

УДК: 611.664-018

**КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ ИНТАКТНОГО И РУБЦОВО-ИЗМЕНЕННОГО МИОМЕТРИЯ**

Д.А. АТЯКШИН*, Е.В. ЕНЬКОВА*, В.А. ВУКОЛОВА**, Ю.С. РЫЖИКОВ**

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава
России, ул. Студенческая, д. 10, г. Воронеж, 394036, Россия

**БУЗ ВО «Воронежский родильный дом № 3», пр. Труда, д. 38, г. Воронеж, 394026, Россия

Аннотация. Несмотря на имеющиеся данные о том, что от 30 до 80% женщин после абдоминального родоразрешения могут рожать через естественные родовые пути с благополучным исходом для матери и плода, объективных критериев, которые свидетельствовали бы о безопасности таких родов, нет. Целью исследования явилось проведение сравнительной морфологической и иммуногистохимической оценки интактного и рубцово-измененного миометрия для выявления женщин, находящихся в группе риска по несостоятельности рубца на матке и развитию гипотонического кровотечения в последующую беременность. У 47 беременных проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование миометрия нижнего сегмента матки. 27 исследуемых образцов представляют собой ткань нижнего сегмента матки, измененную рубцом, после перенесенного ранее кесарева сечения, а 20 образцов – неизменный миометрий из области разреза на матке во время первого кесарева сечения. Проведенное морфологическое исследование показывает, что миометрий нижнего сегмента после перенесенного ранее кесарева сечения существенно сокращается в объеме, возрастает содержание волокнистого компонента внеклеточного матрикса соединительной ткани. Ретикулярные волокна, окружающие миоциты слабо выражены. Образование рубца на матке приводит к нарушению формирования пласта, наличие которого необходимо для реализации способности миометрия к сокращению. Возрастает содержание тучных клеток и их способности к дегрануляции и значительно снижается экспрессия α -гладкомышечного актина. Увеличение количества тучных клеток свидетельствует об их участии в патогенезе формирования рубцовой ткани. А неспособность миоцитов формировать пласт на фоне снижения экспрессии α -гладкомышечного актина приводит к снижению полноценной сократительной активности миометрия.

Ключевые слова: α -гладкомышечный актин, тучные клетки, триптаза позитивные тучные клетки, миоциты, иммуногистохимия.

**CLINICALLY RELEVANT MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL
CHARACTERISTICS OF THE INTACT AND SCARRED MYOMETRIUM**

D.A. ATIYAKSHIN*, E.V. ENKOVA*, V.A. VUKOLOV**, Y.S. RYZHIKOV**

*Voronezh State N. N. Burdenko Medical University of the Ministry of health of Russia,
Studencheskaya Str., 10, Voronezh, 394036, Russia

**Voronezh maternity hospital № 3, Trud Av., 38, Voronezh, 394026, Russia

Abstract. There is evidence that 30 to 80% of women after abdominal delivery can give birth through natural birth canals with a favorable outcome for the mother and fetus, however, there are no objective criteria that testify to the safety of such births. The study purpose was to comparative evaluate morphological and immunohistochemical characteristics of intact and scar-modified myometrium to identify women at risk for uterine scar failure and the development of hypotonic bleeding in subsequent pregnancy. In 47 pregnant women morphological and immunohistochemical study of the lower uterine segment myometrium was carried out. 27 the samples are a tissue of lower segment of the uterus, modified by the scar, after previously suffering a caesarean section, and 20 samples of unchanged myometrium of incision on the uterus during the first caesarean section. The morphological study shows that the myometrium of the lower segment after the previous Cesarean section is significantly reduced in volume, the content of the fibrous component of the extracellular matrix of connective tissue increases. Reticular fibers surrounding the myocytes are poorly expressed. The formation of a scar on the uterus leads to a violation of the formation, the presence of which is necessary for the implementation of the ability of myometrium to reduce. Increases the content of mast cells and their ability to degranulation and significantly reduced the expression of α -smooth muscle actin. The increase in the number of mast cells indicates their participation in the pathogenesis of scar tissue formation. And the inability of myocytes to form a layer against the background of a decrease in the expression of α -smooth muscle actin leads to a decrease in the full-fledged contractile activity of myometrium.

