

# Роль пролиферации и апоптоза при аденомиозе, сопровождающемся синдромом хронической тазовой боли

М. Р. Оразов<sup>1</sup>, А. О. Духин<sup>1</sup>, Е. Н. Носенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов, г. Москва

<sup>2</sup> Одесский национальный медицинский университет Минздрава Украины

**Цель исследования:** оценить состояние механизмов пролиферации и апоптоза в экто- и эутопическом эндометрии в теле матки при аденомиозе, сопровождающемся хронической тазовой болью (ХТБ).

**Дизайн:** проспективный морфологический анализ.

**Материалы и методы.** Проведено морфологическое исследование макропрепаратов тела матки, полученных после гистерэктомии у 60 пациенток с диффузным аденомиозом II–III степени, сопровождавшимся выраженной ХТБ. Для изучения кинетики клеток оценивали их пролиферацию и апоптоз с помощью моноклональных антител к Ki-67 и p53 соответственно. Чувствительность к эстрогенам определяли с использованием моноклональных антител к эстрогеновым рецепторам.

**Результаты.** Выявлено, что покровный эпителий характеризуется присутствием большого количества пролиферирующих клеток ( $12,8 \pm 2,7\%$ ; 95%-й ДИ: 6,5–20,7%) и признаками незрелости, к числу которых относились высокое ядерно-цитоплазматическое отношение и отсутствие развитого апикального полюса. Железы составляли  $28,4 \pm 3,2\%$  (95%-й ДИ: 23,4–33,2%) объема эндометрия, имели местами извитой ход с формированием локальных расширений, преимущественно в глубине эндометрия. В структуре маточных желез максимальное количество митозов отмечали в областях шейки и дна, где Ki-67-иммунопозитивных клеток было соответственно  $17,3 \pm 2,8\%$  и  $23,5 \pm 3,6\%$ . В области тела маточных желез доля пролиферирующих клеток не превышала 6%. В строме эутопического эндометрия также наблюдали пролиферацию клеток, однако численность пролиферирующих клеток оказалась ниже, чем в эпителиальных структурах эндометрия ( $8,8 \pm 4,2\%$ ; 95%-й ДИ: 5,3–11,8%).

**Заключение.** При ХТБ, обусловленной аденомиозом, регистрируется нарушение эпителиально-мезенхимальных отношений, отражающее дефектный морфогенез маточных желез. Это сопровождается усилением пролиферации эпителиальных клеток на фоне высокой чувствительности эпителиальных и стромальных клеток к эстрогенам.

**Ключевые слова:** аденомиоз, хроническая тазовая боль, эутопический эндометрий, эктопический эндометрий, морфология, Ki-67, p53, рецепторы к эстрогенам.

## Proliferation and Apoptosis' Role in Adenomyosis Accompanied by Chronic Pelvic Pain

M. R. Orazov<sup>1</sup>, A. O. Dukhin<sup>1</sup>, E. N. Nosenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

<sup>2</sup> Odessa National Medical University, Ministry of Health of Ukraine

**Study Objective:** To assess proliferation and apoptosis in the ectopic and eutopic endometrium in the uterine body in women with adenomyosis accompanied by chronic pelvic pain (CPP).

**Study Design:** This was a prospective morphological analysis.

**Materials and Methods:** The study included a morphological examination of gross specimens of uterine bodies obtained during hysterectomies in 60 patients with grade II–III diffuse adenomyosis accompanied by severe CPP. Cell proliferation and apoptosis, using Ki-67 and p53 monoclonal antibodies, respectively, were investigated to evaluate cell kinetics. The sensitivity to estrogens was assessed using monoclonal antibodies to estrogen receptors.

