

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АРОМАТАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

А.С. Молотков, М.И. Ярмолинская, доктор медицинских наук, **В.О. Полякова**, доктор биологических наук, **В.Ф. Беженарь**, доктор медицинских наук, профессор, **А.А. Цыпурдеева**, кандидат медицинских наук, **В.В. Рулев**, кандидат медицинских наук, **А.О. Дурнова**, кандидат биологических наук, **Д.З. Цицкарава**

*ФГБУ Научно-исследовательский институт акушерства
и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург*

E-mail: arseny.molotkov@gmail.com

Изучена роль ароматазы p-450 в патогенезе наружного генитального эндометриоза. В исследование были включены 45 женщин с эндометриозом, группу сравнения составили 9 здоровых женщин. Обследование включало лапаро- и гистероскопию, при которых у пациенток с эндометриозом выполняли иссечение эндометриоидных гетеротопий брюшины малого таза, а у здоровых женщин осуществляли биопсию эндометрия для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования; при выполнении последнего оценивали уровень экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях и в эндометрии здоровых женщин. Отмечена высокая степень экспрессии ароматазы в очагах эндометриоза, в то время как в эндометрии здоровых пациенток фермент иммуногистохимическим методом практически не определяется.

Ключевые слова: генитальный эндометриоз, ароматаза, иммуногистохимическое исследование

THE ROLE OF AROMATASE EXPRESSION IN THE PATHOGENESIS OF GENITAL ENDOMETRIOSIS

*A.S. Molotkov, M.I. Yarmolinskaya, V.O. Polyakova, V.F. Bezenar, A.A. Tsipurdeeva, V.V. Rulev, A.O. Durnova, D.Z. Tsitskarava
Federal State Budgetary Institution «D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology»
of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia*

The role of aromatase P450 in the pathogenesis of external genital endometriosis (IEG) has been investigated. 45 women with endometriosis have been included in the study, the group of comparison consisted of 9 healthy women. The examination included a laparoscopy and hysteroscopy, in which in endometriosis patients removal of endometrioid heterotopias on pelvic peritoneum was performed, and in healthy women endometrial biopsy for histological and immunohistochemical studies was carried out. In the course of the immunohistochemical study, the expression levels of aromatase in endometrioid heterotopia and in the endometrium of healthy women was evaluated. The high degree of expression of aromatase in endometrial foci was noted, while, in the endometrium of healthy patients the enzyme is not practically determined with the use of immunohistochemical methods.

Key words: genital endometriosis, aromatase, immunohistochemical study

ВВЕДЕНИЕ

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) остается одной из актуальных проблем современной гинекологии, стабильно занимая 3-е место в структуре гинекологической заболеваемости [1]. Наиболее частыми проявлениями НГЭ являются бесплодие, нарушение менструального цикла, тазовые боли, которые могут существенно ухудшать качество жизни пациенток, требовать длительного и дорогостоящего лечения. Несмотря на высокий интерес к данной патологии, до сих пор не выработан единый подход к пониманию этиологии и патогенеза НГЭ, а следовательно, отсутствуют стандарты ведения и лечения больных НГЭ. Неясны причины «агрессивности» эндометриоидной болезни, недостаточной эффективности гормональной терапии и, как следствие,

частых рецидивов заболевания [5]. Из множества существующих теорий, объясняющих развитие заболевания, экспериментальное подтверждение получила только имплантационная теория. Согласно данной концепции, клетки эндометрия, заброшенные через маточные трубы в брюшную полость, не только сохраняют жизнеспособность, но могут пролиферировать и формировать инфильтративные очаги в местах прикрепления. Недостатками данной теории являются отсутствие объяснения повышенной жизнеспособности клеток эндометрия вне полости матки и снижения защитных свойств брюшины. Кроме того, более частое развитие заболевания у близких родственников, результаты генетических исследований у больных эндометриозом указывают на наследственную предрасположенность к развитию заболевания.

Вероятнее всего, унаследованные мутации генов (например, ген ароматазы, гены II фазы детоксикации, гены интерлейкина-4 и его рецептора) реализуются именно в нарушении гормонального и иммунного гомеостаза [4]. Это можно назвать predisposing факторами развития НГЭ, которые реализуются при забросе менструальной крови в брюшную полость. Клетки эндометрия не встречают должного «сопротивления» со стороны иммунной системы и благодаря некоторой своей автономности начинают расти и развиваться в чужеродной для них среде. Исследованиям автономности эндометриоидных гетеротопий, которая роднит их с опухолевыми заболеваниями, в последнее время посвящено множество работ по изучению выработки цитокинов гетеротопиями, угнетению апоптоза в клетках и их самостоятельной гормональной активности [8].