Key words: α -smooth muscle actin, mast cells, triptase positive mast cells, myocytes, immunohistochemistry.

Введение. За последние годы интерес исследователей к проблеме кесарева сечения не угас. Обусловлено это неуклонным ростом частоты абдоминального родоразрешения [5, 6]. Это можно объяснить изменением акушерской стратегии и расширением показаний к оперативному родоразрешению за счет активной перинатальной позиции, а также увеличением числа беременных с рубцом на матке. Увеличение частоты кесарева сечения обуславливает появление в современном акушерстве отдельной проблемы – ведения беременности и родов у женщин группы высокого риска [7]. Такая беременность сопряжена с множеством осложнений, возникающих как со стороны матери, так и плода. Основным и самым грозным из них является разрыв матки по рубцу, частота которого составляет 3,5-5% [5]. Кесарево сечение сопровождается значительной кровопотерей, превышающей по объему допустимую в 1,5-2 раза и таковую при физиологических родах – в 2-3 раза [5, 7]. Причиной тому является гистеротомия – интраоперационное рассечение стенки матки, во время которой нарушается анатомическая целостность мышечного органа на значительном его протяжении. Такая манипуляция приводит к разбалансировке сложных природных механизмов, которые обеспечивают надежный внутриматочный гемостаз в третьем периоде родов [3]. Ведь сокращение мышечной оболочки матки является главным механизмом, который ограничивает кровопотерю. Просвет спиральных артерий, обнажающихся на дне плацентарного ложа сразу после отделения последа, способны сомкнуть только мышечные волокна, окружающие эти сосуды в толще матки. Собственных ресурсов для окклюзии просвета спиральных артерий не существует. Поэтому остановка кровотока в этих сосудах возлагается на мышечные сокращения матки [3].

В работах зарубежных авторов был проведен анализ величины интраоперационной кровопотери во время повторного кесарева сечения. Результаты показали, что ее объем выше по сравнению с таковой при первом абдоминальном родоразрешении. Также на эту величину влияет и кратность проведения повторного кесарева сечения. С ростом количества операций возрастает величина интраоперационной кровопотери, и эта особенность обуславливается возрастающей длительностью оперативного вмешательства и гипотонией нижнего сегмента матки из-за рубцовых изменений [4]. Отсутствие достоверных методов оценки состоятельности рубца на матке после операции кесарева сечения обеспечивает целесообразность проведения исследований по изучению возможности использования морфологических и иммуногистохимических методов в качестве диагностических критериев состоятельности рубца на матке.

Материалы и методы исследования. У 47 беременных проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование миометрия нижнего сегмента матки. 27 исследуемых образцов представляют собой ткань нижнего сегмента матки, измененную рубцом, после перенесенного ранее кесарева сечения, а 20 образцов – неизмененный миометрий из области разреза на матке во время первого кесарева сечения. Проведен ретроспективный анализ анамнеза, течения беременности и родов, предшествующих кесареву сечению, анализ течения настоящей беременности, ультразвуковое исследование нижнего сегмента матки во время настоящей беременности, анализ выписок из истории предыдущего кесарева сечения. На конечном этапе все беременные родоразрешены оперативным путем с дальнейшим морфологическим и иммуногистохимическим исследованием области нижнего сегмента матки, взятого во время кесарева сечения. У каждой пациентки было получено информированное согласие на проведение исследования. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине и в течение 24 ч доставляли в лабораторию.