**Study Results:** The study showed many proliferating cells ( $12.8 \pm 2.7\%$ ; 95% CI: 6.5-20.7%) in the surface epithelium and their immaturity. The latter was reflected by a high nuclear/cytoplasmic ratio and the absence of a well-developed apical pole. Glands took  $28.4 \pm 3.2\%$  (95% CI: 23.4-33.2%) of the endometrial volume. Some of them appeared as tortuous structures that were focally dilated, particularly in the deep layers of the endometrium. The highest number of mitoses was seen in the necks and fundi of the uterine glands, where the number of Ki-67 immune positive cells was  $17.3 \pm 2.8\%$  and  $23.5 \pm 3.6\%$ , respectively. In the bodies of the uterine glands, the proportion of proliferating cells did not exceed 6%. Proliferating cells were also present in the stroma of the eutopic endometrium; however, the number of multiplying cells here was lower than in the endometrial epithelial structures ( $8.8 \pm 4.2\%$ ; 95% CI: 5.3-11.8%).

**Conclusion:** Chronic pelvic pain caused by adenomyosis is accompanied by disturbed epithelial-mesenchymal interactions, which reflects impaired morphogenesis in the uterine glands. This is accompanied by enhanced proliferation of epithelial cells and increased sensitivity of epithelial and stromal cells to estrogens.

**Keywords:** adenomyosis, chronic pelvic pain, eutopic endometrium, ectopic endometrium, morphology, Ki-67, p53, estrogen receptors.

**Х**роническая тазовая боль (ХТБ) является общей потенциально подрывающей здоровье проблемой женщин как репродуктивного, так и перименопаузального возраста [2]. Неуклонное увеличение ее распространенности, а также

низкая эффективность лечения привели к тому, что в последние годы научный интерес к ХТБ значительно возрос.

Считают, что ХТБ в 73,1% случаев — симптом гинекологических заболеваний, в 23,9% — экстрагенитальных,

**Духин Армен Олегович** — д. м. н., профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института ФGAOU ВО РУДН. 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 21, корп. 3. E-mail: redaktor@rusmg.ru

**Носенко Елена Николаевна** — профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ОНМедУ Минздрава Украины, д. м. н., профессор. 65082, г. Одесса, Валиховский пер., д. 2. E-mail: redaktor@rusmg.ru

**Оразов Мекан Рахимбердыевич** — к. м. н., доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института ФGAOU ВО РУДН. 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 21, корп. 3. E-mail: otekan@mail.ru

в 1,5% — психических нарушений и в 1,5% случаев имеет самостоятельное нозологическое значение. В последнее время, особенно во франко- и испаноязычных медицинских кругах, значительно изменился подход к патогенезу, диагностике и лечению заболеваний органов малого таза, сопровождающихся ХТБ [3]. Аденомиоз является одной из существенных, а по данным некоторых авторов, определяющей причиной развития ХТБ, равно как и дисменореи и гиперменореи [1, 4, 11].

В последние годы аденомиоз рассматривают как самостоятельную нозологическую единицу, отличающуюся автономным и инвазивным ростом, изменением молекулярно-биологических свойств клеток как эктопического, так и эндометриального эндометрия [1]. В связи с этим перспективным направлением в изучении этиологии и патогенеза ХТБ при аденомиозе признано исследование молекулярно-биологических особенностей эндометриального и эктопического эндометрия — экспрессии рецепторов эстрогенов (ER), маркеров пролиферации, апоптоза, адгезии, ангиогенеза, клеточной инвазии.

Равновесие в жизнедеятельности клеток связано с двумя динамическими разнонаправленными процессами: митотической активностью и гибелью клеточных популяций. Нарушение нормального контроля гибели клеток вызывает изменение гомеостаза и приводит к различным заболеваниям. Апоптоз (запрограммированная гибель клеток) запускается внутренними и внешними сигналами и требует затраты энергии, транскрипции генов и синтеза белка *de novo*. Апоптоз играет одну из главных ролей в патофизиологии аденомиоза. В то же время уровень клеточной пролиферации отражает тканевую активность. Проллиферирующие клетки могут быть идентифицированы путем изучения ядерной экспрессии Ki-67 — протеина, который вырабатывается в течение всех фаз менструального цикла. Во многих исследованиях установлена корреляция между экспрессией Ki-67 и количеством митотических клеток [7]. Снижение восприимчивости эндометриальных эпителиальных и стромальных клеток к апоптозу ассоциируется с ХТБ при эндометриозе [11].

