

Радзинский В.Е.¹, Оразов М.Р.¹, Носенко Е.Н.²

Экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в тканях матки как один из механизмов аллогенеза при аденомиозе, ассоциированном с хронической тазовой болью

¹ — ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² — «Одесский национальный медицинский университет» МОЗ Украины, 65082, Украина, Одесса, пер. Валиховский, д. 2

Цель исследования: изучение особенностей экспрессии VEGF в тканях матки у пациенток с аденомиозом, ассоциированным с хронической тазовой болью.

Методика. Для морфологического исследования использовали фрагменты стенок 60 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с тазовой болью на фоне диффузного аденомиоза II—III степени, и 30 маток с безболевым формой аденомиоза. В тканях эндометрия и миометрия иммуногистохимическим методом определяли экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF).

Результаты. Показано статистически значимое повышение экспрессии VEGF у пациенток с болевым фенотипом аденомиоза по сравнению с аналогичными показателями у женщин с безболевым формой аденомиоза, соответственно, в эпителиальных клетках эктопического эндометрия ($14,7 \pm 1,6$ против $10,7 \pm 1,6\%$, $p < 0,01$), в гладких миоцитах миометрия ($12,6 \pm 1,4$ против $9,6 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$), в клетках стромы миометрия ($10,1 \pm 1,9$ против $7,4 \pm 1,8\%$, $p < 0,01$).

Выводы: повышение экспрессии VEGF в тканях матки при аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, по сравнению с безболевым фенотипом заболевания является одним из важнейших патогенетических механизмов аллогенеза при аденомиозе и формировании болевого фенотипа заболевания.

Ключевые слова: аденомиоз; тазовая боль; аллогенез; матка; неоваскуляризация; сосудисто-эндотелиальный фактор роста

Для цитирования: Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Носенко Е.Н. Повышенная экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в тканях матки как один из механизмов аллогенеза при аденомиозе, ассоциированном с хронической тазовой болью. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 32—35.

Благодарность. Авторы выражают огромную благодарность в проведении морфологических и иммуногистохимических исследований д. мед. н., профессору кафедры гистологии и эмбриологии Донецкого медицинского университета, профессору Сулаевой Оксане Николаевне и зав. патологоанатомического отделения ФГБУНИИ урологии МЗ РФ Ефремову Геннадию Дмитриевичу.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Radzinskiy V.E.¹, Orazov M.R.¹, Nosenko O.M.²

Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenesis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain

¹ — Russian University of Peoples' Friendship, 117198, Moscow, str. Miklukho-Maklaya, 6

² — Odessa National Medical University, Ukraine, 65082, Ukraine, Odessa, lane Valihovsky, 2

Objective: to study the expression of VEGF in the uterus tissue in patients with adenomyosis associated with chronic pelvic pain.

Methods. For morphological studies it were using fragments of walls 60 uterus, received after hysterectomy in patients with pelvic pain on a background of diffuse adenomyosis II—III degree, and 30 uterus of women with painless form of adenomyosis. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was measured in endometrial and myometrial tissues using immunohistochemistry.

The results showed a significantly higher expression of VEGF in patients with adenomyosis pain phenotype compared to the same in women with silent form in the epithelial cells of ectopic endometrium ($14,7 \pm 1,6$ vs. $10,7 \pm 1,6\%$, $p < 0,01$) in the smooth muscle cells of the myometrium ($12,6 \pm 1,4$ vs. $9,6 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$), in the stromal cells of the myometrium ($10,1 \pm 1,9$ vs. $7,4 \pm 1,8\%$, $p < 0,01$).

Для корреспонденции: Радзинский Виктор Евсеевич, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации - акушерство и гинекология, e-mail: omekan@mail.ru

Keywords: adenomyosis; pelvic pain; algogenezis; uterus; neovascularization; vascular endothelial growth factor

For citation: Radzinsky V.E., Orazov M.R., Nosenko O.M. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenezis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(1): 32–35. (in Russian)

Conclusions: The increased expression of VEGF in the uterus with adenomyosis tissues, associated with chronic pelvic pain, compared to the pain-free phenotype of the disease is one of the most important pathogenetic mechanism of algogenezis in adenomyosis and the formation of a painful disease phenotype.

Conflict of interest: The authors declare that there is no potential conflict of interest.

For correspondence: Radzinsky V.E., e-mail: omekan@mail.ru

Аденомиоз является частой причиной тазовой боли, аномальных маточных кровотечений и преждевременного прерывания беременности у женщин репродуктивного возраста [1–3]. При аденомиозе значительно возрастает активность процесса неоваскуляризации и нейрогенеза в эндометрии и миометрии [4]. Уже в начале развития патологического процесса регистрируется повышенная плотность кровеносных сосудов, расширение их просвета и увеличение количества «незрелых сосудов». Еще более выражены эти процессы в регионах эндометриодных гетеротопий при прогрессировании аденомиоза [6, 7]. Эндометриоз, в частности аденомиоз относят к группе ангиогенных заболеваний, включающих солидные опухоли, ревматоидный артрит, псориаз и диабетическую ретинопатию [8].