Для обзорных целей срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином согласно общепринятому протоколу [2]. Коллагеновые волокна, входящие в состав фибриллярного компонента внеклеточного матрикса соединительной ткани стенки матки, окрашивали железным гематоксилином Вейгерта и пикрофуксином по методике ван Гизона [11], ретикулярные волокна выявляли импрегнацией азотнокислым серебром по Футу [11]. Для оценки соотношения сократительных и соединительнотканых структур в стенке матки использовали окрашивание азаном по Гейденгайну [11].

С целью идентификации тучных клеток проводили традиционное метахроматическое окрашивание толуидиновым синим [2]. Для анализа состояния популяции тучных клеток в каждом поле зрения при использовании объектива $\times 20$ оценивали число тучных клеток и соотношение недегранулированных и дегранулированных форм [9].

Имуногистохимическое окрашивание использовалось для оценки экспрессии α -гладкомышечного актина в сократительных элементах стенки матки и идентификации триптазы тучных клеток. Гладкомышечный актин выявляли иммуномечением поликлональными кроличьими антителами к гладкомышечному актину (*anti-alpha smooth muscle actin antibody, AbCam, #ab5694*, разведение 1:300) согласно стандартному протоколу [10]. Триптазу идентифицировали маркированием мышинными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (*Anti-Mast Cell Tryptase antibody, AbCam, #ab2378*, разведение 1:2000) согласно стандартному протоколу [10].

Результаты и их обсуждение. В группе контроля идентифицируются хорошо выраженные пласты гладких миоцитов, разделенные незначительным количеством соединительнотканых элементов (рис. 1). Миоциты имеют веретеновидную форму, ядро – в центре, палочковидное или вытянутое. Сократитель-

ные элементы превалируют над соединительнотканными структурами стромы (рис. 2). Сосуды окружены пластами гладких миоцитов, которые формируют функциональный синцитий (рис. 2-Б). Ретикулярные волокна хорошо выражены, входят в состав эндомизия, фибриллы имеют волнообразный ход и оплетают гладкие миоциты снаружи (рис. 3). В результате гладкие миоциты формируют пласт, обеспечивающий эффективное сокращение.

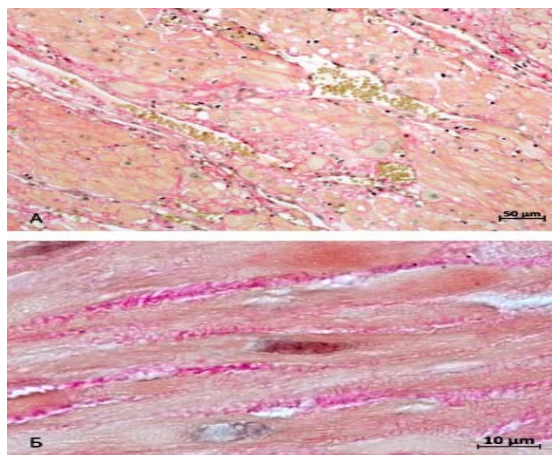


Рис. 1. Миометрий нижнего сегмента матки. Контрольная группа. А – хорошо определяются пласты гладкомышечных клеток, разделенных незначительным количеством соединительной ткани (красный цвет); Б – гладкие миоциты прилежат друг к другу, обладают вытянутой веретеновидной формой и палочковидными ядрами

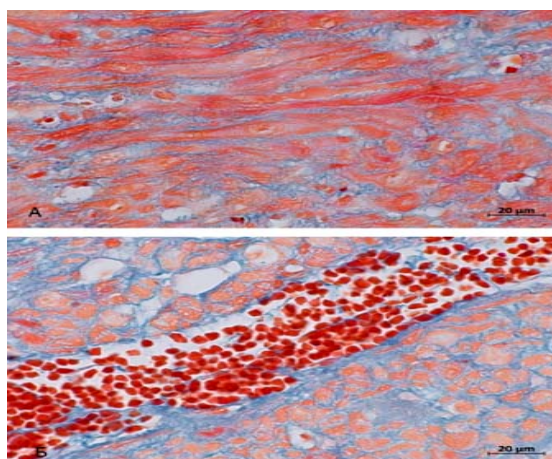


Рис. 2. Миометрий нижнего сегмента матки. Контрольная группа. А – преобладание сократительных элементов в стенке матки по сравнению с развитием соединительной ткани; Б – локализация элемента сосудистого русла стенки матки в миометрии