Несмотря на большое количество теорий, посвященных причинам развития аденомиоза, механизмы его патогенеза до настоящего времени до конца не изучены. Настоящее исследование выполнено для расширения представлений о роли пролиферации и апоптоза эктопического и эндометриального эндометрия при аденомиозе, сопровождающемся синдромом ХТБ.

**Цель работы:** оценить состояние механизмов пролиферации и апоптоза в экто- и эндометриальном эндометрии в теле матки при аденомиозе, сопровождающемся ХТБ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Морфологические и иммуногистохимические исследования выполняли в отделе патоморфологии ЦНИЛ Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького и в патолого-анатомическом отделении НИИ урологии Минздрава России (заведующий отделением — к. м. н. Г. Д. Ефремов). Процедуру подсчета выполняли дважды два независимых эксперта (двойное слепое исследование), не осведомленные о диагнозе и клинических характеристиках пациенток. Уровень конкордантности морфометрических результатов, полученных от независимых экспертов, составлял более 95%.

Для морфологического исследования использовали фрагменты макропрепаратов стенок 60 маток, полученных при гистерэктомии у пациенток с диффузным аденомиозом II–III степени, сопровождавшимся выраженным болевым

синдромом длительностью более 6 месяцев. Женщины были прооперированы в пролиферативную фазу цикла.

После гистерэктомии участки стенки матки, включавшие эндометрий и миометрий, фиксировали в нейтральном забуференном 10%-м формалине (pH = 7,4) в течение 24 часов. После дегидратации материал заливали в высокоочищенный парафин с полимерными добавками (Richard-Allan Scientific, США) при температуре не выше 60 °C. Срезы толщиной 1–5 мкм получали на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса срезов STS (Carl Zeiss, Германия). По два среза с каждого блока помещали на адгезивное предметное стекло SuperFrost Plus (Menzel, Германия). Общую морфологическую оценку срезов проводили при окраске гематоксилином и эозином. При этом оценивали наличие, количество и глубину расположения маточных желез (эктопического эндометрия) в миометрии. Для оценки характера межклеточных коопераций иммуногистохимически визуализировали различные линии клеток.

Для изучения кинетики клеток оценивали их пролиферацию и апоптоз с помощью моноклональных антител (МАТ) к Ki-67 (клон D0-7) и p53 (клон MM1; DAKO, Дания) соответственно. Чувствительность к эстрогенам определяли с использованием МАТ к ER. Для «демаскировки» антигенов регидрированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (DAKO) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR при 450 Вт 3 раза по 3,5 минуты. После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) наносили первичные антитела. Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (DAKO). Препараты докрасивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую среду Permanent Mounting Medium (DAKO).

С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный морфометрический анализ, который производили с помощью специального программного обеспечения ImageTool (version 3.0) и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended (version 11.0.1). Снимки выполнены на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония).

В исследованиях с использованием МАТ к Ki-67, p53 оценивали удельную плотность иммунопозитивных клеток (количество окрашенных в коричневый цвет клеток на сотню клеток в поле зрения). Оценку количества клеток проводили в 10 разных полях зрения каждого препарата при 200-кратном увеличении (окуляр 10, объектив 40), соответствовавшем 0,785 мм<sup>2</sup>/поле зрения, с участием двух независимых специалистов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка эндометриального эндометрия у пациенток с аденомиозом продемонстрировала соответствие структуры фазе пролиферации менструального цикла. Покровный эпителий характеризовался присутствием большого количества пролиферирующих клеток ( $12,8 \pm 2,7\%$ ; 95%-й ДИ: 6,5–20,7%) и признаками незрелости, к числу которых относились высокое ядерно-цитоплазматическое отношение и отсутствие развитого апикального полюса. Железы составляли  $28,4 \pm 3,2\%$  (95%-й ДИ: 23,4–33,2%) объема эндометрия, имели местами извитой ход с формированием локальных расширений, преимущественно в глубине эндометрия.

