

УДК 618.145.007

© Коллектив авторов, 2012.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА И ЕГО РЕЦИДИВОВ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Н. В. Ермолова, В. А. Линде, Л. В. Колесникова, А. В. Ширинг, К. В. Слесарева

ФГУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии» Минздравсоцразвития России (директор – профессор В. А. Линде), г. Ростов-на-Дону.

PATHOGENETIC MECHANISMS OF FORMATION OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS AND ITS RELAPSES IN PATIENTS OF REPRODUCTIVE AGE

N. V. Ermolova, V. A. Linde, L. V. Kolesnikova, A. V. Shiring, K. V. Slesareva

SUMMARY

The purpose is to reveal peculiarities of angiogenesis from the point of autocrine cellular regulation and to amplify the mechanisms of formation of external genital endometriosis and its relapses in patients of reproductive age.

Methods: 352 patients were divided to 3 clinical groups. The first group consisted of 148 patients with I-II stages of EHE (r-AFS (1985)). The second group was 184 patients with III-IV stage of the illness; 24 ones among them were with relapse. The third group was control and was presented by 20 patients without endometriosis. We used clinical methods (anamnesis and examination), clinicolaboratory methods (echo-, endoscopy (laparoscopy, hysteroscopy, colposcopy), genetic, morphological, (histological, investigation of resulted bioptic samples), growth factors, interleukins, intracellular relation molecules were measured, by ELISA, revelation of vasoactive substances; statistical analysis of these dots.

Results: On the systemic level the disorders of auto-, para- and intracrine cellular regulation of angiogenesis, which was happened as a result of high production of EGF, bFGF, IGF-1, VEGF, soluble receptor of EGF and sFlt and low production of leptin was revealed. On the local level we found severe decrease of apoptosis, which was devoted to IL-8, NO, FSH and the simultaneous enhancement by IL-8 of angiogenesis activity in endometrioid heterotopies and also the capillary vasodilatation with participation of nitrogen oxide. The increase of VEGF production on systemic level is the biochemical peculiarity of relapsing of EGE. On the local level (the peritoneal fluid) the revealed changes were characterized by high content of soluble receptor of VEGF, the great production of NO and NO-synthase activity.

Conclusions: The switch of disorder of regulatory control of the cellular metabolism from one growth factors to another is happened in different stages of external genital endometriosis formation.

ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ЗОВНІШНЬОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ ТА ЙОГО РЕЦИДИВІВ У ПАЦІЄНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ

Н. В. Ермолова, В. А. Линде, Л. В. Колесникова, О. В. Ширинг, К. В. Слесарева

РЕЗЮМЕ

Мета дослідження – виявлення особливостей ангиогенезу з позицій аутопаракринної клітинної регуляції та уточнення механізмів формування зовнішнього генітального ендометріозу і його рецидивів у пацієнток репродуктивного віку.

Методи: 352 пацієнтки було розділено на 3 клінічні групи. Першу групу склали 148 пацієнток з I-II стадією ЗГЕ (r-AFS (1985)). У другу групу увійшли 184 пацієнтки з III-IV стадією захворювання; у 24 з них був рецидив. Третя група – контрольна – була представлена 20 пацієнтками без ендометріозу. Було використано клінічні методи дослідження (анамнез і обстеження), клініко-лабораторні методи (ехо-, ендоскопія (лапароскопія, гістероскопія, кольпоскопія), генетичні, морфологічні (гістологічне дослідження отриманих біоптатів); фактори росту, інтерлейкіни, молекули міжклітинної взаємодії визначалися за ELISA, визначення вазоактивних речовин; статистична обробка даних.

Результати: На системному рівні порушення ауто-, пара- та інтракринної клітинної регуляції ангиогенезу, в результаті підвищення продукції EGF, bFGF, IGF-1, VEGF, розчинних рецепторів EGF і sFlt і зниження продукції лептину були виявлені. На місцевому рівні ми виявили важке зниження апоптозу, обумовлене IL-8, NO, FSH і одночасним посиленням IL-8 активності ангиогенезу в ендометріодних гетеротопіях і також вазодилатацію капілярів за участю оксиду азоту. Підвищення продукції VEGF на системному рівні є біохімічною основою рецидивування ЗГЕ. На місцевому рівні (перитонеальна рідина) виявлені зміни характеризувалися високим вмістом розчинних рецепторів VEGF, високою продукцією NO і NO-синтетазною активністю.