Морфологические картины с рубцом на матке имеют ряд существенных отличий. Существенно возрастает представительство соединительной ткани в стенке ниже-маточного сегмента. Пучки коллагеновых волокон разъединяют функциональные элементы стенки матки (рис. 4). Выраженность сети ретикулярных волокон снижается, что свидетельствует о редукции их роли в образовании единого каркаса для сократительных элементов миометрия (рис. 5). В массиве соединительной ткани визуализируются элементы сосудистого русла. Становится очевидным факт опасности кровотечения из-за отсутствия морфологических условий для сокращения (рис. 6). В группе контроля гладкие миоциты обладают высоким содержанием гладкомышечного актина, об этом свидетельствует интенсивность ИГХ-реакции (рис. 7).

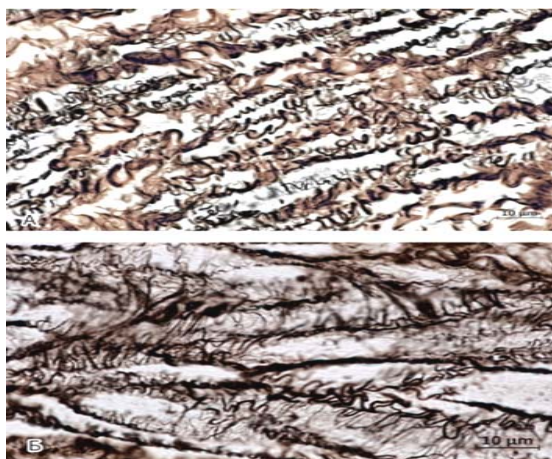


Рис. 3. Миометрий нижнего сегмента матки. Контрольная группа. Определяются ретикулярные волокна, окрашенные в черный цвет, входящие в состав эндомизия гладких миоцитов

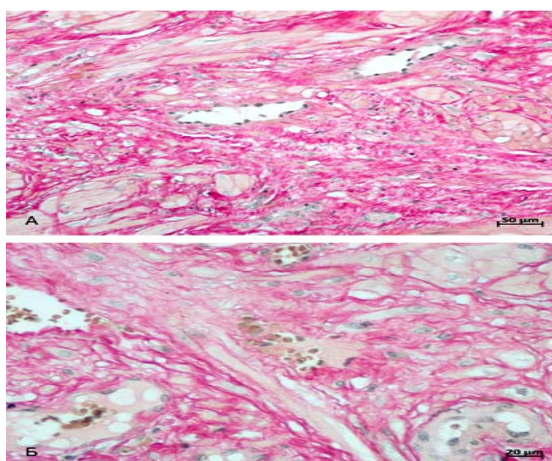


Рис. 4. Миометрий нижнего сегмента матки. Группа с рубцом на матке. А – высокое содержание коллагеновых волокон в строме нижнего сегмента матки; Б – разделение пучков гладких миоцитов высоким содержанием соединительной ткани стромы

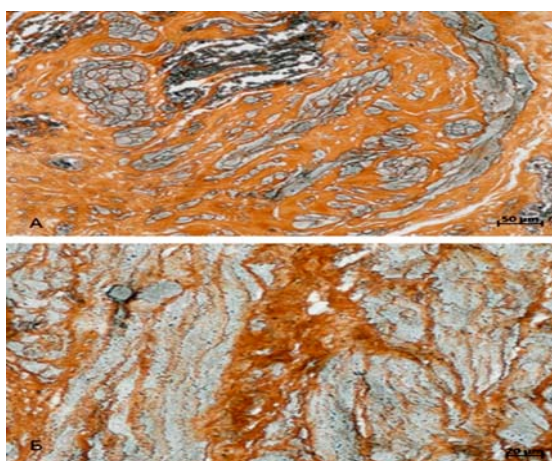


Рис. 5. Миометрий нижнего сегмента матки. Контрольная группа. Определяется редукция ретикулярных волокон в строме стенки матки (А) и эндомизия (Б)