Основным пусковым фактором ангиогенеза и васкулогенеза в физиологических условиях и патологии является васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF). Кроме того, VEGF как сильный фактор сосудистой проницаемости и мобилизации лейкоцитов участвует в развитии воспалительного процесса [9–13].

В последнее время появились работы, в которых указывается на особую роль неоваскуляризации в патогенезе аденомиоза, сопровождающегося тазовой болью. Подтвержденная тесная связь нервных волокон с кровеносными сосудами, предполагает, что неоваскуляризация играет важную роль в развитии хронической тазовой боли [7, 14].

Цель исследования — изучение особенностей экспрессии VEGF в тканях матки у пациенток с аденомиозом, ассоциированным с хронической тазовой болью.

Методика

Исследовали фрагменты стенок 60 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с диффузным аденомиозом II—III степени, сопровождающимся выраженным болевым синдромом. Пациентки были прооперированы в пролиферативную фазу цикла. Контрольную группу составили матки 30 пациенток с безболевым аденомиозом.

После гистерэктомии участки стенки матки, включающие эндометрий и миометрий, обрабатывали согласно общепринятым в гистологии процедурам приготовления парафиновых срезов. Срезы окрашивались гематокси-

лином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования осуществляли авидин-биотин-пероксидазным методом по стандартной методике. Для визуализации исследуемого объекта использовали моноклональные антитела (МАТ) к человеческому VEGF (Clone VG1, code No. M7273, «DakoCytomation», Дания), оценивали удельное количество положительно реагирующих клеток. Положительным контролем с известной иммунореактивностью соответствующих эпитопов при окраске тканей для VEGF была использована ткань ангиосаркомы. Пропуск первичного антитела служил в качестве негативного контроля. Неспецифического окрашивания обнаружено не было.

При оценке экспрессии VEGF подсчитывали положительно окрашенные клетки и рассчитывали процент положительно реагирующих клеток по отношению ко всем клеткам стромы или желез в изученных полях зрения. Расчет осуществлялся не менее, чем на 1000 клеточных элементов стромы или желез. Оценку количества клеток проводили в 10 разных полях зрения каждого препарата при увеличении $\times 200$, соответствующем $0.785 \text{ mm}^2/\text{поле зрения}$, с участием двух независимых специалистов.

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

Статистическую обработку материала выполняли при помощи программы «Statistica for Windows, 7.0».

Результаты и обсуждение

Ранее при гистологическом исследовании операционного материала пациенток, как с болевой, так и с безболевой формами аденомиоза, обнаружено повышенное количество сосудов и нервных структур в миометрии [7].

Интерес представлял анализ источников продукции ключевого стимулятора ангио- и нейрогенеза — VEGF. Как показали результаты ИГХ исследования, основным источником VEGF при аденомиозе являются эпителиальные структуры аутопического и

эктопического эндометрия, хотя статистически значимая реакция на данный фактор роста определялась и в структурах миометрия.

Наиболее значимым продуцентом VEGF в эутопическом эндометрии был покровный и железистый эпителий. В строме эутопического эндометрия экспрессия данного фактора роста была ниже — лишь в 2% клеток определялась позитивная реакция на VEGF. Более обширной, в сравнении с эндометрием, оказалась экспрессия VEGF в миометрии пациенток с аденомиозом. Здесь большинство клеток обнаруживало слабую или умеренную реакцию на VEGF. Интересно, что в миометрии экспрессия VEGF была обнаружена как в цитоплазме гладких миоцитов, так и в структурах стенки сосудов, где продуцентами данного фактора роста чаще всего являлись гладкие миоциты и клетки адвентиции. Характерно, что в периваскулярном компартменте, количество клеток, имеющих интенсивную иммунопозитивную реакцию, при болевой форме аденомиоза было более выраженным ($16,1 \pm 1,2$ против $10,9 \pm 1,9\%$ соответственно). Выраженная положительная реакция на VEGF определялась также в отдельных клетках стромы между пучками гладких миоцитов. Умеренная экспрессия VEGF определялась также в эндотелии сосудов миометрия в участках его ремоделирования. Высокой оказалась цитоплазматическая экспрессия VEGF и в железистом эпителии очагов аденомиоза. Теоретически это может быть связано с наличием вокруг участков инвазии ectopического эндометрия миофибробластов, являющихся продуцентом широкого спектра факторов роста, включая VEGF. Однако, как оказалось, наиболее выраженная экспрессия данного стимулятора ангиогенеза в строме миометрия была ассоциирована преимущественно с участками ремоделирования миометрия, периваскулярными регионами и с зонами инфильтрации.