Висновки: Перемикання порушень регуляторного контролю клітинного метаболізму від одного фактора росту до іншого відбуваються на різних стадіях формування зовнішнього генітального ендометріозу.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, ангиогенез, апоптоз, пролиферация, регуляция.

Эндометриоз встречается у 7-50% всех женщин и нередко сопровождается выраженным болевым синдромом, является одной из частых причин бесплодия [2], является прогрессирующим, рецидивирующим процессом.

Это гормонозависимое заболевание, развивающееся на фоне нарушения иммунного гомеостаза, сущность которого заключается в доброкачественном разрастании за пределами полости матки ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию [1]. Несмотря на многочисленные исследования, этиология и патогенез эндометриоза продолжают оставаться предметом споров и научных дискуссий.

Известная на данный момент полиэтиологичность НГЭ (наружного генитального эндометриоза), представленная различными концепциями, не в состоянии объяснить ключевой момент развития заболевания – имплантацию и превращение клетки эндометрия в эндометриоидный очаг [1, 3].

Цель исследования – выявление особенностей ангиогенеза с позиций аутопаракринной клеточной регуляции и уточнение механизмов формирования наружного генитального эндометриоза и его рецидивов у пациенток репродуктивного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общий объем выборки составил 352 пациентки. Все пациентки имели нормальную массу тела. Из исследования были исключены пациентки с миомой матки и аденомиозом.

В ходе проводимого нами исследования все больные были разделены на три клинические группы: I группу составили 148 (119 – ретроспективной и 29 – проспективной групп) пациенток с I-II стадией НГЭ по классификации r-AFS (1985), II группу – 184 (114 – ретроспективной и 46 – проспективной групп) больных с III-IV стадией заболевания (160

пациенток с III-IV стадией и 24 – с рецидивом). III контрольную группу составили 20 пациенток без эндометриоза, проводивших обследование по поводу бесплодия. У 24 (12 больных ретроспективной и 12 – проспективной групп) пациенток с рецидивом НГЭ была обнаружена III-IV стадия НГЭ.

Для реализации поставленных задач использовались следующие методы исследования: клинические (анамнез, осмотр), клинико-лабораторные (УЗИ, эндоскопические (лапароскопия, гистероскопия, кольпоскопия), генетические, гистологическое исследование удаленных во время лапароскопии биоптатов, биохимические – иммуноферментный метод для определения факторов роста, интерлейкинов, молекул межклеточного взаимодействия, гормонов; определение вазоактивных веществ), статистическая обработка данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Верификацию эндометриоза проводили по степени распространения процесса и морфофункциональным характеристикам гетеротопических очагов. Морфологический диагноз основывался на микроскопическом выявлении эктопического эндометриоидного эпителия в сочетании с элементами эндометриоидной стромы.

Выработка ангиогенных факторов роста контролируется, по мнению ряда авторов, преимущественно гормонами. Однако многие исследователи не смогли доказать участие стероидных гормонов в неопластическом ангиогенезе [3, 4]. При этом также установлено, что ни один из факторов роста в отдельности не способен изолированно контролировать патологическую пролиферацию при эндометриозе [3, 6].

Вашему вниманию представляются те из изученных показателей, достоверные изменения которых имели место в процессе проводимого исследования (таблица 1 и 2).

Таблица 1

Показатели регуляторов клеточного метаболизма у пациенток с НГЭ (сыворотка крови)

Показатель	Стадии НГЭ	Контроль	p
НГЭ			
ЭФР (пг/мл)	372,80 [263,80-432,70]	297,10 [148,80-381,10]	0,018857
оФРФ (пг/мл)	35,35 [29,70-40,80]	19,10 [16,90-22,80]	0,000112
ИФР-1 (нг/мл)	184,75 [150,80-210,50]	135,60 [30,50-186,80]	0,027277
СЭФР-А-Р (нг/мл)	6,24 [4,48-10,00]	3,70 [1,96-5,80]	0,003413
Лептин (нг/мл)	11,45 [9,80-13,20]	18,80 [9,80-43,80]	0,045549
Рецидив НГЭ			
ЭФР (пг/мл)	480,00 [386,20-538,60]	297,10 [148,80-381,10]	0,01852
оФРФ (пг/мл)	32,80 [22,90-36,80]	19,10 [16,90-22,80]	0,001005