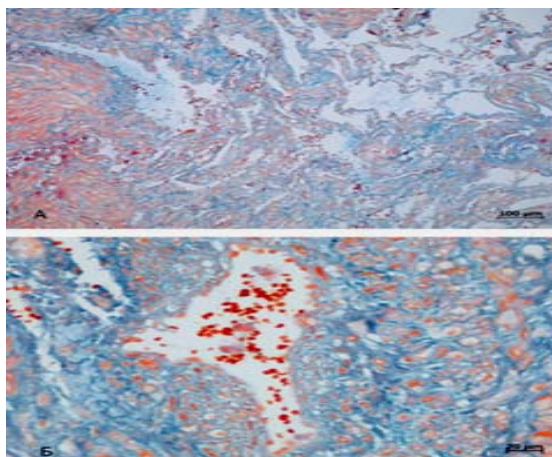


Рис. 6. Миометрий нижнего сегмента матки. Контрольная группа. Определяется снижение представительства сократительных структур в миометрии матки, а также возрастание доли стромального компонента

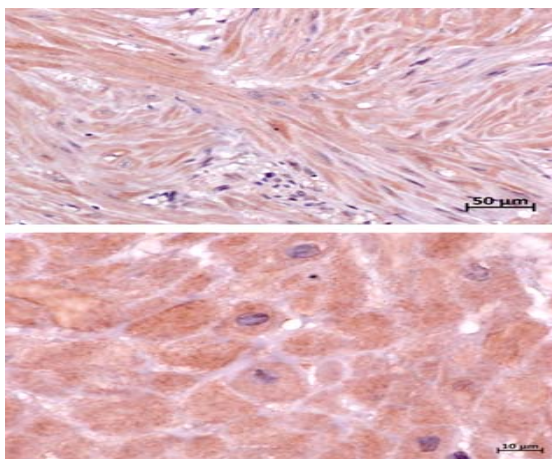


Рис. 7. Миометрий нижнего сегмента матки. Контрольная группа. Методика: иммуногистохимическое окрашивание α -гладкомышечного актина. Определяется высокая экспрессия альфа-гладкомышечного актина в миоцитах стенки матки

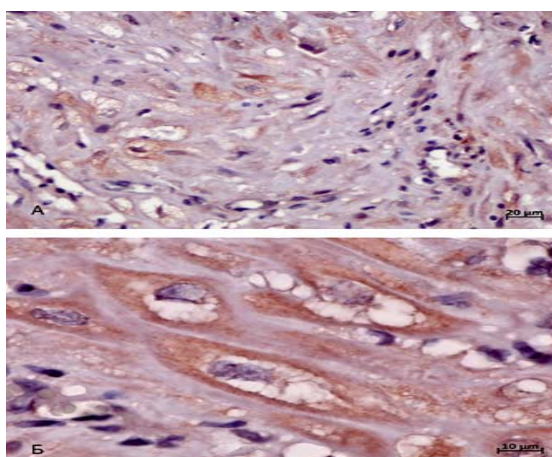


Рис. 8. Миометрий нижнего сегмента матки. Группа с рубцом на матке. Определяется снижение численности гладких миоцитов в стенке матки вместе с их разрозненной локализацией (А), вакуолизация цитоплазмы гладких миоцитов (Б)

В миометрии, измененном рубцовой тканью, изменяется экспрессия сократительных белков, в частности гладкомышечного актина (табл. 1). Это создает поля стенки нижнего сегмента, в которых есть солокализация практически не окрашенных миоцитов вместе с интенсивно и средне окрашенными. Ряд из них обладает гипертрофированным сократительным аппаратом, что, видимо, является компенсирующей реакцией на уменьшение содержания сократительных белков в других миоцитах. Не меньшее значение имеет факт формирования неупорядоченности в расположении миоцитов в рубцово-измененной ткани (рис. 8-А).