Установленные отличия клеток здорового эндометрия и эндометриоидных гетеротопий могут не только способствовать расширению знаний о патогенезе эндометриоза, но и оказаться значимыми терапевтическими мишенями при лечении заболевания. Интерес представляют работы по изучению активности фермента ароматазы в эндометрии и эндометриоидных гетеротопиях.

Ароматаза – ключевой фермент синтеза эстрогенов, функция которого заключается в конверсии андростендиона и тестостерона соответственно в эстрон и эстрадиол. У человека ароматаза обнаруживается в яичниках, жировой ткани, плаценте, головном мозге, молочных железах, мышцах, коже, костях, печени [2, 3]. В аспекте изучения гормонально-зависимых заболеваний значимый интерес представляет способность некоторых опухолевых тканей синтезировать эстрогены *de novo*. Увеличение экспрессии ароматазы описано для некоторых опухолевых процессов (рак молочной железы, рак эндометрия, эндометриоз) [6].

Таким образом, при усилении экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях создаются условия для локальной гиперэстрогемии и становится возможным усиление пролиферативного потенциала клеток. В таком случае активность ароматазы в очагах эндометриоза не только может объяснить низкую эффективность некоторых гормональных препаратов, но и служить прогностическим критерием развития заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 45 пациенток с НГЭ в возрасте от 22 до 44 лет; средний возраст больных НГЭ составил $31,24 \pm 1,51$ года. Диагноз генитального эндометриоза у всех больных установлен на основании интраоперационного и гистологического исследования.

Средний возраст менархе в группе больных составил $13,05 \pm 0,42$ года (с колебаниями от 11 до 17 лет), средняя длительность менструации – $5,43 \pm 0,40$ дня (различия от 3 до 11 дней), средняя длительность

менструального цикла – $28,02 \pm 0,70$ дня (от 24 до 38 дней).

Характерными при обращении за медицинской помощью были жалобы на хронические тазовые боли (у 42,2% больных) и бесплодие (у 62,2%). У 46,4% пациенток бесплодие носило первичный характер, 53,6% в анамнезе имелись беременности. Длительность бесплодия варьировала от 1 года до 14 лет (в среднем – $5,75 \pm 1,31$ года).

Всем больным были выполнены лапароскопия и гистероскопия. Диагноз НГЭ устанавливали при обнаружении эндометриоидных гетеротопий на брюшине малого таза, матки, маточных трубах, яичниках, при обнаружении кист яичников с характерным «шоколадным» содержимым, и в последующем он был подтвержден результатами гистологического исследования. При лапароскопии проводилось стадирование НГЭ по классификации Американского общества бесплодия (R-AFS). Оценка распространения эндометриоза варьировала в пределах от 2 до 150 баллов. Так, у 46,6% больных выявлены эндометриоидные кисты яичников, размеры которых колебались от 1,5 до 9,0 см (средний размер кисты $3,62 \pm 1,06$ см), у 31,1% больных при операции обнаружен позадишеечный эндометриоидный инфильтрат. Из экстрагенитальной локализации – в 1 случае был диагностирован эндометриоз аппендикулярно-отростка.

На основе балльной оценки распространенности НГЭ у больных определяли диагноз НГЭ I степени – у 15,6% пациенток, II степени – у 15,6%, III степени – у 17,8% и IV степени – у 51,1%.

У 75,6% пациенток эндометриоз был выявлен впервые, у 24,4% установлен рецидив НГЭ.

Спаечная болезнь органов малого таза при лапароскопии обнаружена у 64,4% больных. При определении стадии спаечной болезни количество баллов варьировало от 1 до 64; распределение по стадиям: в I стадии было 17,3% больных, во II – 20,7%, в III – 24,2% и в IV – 37,9% больных.

Группу сравнения составили 9 женщин, у которых при выполнении лапаро- и гистероскопии не было выявлено гинекологической патологии. Обследованные контрольной группы были в возрасте от 26 до 38 лет (в среднем – $30,44 \pm 3,0$ года). У всех женщин наблюдался регулярный менструальный цикл. Возраст наступления менархе колебался от 12 до 16 лет (в среднем – $12,78 \pm 1,07$ года). Длительность менструации варьировала от 4 до 7 дней (средняя длительность – $5,39 \pm 0,60$), а продолжительность менструального цикла – от 26 до 32 дней (средняя продолжительность – $28,78 \pm 1,26$ дня).

Таким образом, возраст больных и характеристики менструального цикла в основной и контрольной группах достоверно не различались ($p > 0,05$).

Все пациентки прошли обследование, включавшее сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр,

УЗИ органов малого таза, клиничко-лабораторное обследование.

Эндоскопическую операцию проводили по стандартизированной методике с помощью эндовидеохирургического оборудования фирмы Karl Storz (Германия). Во время операции осматривали органы брюшной полости и малого таза, при обнаружении эндометриоидных поражений оценивали степень распространенности эндометриоза.