Характерно, что экспрессия VEGF у пациенток с болевой формой аденомиоза статистически значимо превышала аналогичные показатели при безболевой форме: в эпителиальных клетках ectopического эндометрия ($14,7 \pm 1,6$ против $10,7 \pm 1,6\%$), в гладких миоцитах миометрия ($12,6 \pm 1,4$ против $9,6 \pm 1,2\%$), в клетках стромы миометрия ($10,1 \pm 1,9$ против $7,4 \pm 1,8\%$). В группе контроля, в некоторых случаях (3,5%) экспрессия VEGF была ассоциирована только с железистым эпителием эндометриальных гетеротопий, а в клетках стромы миометрия экспрессия VEGF полностью отсутствовала. Данные о распространенном характере экспрессии VEGF при аденомиозе, подтверждают и другие исследователи [29]. Однако полученные этими авторами данные не рассматривались с позиций аденомиоза с болевой формой.

VEGF также является митогеном для астроглии и шванновских клеток *in vitro* [16—18]. Исследования показали, что экзогенный VEGF-A модулирует симпатическую иннервацию сосудов, увеличивает число отростков симпатических ганглиев [19] и способствует росту симпатических аксонов у хирургически денервированных взрослых крыс [20]. Рост аксонов регулируется VEGF независимо от его сосудистой роли, через два рецептора: либо VEGFR2 [21] или нейрофилин-1 (NRP1) [22]. NRP1 и NRP2, первоначально обнаруженные в качестве нейрональных рецепторов для семафоринов, образуют комплекс с VEGFR-2 и VEGFR-1 [23]. Последние данные свидетельствуют о том, что NRP1 в эндотелиальных клетках также может передавать сигналы VEGF независимо от VEGFR-2 [24, 25], а также, что потеря NRP1 или NRP2 связаны с отчетливыми сосудистыми и нейронными дефектами [26]. Тем не менее, до сих пор неясно, происходят ли эти процессы непосредственно с помощью ангиогенеза, индуцированного фактором роста нервов (NGF), или косвенно посредством индукции классических ангиогенных факторов, таких, как VEGF [27].

Интересно отметить, что эти два плеiotропных фактора (VEGF и NGF), а также другие нейротрофины (NT-3, NT-4/5 и BDNF) экспрессируются ectopическими эндометриальными клетками. В последнее время исследования *in vitro* и *in vivo* предоставили первые подсказки о механизмах боли при эндометриозе. У взрослых самок крыс с хирургической индукцией эндометриоза, динамические эстральные изменения как VEGF, так и NGF в эндометриальных кистах происходят параллельно с изменениями в иннервации и васкуляризации. Предполагается, что иннервация в модели эндометриоза происходит путем взаимодействия периваскулярных нервных волокон, сопровождающих рост кровеносных сосудов при неоваскуляризации [7, 28].

Таким образом, на основании полученных данных о повышении экспрессии VEGF в эутопическом и ectopическом эндометрии в зонах ремоделирования миометрия на фоне увеличения количества нервных структур при аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, можно сделать заключение, что одним из важнейших патогенетических механизмов аллогенеза при аденомиозе и формировании болевой формы заболевания является повышенная экспрессия VEGF и интенсификация неоваскуляризации.

Таким образом, на основании полученных данных о повышении экспрессии VEGF в эутопическом и ectopическом эндометрии в зонах ремоделирования миометрия на фоне увеличения количества нервных структур при аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, можно сделать заключение, что одним из важнейших патогенетических механизмов аллогенеза при аденомиозе и формировании болевой формы заболевания является повышенная экспрессия VEGF и интенсификация неоваскуляризации.

References

1. Huang T.S., Chen Y.J., Chou T.Y., Chen C.Y., Li H.Y., Huang B.S. et. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2014; 18(7): 1358-71. doi: 10.1111/jcmm.12300.
2. Brosens I., Pijnenborg R., Benagiano G. Defective myometrial spiral artery remodelling as a cause of major obstetrical syndromes in endometriosis and adenomyosis. *Placenta.* 2013; 34(2):100-5. doi: 10.1016/j.placenta.2012.11.017.