Продолжение таблицы 1

Показатель	Стадии НГЭ	Контроль	p
ИФР-1 (нг/мл)	204,65 [186,70-245,80]	135,60 [30,50-186,80]	0,020909
СЭФР-А (пг/мл)	853,40 [209,80-1109,80]	176,60 [150,80-262,00]	0,007789
ЭФР-R (фмоль/мл)	0,251 [0,15-0,99]	0,55 [0,52-0,59]	0,020889
ИЛ-6 (пг/мл)	5,68 [3,70-6,00]	7,26 [5,56-74,60]	0,046999

Примечание: результаты представлены как медиана и межквартильный интервал; $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

На системном уровне нами выявлено нарушение ауто-, пара- и интракринной клеточной регуляции ангиогенеза, происходящее в результате высокой продукции ЭФР, оФРФ, ИФР-1, рецептора СЭФР и низкой – лептина. Характер изменения последнего снижает его ингибирующее влияние на действие ИФР-1. Высокий уровень данного фактора роста подавляет активируемый ФСГ синтез эстрадиола, нарушение продукции которого усиливается также в результате снижения исходного субстрата – тестостерона, хотя экспрессия гена ароматазы сохранена. Однако необходимая активация данного фермента с участием лептина (низкое содержание), по-видимому, модифицирована. Следовательно, классический путь синтеза эстрадиола нарушен и наблюдается также снижение другого (альтернативного), менее эффективного пути с участием ауто-, паракринного регулятора ИФР-1.

Установлено, что лептин оказывает влияние на секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) [5]. При снижении его уровня, наряду с нарушением выделения ГнРГ, наблюдается резкое ослабление фолликулогенеза, ранняя атрезия фолликулов, вследствие активации в нем апоптотических процессов [7, 8]. В настоящее время считают, что, возможно, на основании контроля лептином секреции ГнРГ базируется механизм его действия как связующего звена между состоянием метаболизма и репродуктивной системой [5].

В условиях НГЭ ангиогенное действие ИФР-1 усиливается высоким уровнем ЭФР, в отсутствие которого он не может активировать пролиферацию. В сыворотке крови пациенток с НГЭ (таблица 1) столь выраженная степень изменений ангиогенных факторов роста, среди которых отмечен рост показателей комплекса оФРФ, ЭФР и ИФР-1, является, очевидно, следствием патологических процессов в организме женщины, активизирующих и запускающих синтез этих полипептидов [3, 9]. Наиболее высокие концентрации в сыворотке крови пациенток были характерны для ЭФР и оФРФ, что позволяет предложить соотношение (10 и более) этих показателей в качестве независимого маркера в диагностике НГЭ.

Несомненный интерес представляют высокие

показатели растворимого рецептора СЭФР-А-R при НГЭ, способного связывать и нейтрализовывать СЭФР [10], что наблюдается при НГЭ, обуславливает в определенной мере подавление неоангиогенеза, и, как следствие, гетеротопий [7]. Растворимый рецептор СЭФР-А относят к антиангиогенным соединениям белковой природы [3, 9], в связи с чем высокое содержание данного рецептора при НГЭ на системном уровне можно, в какой-то степени, отнести и к компенсаторным реакциям, развивающимся в организме женщины.

Высокий уровень ИЛ-8 в перитонеальной жидкости усиливает адгезию эндометриоидных клеток и имплантацию их на крестцово-маточных связках, брюшине прямокишечно-маточного углубления и задних листках широких связок матки. Указанные процессы происходят на фоне активного неоангиогенеза, который интенсифицируется также ИЛ-8, являющимся главным эндогенным аутокринным фактором роста эндометриоидных гетеротопий. Для данного цитокина характерна ещё и антиапоптотическая функция, как и для молекулы NO, высокий уровень которой обнаружен в ПЖ. Наряду с ингибиторным действием ИЛ-8 и NO в отношении апоптоза в эндометриоидных гетеротопиях, при НГЭ существенная роль как ингибитора апоптоза принадлежит повышенной продукции ФСГ. Снижение в ПЖ уровня тестостерона, предшественника эстрадиола, свидетельствует об отсутствии прямого влияния эстрогенов на клеточные элементы эндометриоидных гетеротопий, а опосредовано оно активацией цитокинами, в частности, ИЛ-8. Данное утверждение логично, так как в этих гетеротопиях значительно снижено, по данным Л.В. Адамян (2005) и И.С. Сидоровой (2007), содержание эстроген-, прогестерон- и андрогенсвязывающих рецепторов.