В структуре маточных желез максимальное количество митозов отмечали в областях шейки и дна, где Ki-67-иммунопозитивных клеток было соответственно  $17,3 \pm 2,8\%$  и  $23,5 \pm 3,6\%$ . В области тела маточных желез доля пролиферирующих клеток не превышала 6%. При этом высокая скорость пролиферации эпителия эндометрия вела к формированию картины псевдомногоядерности (за счет тесного расположения ядер при отсутствии четко выраженного апикального полюса клеток маточных желез).

Характерно, что в строме эутопического эндометрия также наблюдали пролиферацию клеток, однако численность пролиферирующих клеток была ниже, чем в эпителиальных структурах эндометрия, — она составляла  $8,8 \pm 4,2\%$  (95%-й ДИ: 5,3–11,8%), — хотя строма характеризовалась высокой плотностью расположения клеток. Последнее было связано с наличием лимфоцитарной инфильтрации. При этом количество клеток, экспрессирующих маркер апоптоза p53, было крайне низким и не превышало 2% у всех пациенток с аденомиозом.

Важно также отметить, что формирующийся функциональный слой эндометрия был богат кровеносными сосудами, часть которых была дилатирована и заполнена эритроцитами. Полученные нами данные в целом согласуются с результатами исследований, выявлявших различное по степени повышение пролиферативной активности и снижение интенсивности процессов апоптоза в клетках эутопического эндометрия при разных формах эндометриоза [5, 6, 8, 9].

В некоторых участках стенки матки отмечали инвазию маточных желез вглубь эндометрия. Форма и размер желез при этом варьировали. В отдельных случаях наблюдали инвазию единичных трубчатых неразветвленных желез в миометрий. Однако чаще всего имело место гроздевидное вращение маточных желез вглубь миометрия. Последнее ассоциировалось с нарушением морфогенеза желез и усилением их ветвлений.

Такая картина, по сути, отражает нарушение эпителиально-мезенхимальных взаимодействий, лежащих в основе не только эмбрионального роста, но и физиологического и патологического ремоделирования тканей и органов. С нарушением межтканевых отношений при эндометриозе связывают также развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации, сопровождающейся изменением локального микроокружения и концентрации факторов роста [10]. Неудивительно, что гроздевидные очаги эктопических маточных желез, в отличие от очагов единичной инвазии, были окружены большим объемом стромы.

Интересно, что количество делящихся клеток в кистозно расширенных участках было меньше, чем в железах, сохранявших трубчатую структуру. Даже на участках десквамации клеток в просвет расширенных желез определялись Ki-67-позитивные клетки. Кроме того, обращала на себя внимание относительно низкая экспрессия Ki-67 в миометрии, несмотря на наличие признаков гиперплазии, предопределяющих увеличение размеров матки. Данный маркер визуализирова-

ли лишь в незначительном (до 1%) количестве гладких миоцитов при диффузном распределении иммунопозитивных клеток в миометрии. Несмотря на высокую скорость пролиферации эпителиальных клеток эндометрия, в них оказалась чрезвычайно низкой экспрессия p53, что отражает снижение интенсивности апоптоза.

Данный феномен может быть обусловлен высокой экспрессией ER и действием эстрогенов, для которых характерен выраженный антиапоптогенный эффект. Иммуногистохимическое исследование продемонстрировало максимальную экспрессию ER в эпителиальных клетках как эутопического, так и эктопического эндометрия, которая охватывала 99–100% клеток, что вполне закономерно в фазу пролиферации менструального цикла и согласуется с данными литературы о выраженной зависимости интенсивности тазовой боли вследствие эндометриоза от уровня эстрогенов [12].

Высокой оказалась и чувствительность стромальных клеток эндометрия к эстрогенам. Интересно, что при этом интенсивность и пространственные характеристики экспрессии ER в строме эндометрия не были связаны с пролиферативными процессами. Кроме того, данный вид рецепторов визуализировался как в ядрах фибробластоподобных клеток эндометрия, так и в мигрирующем пуле, за исключением незначительного количества лимфоцитов.