3. Benagiano G., Brosens I., Habiba M. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum. Reprod. Update.* 2014; 20: 386-402.
4. Mu Y., Hu X., He J., Liu H., Zhang L., Liu H. et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor and cancer antigen 125 are related to the prognosis of adenomyosis patients after interventional therapy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(6): 9549-54.
5. Giudice L.C. Clinical practice. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(25): 2389-98. doi: 10.1056/NEJMc1000274.
6. Laschke M.W., Giebels C., Menger M.D. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum. Reprod. Update.* 2011; 17(5): 628-36. doi: 10.1093/humupd/dmr023.
7. Orazov M.R., Nosenko O.M. Innervacionnyj apparat i neyro-tkanevyje otnoshenija v miometrii u pacientok s adenomiozom. *Reproduktivnaya endokrinologiya.* 2014; 6: 79-84. (in Russian)
8. Demir R., Yaba A., Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem.* 2010; 112: 203-14. doi:10.1016/j.acthis.2009.04.004.
9. Makanya A.N., Hlushchuk R., Djonov V.G. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis.* 2009; 12: 113-23. doi:10.1007/s10456-009-9129-5.
10. Murasawa S., Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 36-42.
11. Bogoslovsky T., Spatz M., Chaudhry A., Maric D., Luby M., Frank J. et al. Stromal-derived factor-1[alpha] correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients. *NINDS Natural History of Stroke Investigators.* 2011; 42(3): 618-25. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596007.
12. Vodolazkaia A., Yesilyurt B.T., Kyama C.M., Bokor A., Schols D., Huskens D. et al. Vascular endothelial growth factor pathway in endometriosis: genetic variants and plasma biomarkers. *Fertil. Steril.* 2016; Jan 7. pii: S0015-0282(15)02185-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.016.
13. Nagy J.A., Benjamin L., Zeng H., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008; 11(2): 109-19. doi: 10.1007/s10456-008-9099-z.
14. Barcena de Arellano M.L., Arnold J., Lang H., Vercellino G.F., Chiantera V., Schneider A. et al. Evidence of neurotrophic events due to peritoneal endometriotic lesions. *Cytokine.* 2013; 62(2): 253-61. doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.003.
15. Popov Je.N., Oparina T.I., Prokopenko V.M., Stepanov M.G. Kliniko-patogeneticheskoe obosnovanie kombinirovannogo lechenija giperplasticheskikh processov matki. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2010; 4: 71-5. (in Russian)
16. Mackenzie F., Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development.* 2012; 139: 1371-80. doi:10.1242/dev.072348.
17. Mani N., Khaibullina A., Krum J.M., Rosenstein J.M. Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Exp. Neurol.* 2005; 192: 394-406. doi:10.1016/j.expneurol.2004.12.022.
18. Kuruvilla R., Zweifel L.S., Glebova N.O., Lonze B.E., Valdez G., Ye H. et al. A neurotrophin signalling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signalling. *Cell.* 2004; 118: 243-55. doi:10.1016/j.cell.2004.06.021.
19. Long H., Sabatier C., Ma L., Plump A., Yuan W., Ornitz D.M. et al. VEGF-A and Semaphorin3A: modulators of vascular sympathetic innervation. *Dev. Biol.* 2009; 334: 119-32. doi:10.1016/j.ydbio.2009.07.023.
20. Marko S.B., Damon D.H. VEGF promotes vascular sympathetic innervation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2008; 294: 2646-52. doi:10.1152/ajpheart.00291.2008.
21. Ruiz de Almodovar C., Fabre P.J., Knevels E., Coulon C., Segura I., Haddick P.C. et al. VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron.* 2011; 70: 966-78. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.014.
22. Erskine L., Reijntjes S., Pratt T., Denti L., Schwarz Q., Vieira J.M. et al. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron.* 2011; 70: 951-65. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.052.
23. Fuh G., Garcia K.C., de Vos A.M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 26690-26695.
24. Wang L., Zeng H., Wang P., Soker S., Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 48848-60. doi:10.1074/jbc.M310047200.
25. Wang L., Dutta S.K., Kojima T., Xu X., Khosravi-Far R., Ekker S.C. et al. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS One.* 2007; 2: e1161. doi:10.1371/journal.pone.0001161.
26. Geretti E., Shimizu A., Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008; 11: 31-9. doi:10.1007/s10456-008-9097-1.
27. Hansen-Algenstaedt N., Algenstaedt P., Schaefer C., Hamann A., Wolfram L., Cinguz G. et al. Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem. Cell Biol.* 2006; 125: 637-49. doi:10.1007/s00418-005-0111-z.
28. Zhang G., Dmitrieva N., Liu Y., McGinty K.A., Berkley K.J. Endometriosis as a neurovascular condition: estrous variations in innervation, vascularization, and growth factor content of ectopic endometrial cysts in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 294: 162-11.

Поступила 17.11.15

Сведения об авторах:

Оразов Мекан Рахимбердыевич, канд. мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: otekkan@mail.ru

Носенко Елена Николаевна, доктор мед. наук, проф., каф. акушерства и гинекологии Одесского национального медицинского университета, отрасль специализации — акушерство и гинекология, 65082, Украина, г.Одесса, пер. Валиховский, 2; e-mail: nosenko.olena@gmail.com