Увеличение в ПЖ (таблица 2) растворимого СЭФР-А-R, который способен связывать и нейтрализовывать СЭФР, подавляя рост новых сосудов, и, как следствие, гетеротопий [7], можно отнести к благоприятным факторам.

Необходимая для развития эндометриоза пролиферация сосудов внутри и вокруг очагов дости-

гается наличием гипоксии. Механизм возникновения её обусловлен высоким уровнем оксида азота (NO), приводящим к образованию пероксинитрита (ONOO-), снижающего кислородный баланс. Оксид азота является важным регуляторным фактором неоангиогенеза, стимулирующим экспрессию ангиогенных цитокинов в данном случае ИЛ-8, ускоряя рост сосудов – с одной стороны. С другой – высокое содержание оксида азота (NO), являющегося также мощным антиапоптотическим соединением эндотелиальных клеток [3, 8], поддерживает формирование сосудов.

Таким образом, при НГЭ на местном уровне наблюдается резкое снижение апоптоза, обусловленное ИЛ-8, NO, ФСГ и одновременным усилением интерлейкином-8 активности ангиогенеза в эндометриоидных гетеротопиях, а также вазодилатация капилляров с участием оксида азота (NO).

Установленное нами при НГЭ резкое снижение апоптоза в гетеротопиях, обусловленное высокой продукцией антиапоптотических молекул: ИЛ-8, NO и ФСГ, и усиление ангиогенеза согласуется с гистологическими результатами. Развитие морфологических изменений при НГЭ происходит за счет сниженного апоптоза и возрастания массы соединительнотканного компонента – фибробластов и внеклеточного матрикса, а также за счет сохранения функциональной активности эпителиальных и стромальных компонентов даже в регрессирующих очагах, трансформированных в кисты.

Выявленное сочетанное воздействие модификации факторов роста при НГЭ, заключающееся в нарушении ауто-, интра- и паракринной клеточной регуляции ангиогенеза, степень и характер которой зависит от стадии заболевания, что подтверждается результатами нашего исследования.

Таблица 2

Показатели регуляторов клеточного метаболизма у пациенток с НГЭ (перитонеальная жидкость)

Показатель	Стадии НГЭ	Контроль	p
	НГЭ		
ФСГ (мМЕ/мл)	4,4 [3,1-5,6]	3,0 [1,8-4,4]	0,019615
Тестостерон (нмоль/л)	2,65 [1,69-3,95]	4,80 [2,50-7,22]	0,030166
ИЛ-8 (пг/мл)	16,8 [11,8-55,7]	8,3 [4,5-18,8]	0,04064
СЭФР-А-Р (нг/мл)	9,22 [0,51-12,80]	1,15 [0,42-4,54]	0,000406
sFASL (нг/мл)	0,196 [0,128-0,320]	0,162 [0,087-0,214]	0,041136
NOx (мкмоль/л)	38,8 [28,6-49,6]	24,0 [18,0-27,5]	0,059264
	Рецидив НГЭ		
NOx (мкмоль/л)	42,4 [28,5-44,5]	24,0 [18,0-27,5]	0,011992
NOS (мкмоль/л)	49,6 [33,0-60,4]	28,6 [26,4-36,7]	0,030850
СЭФР-А-Р (нг/мл)	9,34 [1,33-11,40]	1,15 [0,42-4,54]	0,017065
Активин (пг/мл)	1,59 [1,12-2,73]	0,89 [0,55-1,69]	0,017031
ЛГ (мМЕ/мл)	1,45 [0,14-1,90]	1,78 [1,48-3,00]	0,034916

Примечание: результаты представлены как медиана и межквартильный интервал; $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

К биохимическим особенностям рецидивирования НГЭ следует отнести не наблюдаемое ни в одной из описанных стадий заболевания увеличение на системном уровне продукции СЭФР. Последнее свидетельствует об усилении дисбаланса ангиогенных и антиангиогенных факторов, приводящих к возобновлению заболевания.