Характерно, что в миометрии выраженность экспрессии ER оказалась существенно ниже по сравнению с эндометрием. Более того, некоторые гладкие миоциты оказались иммунонегативными: до 20% клеток миометрия не экспрессировали ER, что отражает мозаичное выпадение экспрессии рецепторов к половым стероидам в миометрии. При этом многочисленные тонкие пучки гладких миоцитов были дезорганизованы (разнонаправлены) и разделены прослойками стромы с многочисленными кровеносными сосудами во всех слоях эндометрия. Интересно, что в строме между пучками гладких миоцитов была выявлена низкая экспрессия ER, что, вероятно, связано с инфильтрацией стромы лимфоцитами.

Однако отдельные наши предположения не нашли подтверждения, в частности гипотеза о пролиферативной активности индукторов и ингибиторов апоптоза, уровнях экспрессии ER [12]. В определенной мере это, по-видимому, связано с тем, что изучению и сравнению были подвергнуты образцы с различными изменениями эутопического эндометрия, включая гиперпластические и воспалительные, взятые в разные фазы менструального цикла и в постменопаузе у женщин с разными формами и стадиями развития внутреннего и наружного генитального эндометриоза.


## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При хронической тазовой боли, обусловленной аденомиозом, регистрируется нарушение эпителиально-мезенхимальных отношений, отражающее дефектный морфогенез маточных желез. Это сопровождается усилением пролиферации эпителиальных клеток на фоне высокой чувствительности эпителиальных и стромальных клеток к эстрогенам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адамьян Л. В., Зайратьянц О. В., Осипова А. А., Сонова М. М. и др. Роль пролиферации и апоптоза в патогенезе генитального эндометриоза // Спец. выпуск. 3-й Междунар. науч. конгресс «Новые технологии в акушерстве и гинекологии». 2007. С. 123–124.
2. Дамиров М. М., Олейникова О. Н., Майорова О. В. Генитальный эндометриоз: взгляд практикующего врача: монография. М.: БИНОМ, 2013. 152 с.

3. Носенко О. М. Клініко-морфологічна діагностика внутрішнього ендометріозу матки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Київ, 1999. 21 с.
4. Сонова М. М. Клинико-морфологические, молекулярно-биологические и лечебные факторы генитального эндометриоза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 22 с.
5. Сорокина А. В. Патогенез, прогнозирование и постгеномная диагностика аденомиоза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012. 39 с.

6. Эзимова А. С., Плескановская С. А. Критерии диагностики и прогнозирования неоплазии органов репродуктивной системы женщин // *Аллергология и иммунология*. 2011. Т. 12. № 1. С. 83.
7. Cockerham A. Z. Adenomyosis: a challenge in clinical gynecology // *J. Midwifery Womens Health*. 2012. Vol. 57. N 3. P. 212–220.
8. Fusi L., Cloke B., Brosens J. J. The uterine junctional zone // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2015. Vol. 20. N 4. P. 479–491.
9. Garcia L., Isaacson K. Adenomyosis: review of the literature // *J. Minim. Invasive. Gynecol*. 2015. Vol. 18. N 4. P. 428–437.
10. Leyendecker G., Wildt L., Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair // *Arch. Gynecol. Obstet*. 2014. Vol. 280. N 4. P. 529–538.
11. Taran F. A., Wallwiener M., Kabashi D., Rothmund R. et al. Clinical characteristics indicating adenomyosis at the time of hysterectomy: a retrospective study in 291 patients // *Arch. Gynecol. Obstet*. 2012. Vol. 285. N 6. P. 1571–1576.
12. Triolo O., Laganà A. S., Sturlese E. Chronic pelvic pain in endometriosis: an overview // *J. Clin. Med. Res*. 2013. Vol. 5. N 3. P. 153–163. 

Библиографическая ссылка:

Оразов М. Р., Духин А. О., Носенко Е. Н. Роль пролиферации и апоптоза при аденомиозе, сопровождающемся синдромом хронической тазовой боли // *Доктор.Ру*. 2016. № 3 (120). С. 5–8.