Таблица 1

**Экспрессия гладкомышечного актина в сократительных структурах
нижнего сегмента матки (в единицах экстинкции)**

Группа	Оптическая плотность саркоплазмы
Норма	0,78 ± 0,09
Рубец	0,48 ± 0,07*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Это приводит к нарушению формированию пласта, наличие которого необходимо для сохранения функциональной активности миометрия. Очевидно, что даже при наличии определенного количества гладких миоцитов в стенке матки не следует ожидать от них обеспечения полноценного сокращения. Становится ясным в данной ситуации высокий риск маточных кровотечений.

Кроме того, помимо снижения содержания гладкомышечного актина в гладких миоцитах уменьшались их размеры, что хорошо заметно при различных методиках окрашивания.

Биологические эффекты секрета тучных клеток по отношению к состоянию внеклеточного матрикса и гладким миоцитам позволяют рассматривать их как важный диагностический критерий оценки функционального состояния нижнего сегмента матки. Тучные клетки являются постоянным компонентом миометрия, необходимы как для регуляции локального гомеостаза, так и для обеспечения сократительной активности гладких миоцитов. В группе контроля популяция тучных клеток миометрия в области нижнего сегмента немногочисленна (табл. 2).

Таблица 2

Содержание тучных клеток в миометрии нижнего сегмента матки (в п/з)

Группа	Метод идентификации	
	Метахромазия	Триптаза
Норма	2,75±0,25	3,08±0,42
Рубец	4,4±0,41 *	5,38±0,47*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Тучные клетки обладали небольшими размерами, часто наблюдались в структурах эндомизия, прилегая к гладкомышечным элементам, располагались в соединительной ткани, разделяющей пласты миоцитов (рис. 9-А), а также локализовались периваскулярно (рис. 9-Б).

В формировании и эволюции рубца важное значение имеют тучные клетки, интенсивность дегрануляции, которых была более высокой по сравнению с группой контроля (табл. 3).

Однако, в группе с рубцом интенсивность дегрануляции существенно возрастала (табл. 3), свидетельствуя об обуславливающем влиянии биополимеров тучных клеток на внеклеточный матрикс. В рубцово-измененной ткани выявляется возрастание численности тучных клеток и их секреторной активности (рис. 9, 10).

Этот факт следует учитывать как фактор риска для прогрессирования чрезмерного формирования соединительной ткани в миометрии с дальнейшим развитием фиброза в области нижнего сегмента матки.

Возрастание ТК в рубце можно связать во-первых, с образованием соединительной ткани в области нижнего сегмента матки. Очевидно, это послеоперационная индукция. Следует учесть, что способность тучных клеток к ремоделированию внеклеточного матрикса в данной ситуации может являться причиной формирования избыточной рубцовой ткани, компонентов внеклеточного матрикса, а также вызывать снижение функциональной активности миоцитов.