Материалом исследования явились фрагменты эндометриоидных гетеротопий, иссеченных с перитонеальной брюшины женщин, страдающих генитальным эндометриозом. В контрольной группе изучались фрагменты эндометрия здоровых женщин.

Кусочки гетеротопий и эндометрия фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (рН 7,2), обезжизвали с помощью автоматической станции проводки материала Leica TP1020 и заливали в парафин. Для морфологического изучения срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Затем для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Использовали первичные моноклональные антитела к цитохрому Р-450 ароматазы. В качестве вторых антител использовали антитела, конъюгированные с полимером, маркированным пероксидазой (универсальный набор DAKO EnVision™+ System). Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса DAB+, состоящего из хромогена (диаминобензидин) и субстратного буфера.

Для оценки результатов иммуногистохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры

Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Vidiotest Morphology 5.2». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении $\times 400$.

Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Оптическую плотность экспрессии и среднюю яркость выявленных продуктов измеряли в условных единицах. Указанные параметры отражают интенсивность синтеза или накопления исследуемых сигнальных молекул.

Статистический анализ полученных данных проводили с применением стандартных методов математико-статистической обработки с использованием пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 7.0, Microsoft Excel и др.), методов параметрической и непараметрической статистики. Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли *t*-критерий Стьюдента и ранговый U-критерий Манна-Уитни. При сравнении парных (сопряженных) выборок использовали парный Ud-критерий (Вилкоксона). Анализ зависимости между признаками проводили с помощью χ^2 -критерия Спирмена. Для всех критериев и тестов величину критического уровня значимости принимали равной 0,05, т.е. различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительная площадь экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях достоверно отличалась от площади экспрессии в здоровом эндометрии (соответственно 11,94 и 0,35%); (рис. 1, 2). На основании проведенных иммуногистохимических исследований показано, что уровень экспрессии ароматазы в

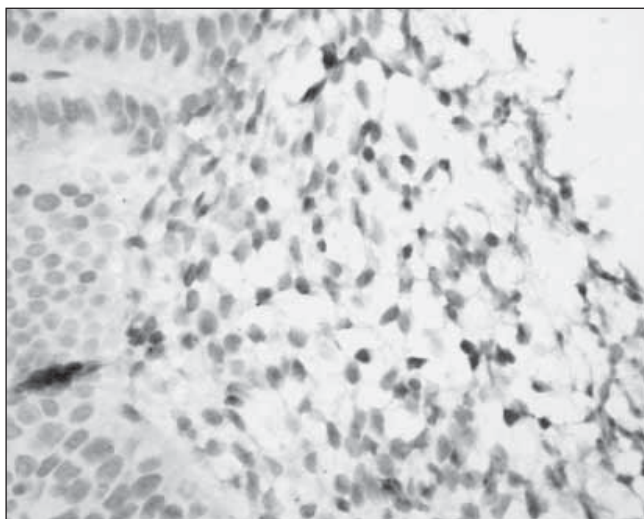


Рис. 1. Экспрессия ароматазы в эндометрии в норме

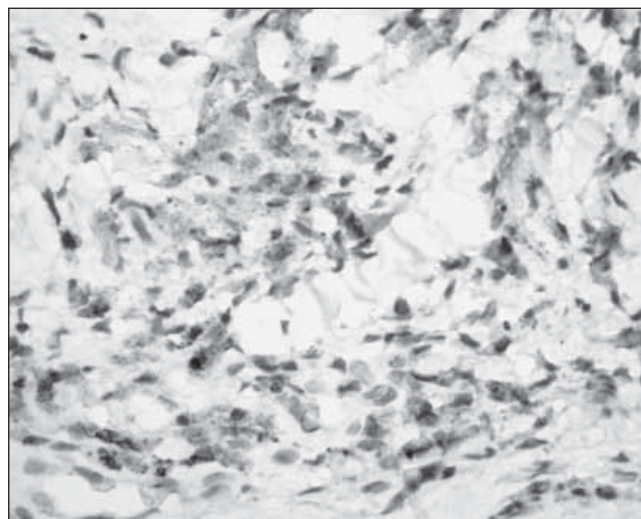


Рис. 2. Экспрессия ароматазы в эндометриоидной гетеротопии

эутопическом эндометрии здоровых женщин практически не определяется. Площадь экспрессии в эндометрии пациенток контрольной группы составила от 0,05 до 1,36% (средняя площадь $0,35 \pm 0,35\%$).

В эндометриоидных гетеротопиях уровень экспрессии ароматазы был повышен во всех образцах, площадь экспрессии определялась в интервале от 3,5 до 29,3% (средняя площадь экспрессии $- 11,9 \pm 2,1\%$).

