоплазме фибробластов (Рис. 6).

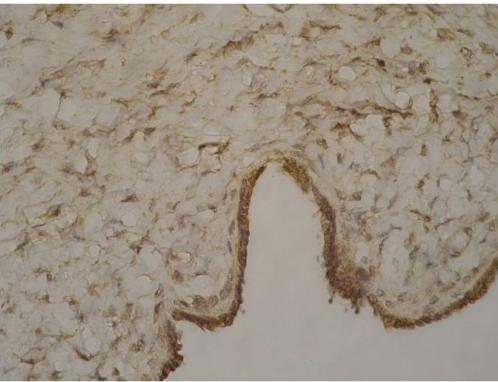


Рис. 6. Умеренно выраженная экспрессия ИЛ-6 в мезотелиоцитах и фибробластах спаек воспалительного генеза. ИГХ. Увел. 400^х

Выводы

Низкая экспрессия ограниченного профиля провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО- α) в спайках

при хронических ВЗОМТ свидетельствует об угнетении экссудативной фазы воспалительного процесса и активации процессов ремоделирования фиброзной ткани с усилением коллагенообразования и формированием плотных грубоволокнистых сращений.

Определение экспрессии и исследование провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО- α) в тканях спаек у пациенток репродуктивного возраста с ВЗОМТ является диагностически значимым и позволяет спрогнозировать их образование и рецидив после хирургического лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- Гаспаров А. С. Тазовые перитонеальные спаики: этиология, патогенез, диагностика, профилактика / А. С. Гаспаров, Е. Д. Дубинская. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2013. – 168 с.
- Дубинская Е. Д. Спаечный процесс в малом тазу – профилактика и лечение / Е. Д. Дубинская, А. С. Гаспаров, М. Ф. Дорфман [и др.] // Вестник РУДН. – 2011. – № 6 - С. 193-198.
- Adhesion awareness: a nationwide survey of gynaecologists / T. Meuleman, M. H. Schreinemacher, H. van Goor [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2013. –Vol. 169. – P. 353-359.
- Dinarello C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases / C. A. Dinarello // Blood. – 2011. –Vol. 117, № 14. – P. 3720-3732.
- Weber A. Interleukin-1 (IL-1) pathway / A. Weber, P. Wasiliew, M. Kracht // Sci. Signal. – 2010. –Vol. 3. –P. 1.
- Махмудова Г. М. Роль цитокинов в перитонеальной жидкости в распространении спаечного процесса / Г. М. Махмудова, С. Ю. Югай // Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний: сб. науч. работ / под ред. В. И. Кулакова, Л. В. Адамян. – М.: Пантори, 2006. – С. 248-249.
- Медведев Б. И. Уровень цитокинов и оксида азота в крови и перitoneальной жидкости, функциональные свойства перitoneальных макрофагов у женщин с тубально-перitoneальным бесплодием / Б. И. Медведев, С. Н. Теплова, Л. Ф. Зайнетдинова [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. - № 2. - С. 109-110.
- Cheong Y. C. IL-1, IL-6 and TNF- α concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions / Y. C. Cheong, J. B. Shelton, M. Richmond [et al.] // Human Reproduction. – 2002 – Vol. 17, № 1. – P. 69-75.
- Елисеев В. Г. Атлас микроскопического и ультрамикроскопического строения тканей и органов / В. Г. Елисеев, Ю. И. Афанасьев, Е. Ф. Котовский. – М.: Медицина, 1988. – 399 с.
- Binnebösel M. Macrophage and T-lymphocyte infiltrates in human peritoneal adhesions indicate a chronic inflammatory disease / M. Binnebösel, R. Rosch, K. Junge, [et al.] // World J. Surg. – 2008. –Vol. 32, № 2. – P. 296-304.
- Dabbs D. J. Diagnostic immunohistochemistry / D. J. Dabbs. –London: Churchill Livingstone, 2006. - 828 p.

Поступила в редакцию 28.04.2016