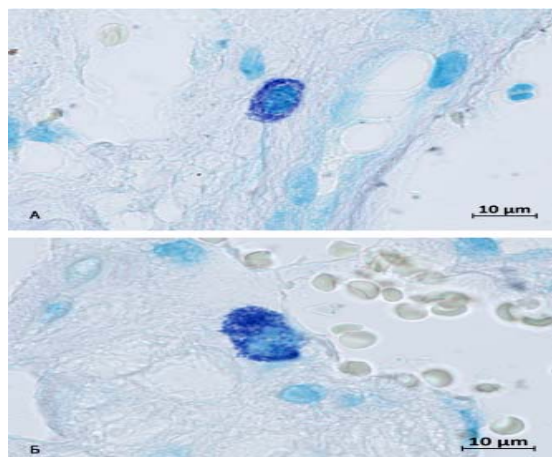


Рис. 9. Тучные клетки нижнего сегмента матки. Группа контроля. Методика: окрашивание толуидиновым синим. А – недегранулированная тучная клетка в контакте с гладким миоцитом; Б – тучная клетка в периваскулярном пространстве

Таблица 3

Морфофункциональные типы тучных клеток в нижнем сегменте матки (после окрашивания толуидиновым синим)

Тип тучной клетки	Норма	Рубец
Недегранулированные	68,3±3,2	34,7±3,6*
Лизис гранул	12,4±0,8	19,8±1,7*
Экзоцитоз	15,1±1,1	36,8±2,3*
Формирование макровезикул	4,2±0,3	8,7±0,4*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

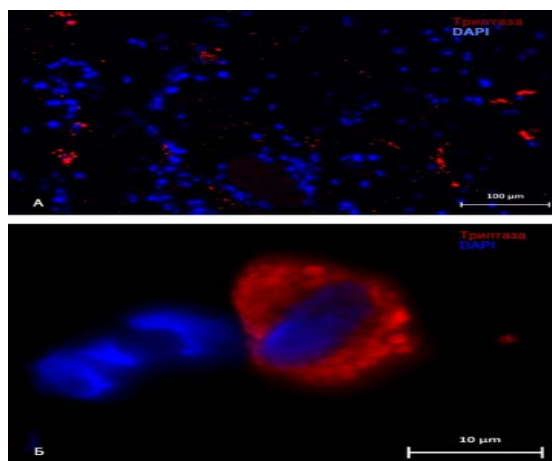


Рис. 10. Тучные клетки нижнего сегмента матки. Группа с рубцом. Методика: ИГХ-окрашивание триптазы тучных клеток, флуоресцентная детекция

Дегрануляционная активность ТК была более интенсивной в области рубца (рис. 9, 10-А), сами ТК чаще всего обнаруживались в прослойках соединительной ткани, секретируя биологически активные вещества, прежде всего, в строму органа. Кроме того, ТК в рубце становились более крупными, с более значительным содержанием триптазы, что свидетельствует об их активном участии в патогенезе формирования рубцовых изменений (рис. 10-Б).

Также обращает на себя сохранение контактирования триптаза-позитивных клеток с гладкими миоцитами миометрия. Очевидно, что это можно связать с индуктивным влиянием триптазы тучных клеток на митотическое деление гладких миоцитов в данной зоне матки при образовании рубцовой ткани, потенциальная возможность которой была показана рядом авторов в соответствующих экспериментах.

Выводы:

1. Коррекция регенерации стенки матки после кесарева сечения должна учитывать возможные последствия в виде разрастания соединительной ткани, апоптоза гладких миоцитов и их атрофические изменения. В этом случае тучные клетки могут представлять собой один из возможных объектов терапевтического воздействия при послеоперационном ведении пациенток для профилактики формирования склеротических процессов в рубце на матке.