Средняя яркость экспрессии ароматазы в очагах эндометриоза составила от 91,46 до 191,16 ед. яркости (среднее значение $- 139,96 \pm 8,17$ ед.). При оценке экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях оптическая плотность составила от 0,1266 до 0,4624 отн. ед. (среднее значение $- 0,2778 \pm 0,0274$ отн. ед.).

Средняя яркость экспрессии ароматазы в эндометрии пациенток контрольной группы составила от 103,54 до 167,96 ед. яркости (среднее значение $- 134,10 \pm 16,93$ ед.). При оценке экспрессии ароматазы в эндометрии здоровых женщин оптическая плотность составила от 0,1844 до 0,4236 отн. ед. (среднее значение $- 0,2943 \pm 0,0616$ отн. ед.).

Следует отметить, что площадь экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях различалась в зависимости от дня менструального цикла, в который была выполнена операция.

В I фазу менструального цикла площадь экспрессии составляла от 3,5 до 22,8% (среднее $- 9,3 \pm 5,1\%$), а у больных, прооперированных во II фазу менструального цикла $-$ от 5,9% до 29,3% (среднее $- 17,2 \pm 8,8\%$). Эти различия оказались достоверными ($p < 0,04$). Другие данные (средняя яркость и оптическая плотность) в зависимости от фазы менструального цикла достоверно не различались.

У больных с впервые диагностированным эндометриозом наблюдалась тенденция к более высоким значениям ароматазной активности по сравнению с таковой у пациенток с рецидивом заболевания. В гетеротопиях больных с рецидивом НГЭ отмечена более низкая активность ароматазы, что можно объяснить формированием в очагах соединительной ткани (как исход воспалительного процесса). Именно этот факт может быть причиной резистентности больных к проводимой гормональной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что наиболее значимым параметром при оценке активности ароматазы является площадь экспрессии. Этот показатель достоверно отличается в эндометрии пациенток контрольной группы и в эндометриоидных гетеротопиях. Также показано отличие площади экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях в зависимости от фазы менструального цикла. Полагаем, что именно этот параметр целесообразно определять для оценки активности ароматазы при эндометриозе. Такие показатели, как средняя яркость и оптическая плотность, согласно полученным данным, в эндометрии пациенток контрольной группы и в очагах эндометриоза больных НГЭ достоверно не различаются.

Площадь экспрессии ароматазы в очагах эндометриоза практически в 35 раз больше, чем в эутопическом эндометрии, что, несомненно, создает все условия для синтеза эстрогенов непосредственно в очагах эндометриоза. Перспективно более углубленное изучение причин, связанных с гормональными, иммунологическими и генетическими факторами.

Таким образом, активность ароматазы $-$ фермента, участвующего в синтезе эстрогенов, достоверно повышена в очагах эндометриоза, что позволяет эндометриоидным гетеротопиям синтезировать эстрогены *de novo*. Избыточный локальный синтез эстрогенов не только создает все предпосылки к развитию заболевания (стимуляция пролиферации клеток в очагах эндометриоза, инвазивный рост), но и делает эндометриоидные гетеротопии резистентными к системной гипоестрогемии.

Продукция эстрогенов эндометриоидными гетеротопиями может обуславливать рефрактерность эндометриоза к проводимой медикаментозной терапии и объяснять случаи рецидива заболевания на фоне лечения (например, агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона). Одним из патогенетически обоснованных вариантов терапии может стать применение препаратов, непосредственно влияющих на фермент и угнетающих синтез эстрогенов $-$ ингибиторов ароматазы [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамьян Л.В. и др. Новые патогенетические аспекты распространенного инфилтративного эндометриоза: теория и практика // Пробл. репродукции. $-$ 2010; 4: 31–36.
2. Айламазян Э.К. и др. Гинекология от пубертата до постменопаузы: практическое руководство для врачей. Ред. Э.К. Айламазян. $-$ М., МЕДпресс-информ, 2007. $-$ 512 с.
3. Морчиладзе А.З., Потин В.В., Тарасова М.А. Применение

- непрямых индукторов овуляции при нормогонадотропной ановуляции // Журн. акушерства и женских болезней. $-$ 2010; Т. LIX (3): 22–32.
4. Назаренко Т.А., Дмитриев Д.В. Ингибиторы ароматазы в репродуктивной медицине (обзор литературы) // Пробл. репродукции. $-$ 2007; 1: 14–20.
5. Ярмолинская М.И. и др. Наружный генитальный эндометриоз: пособие для врачей. Ред. Э.К. Айламазян. $-$ СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. $-$ 84 с.

6. Bilotas M. et al. Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis // Fertility and Sterility. $-$ 2010; 93 (8): 2513–8.
7. Bulun S. Endometriosis: Mechanisms of Disease // The New England J. of Medicine. $-$ 2009; 360 (3): 268–79.
8. Bulun S. et al. Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis // Endocrine-Related Cancer. $-$ 1999; 6 (2): 293–301.