У всех пациенток, находящихся под наблюдением, выявлен одновременный рост продукции трех ангиогенных факторов: ЭФР, оФРФ, ИФР-1, в то время как для рецептора ЭФР-Р было характерно снижение его содержания. Поскольку ЭФР является стимулятором экспрессии гена СЭФР-А, его высокий уровень, несомненно, усиливает

интенсивность продукции СЭФР-А [9], который усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток, приводя к чрезмерному росту сосудов. На фоне высокой экспрессии ангиогенных факторов роста обнаружено снижение ИЛ-6, который рассматривается как про- и противовоспалительный цитокин, а также активатор гипоталамо-гипофизарной системы.

На местном уровне (ПЖ) выявленные изменения характеризовались высоким содержанием растворимого рецептора СЭФР-А-R (в 8 раз выше контроля), значительной продукцией NO и активностью NO-синтазы.

Другим наиболее значимым фактом, обнаруженным нами в перитонеальной жидкости, является повышение уровня активина, одной из функций которого при высоких концентрациях является индукция гибели клеток по механизму апоптоза.

ВЫВОДЫ

1. Отклонения в физиологических соотношениях изученных биоактивных компонентов, а также гипофизарных и половых стероидов при НГЭ подтверждают факт нарушений в продукции регуляторов клеточного роста и дифференцировки, как на системном, так и локальном уровнях.

2. При различных стадиях НГЭ установлены особенности модификации продукции факторов роста, относящиеся к специфическим реакциям, позволяющим использовать выявленные значимые изменения биоактивных соединений в диагностике соответствующей стадии НГЭ неинвазивным методом.

3. На основании результатов исследования факторов роста и эндотелиальных компонентов можно заключить, что при различных стадиях формирования НГЭ происходит переключение нарушения регуляторного контроля клеточного метаболизма с одних факторов роста на другие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамян Л. В. Эндометриозы / Адамян Л. В., Кулаков В. И., Андреева Е. Н. – М.: Медицина, 2006. – 416 с.
2. Баскаков В. П. Эндометриозная болезнь / В. П. Баскаков, Ю. В. Цвелев, Е. Ф. Кира – СПб. : НЛ, 2002. – 452 с.
3. Бурлев В. А. Хирургическое лечение больных с перитонеальной формой эндометриоза и бесплодием / В. А. Бурлев, Е. Д. Дубинская, А. А. Торгоян // Проблемы репродукции. – 2008. – Спецвыпуск. – С. 85.
4. Dikon D. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. / D. Dikon, Hang He, J. K. Hasman // *Environ Health Perspect.* – 2000, Oct. – № 108, Suppl. 5. – P. 795–802.
5. Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis / H. Ota, S. Igarashi, J. Hatazawa [et al.] – *Fertil. Steril.* – 1999. – № 72. – P. 129–134.
6. Kerbel R. Clinical translation of angiogenesis inhibitors / R. Kerbel, J. Folkman // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – № 2. – P. 727–739.
7. Moen M. H. A longterm follow-up study of women with asymptomatic endometriosis diagnosed incidentally at sterilization. / M. H. Moen, T. Stokstad // *Fertil. and Steril.* – Vol. 78, № 4. – P. 773–776.
8. Paleolog E. M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis / E. M. Paleolog // *Arthr. Res.* – 2002. – № 4 (Suppl 3) – P. 81–90.
9. Soluble intercellular adhesion molecule 1 in the peritoneal fluid of patient with endometriosis correlates with the extension of peritoneal implants / S. Calhaz-Jorge, A. P. Costa, M. S. Santos [et al.]. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2003, Feb. – Vol. 106, Issue 2. – P. 170–175.
10. Vignali M. Endometriosis novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives. / M. Vignali, M. Infatino, R. Matrone [et al.] // *Fertil Steril.* – 2002, Oct. – Vol. 78, Issue 4. – P. 665–679.