2. В миометрии, измененном рубцовой тканью, обнаружены существенные структурные преобразования – миоциты не формируют пласт, что обуславливает снижение способности к сокращению стенки матки. Экспрессия α -гладкомышечного актина снижена в 1,6 раза по сравнению со здоровым миометрием. Содержание триптаза позитивных тучных клеток, а также их размеры увеличиваются. Возрастает более чем в 2,4 раза интенсивность дегранулирующих тучных клеток, что и обуславливает формирование фиброза.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. Москва: Медицина, 1990. 384 с.
2. Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б., Тиманн М. Гистохимия ферментов. Воронеж: Научная книга, 2016. 120 с.
3. Жуковский Я.Г., Кукарская И.И. Управление риском: режим тотального контроля // Баллонная тампонада Жуковского и новая акушерская практика. URL: www.tamponada.ru/ubt13.pdf.
4. Колчина В.В. Факторы, влияющие на неблагоприятное течение беременности у пациенток с низкой плацентацией // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3. С. 550.
5. Краснополский В.И., Логутова Л.С., Буянова С.Н. Несостоятельный рубец на матке после кесарева сечения: причины формирования и лечебная тактика // Акушерство и гинекология. 2013. № 6. С. 28–33.
6. Краснополский В.И., Логутова Л.С., Буянова С.Н. Репродуктивные проблемы оперированной матки. М., 2006.
7. Серов В.Н. Современное акушерство и кесарево сечение // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12, № 13. С. 749–751.
8. Atiakshin D., Buchwalow I., SamoiloVA V., Tiemann M. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells // *Histochem Cell Biol.* 2018. № 12. DOI: 10.1007/s00418-018-1659-8
9. Atiakshin D., SamoiloVA V., Buchwalow I., Boecker W., Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification // *Histochemistry and Cell Biology.* 2017. № 6. P. 683–694.
10. Buchwalow I.B., Boecker W. *Immunohistochemistry: basics and methods.* Springer, 2010.
11. Romeis B. *Mikroskopische technik.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.

References

1. Avtandilov GG. *Medicinskaya morfometriya: rukovodstvo* [Medical morphometry: guide]. Moscow: Medicina; 1990. Russian.
2. Atyakshin DA, Buhvalov IB, Timann M. *Gistohimiya fermentov* [the Histochemistry of enzymes.]. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2016. Russian.
3. Zhukovskij YAG, Kukarskaya II. *Upravlenie riskom: rezhim total'nogo kontrolya. Ballon-naya tamponada Zhukovskogo i novaya akusherskaya praktika* [risk Management: a regime of total control]. Russian. Available from: www.tamponada.ru/ubt13.pdf.
4. Kolchina VV. *Faktory, vliyayushchie na neblagopriyatnoe techenie beremennosti u pacientok s nizkoj placentaciej* [Factors influencing the unfavorable course of pregnancy in patients with low placentation]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2014;3:550. Russian.
5. Krasnopol'skij VI, Logutova LS, Buyanova SN. *Nesostoyatel'nyj rubec na matke posle kesareva secheniya: prichiny formirovaniya i lechebnaya taktika* [Untenable uterine scar after cesarean section: causes and treatment tactics]. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2013;6:28-33. Russian.
6. Krasnopol'skij VI, Logutova LS, Buyanova SN. *Reproduktivnye problemy operirovan-noj matki* [Reproductive problems of the operated uterus]. Moscow; 2006. Russian.
7. Serov VN. *Sovremennoe akusherstvo i kesarevo sechenie* [Modern obstetrics and caesarean section]. *Russkij medicinskij zhurnal.* 2004;12(13):749-51. Russian.
8. Atiakshin D, Buchwalow I, SamoiloVA V, Tiemann M. Tryptase as a polyfunctional component of mast cells. *Histochem Cell Biol.* 2018;12. DOI: 10.1007/s00418-018-1659-8
9. Atiakshin D, SamoiloVA V, Buchwalow I, Boecker W, Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. *Histochemistry and Cell Biology.* 2017;6:683-94.
10. Buchwalow IB, Boecker W. *Immunohistochemistry: basics and methods.* Springer; 2010.
11. Romeis B. *Mikroskopische technik.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2010.

Библиографическая ссылка:

Атякшин Д.А., Енькова Е.В., Вуколова В.А., Рыжиков Ю.С. Клинически значимые морфологические и иммуногистохимические особенности интактного и рубцово-измененного миометрия // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №4. Публикация 1-9. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/1-9.pdf> (дата обращения: 12.07.2018). *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/e2018-4.pdf>