

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

Роль воспаления и иммунореактивности в развитии болевого синдрома при аденомиозе

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, 2.

Цель исследования: анализ роли иммуновоспалительных процессов в развитии аденомиоза и ассоциированного с ним болевого синдрома.

Методика. Для морфологического исследования использовали фрагменты стенок 56 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с тазовой болью на фоне диффузного аденомиоза II—III степени, и 30 пациенток с безболевым формой аденомиоза. Для идентификации, оценки количества и пространственного распределения макрофагов, Т-хелперов и натуральных киллеров использовали МАТ к CD68, CD4, CD56 соответственно.

Результаты исследования. Показано статистически значимое возрастание экспрессии CD68 ($49,3 \pm 2,3$ против $21,2 \pm 1,7$ усл. ед., $p < 0,01$), CD56 ($47,4 \pm 2,7$ против $17,2 \pm 1,8$ усл. ед., $p < 0,01$) и CD4 ($52,1 \pm 2,2$ против $19,9 \pm 2,5$ усл. ед., $p < 0,01$) у пациенток с болевой формой аденомиоза в зонах роста эктопического эндометрия, в периваскулярных регионах миометрия по сравнению с таковыми зонами у женщин с безболевым аденомиозом.

Выводы. Аденомиоз является хроническим воспалительным заболеванием, сопровождающимся дисфункцией маточной иммунной реактивности. Иммуновоспалительные процессы в матке при аденомиозе способствуют персистенции и росту эндометриоидных имплантов. При аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, наблюдается повышение количества активированных макрофагов, натуральных киллерных клеток и Т-хелперов в периваскулярных регионах и в зонах ремоделирования миометрия, являющихся местом локализации, что приводит к усилению нейрогенного воспаления и чувствительности ноцицепторов, активации периферических нервных волокон и к генерации боли.

Ключевые слова: аденомиоз; тазовая боль; воспаление; макрофаги; натуральные киллерные клетки; Т-хелперы

Для цитирования: Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Носенко Е.Н. Роль иммуновоспалительной реактивности в развитии болевого синдрома при аденомиозе. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2016; 60(1): 40—44

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

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

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

The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis

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 analyze the role of inflammatory and immune reactivity in the development of adenomyosis and its associated pain.

Methods. For morphological studies it were using fragments of walls of 56 uterus received after hysterectomy in patients with pelvic pain on a background of diffuse adenomyosis II—III degree, and 30 patients with painless form of adenomyosis. To identify, evaluate the amount and spatial distribution of macrophages, T-helper cells and natural killer cells it was using MAbs to CD68, CD4, CD56 respectively.

The results of the study showed a significantly high expression of CD68 ($49,3 \pm 2,3$ vs. $21,2 \pm 1,7$ conv. units, $p < 0,01$), CD56 ($47,4 \pm 2,7$ vs. $17,2 \pm 1,8$ conv. units, $p < 0,01$, $p < 0,05$) and CD4 ($52,1 \pm 2,2$ vs. $19,9 \pm 2,5$ conv. units, $p < 0,01$) in patients with painful form of adenomyosis in the regions of ectopic endometrium and in the regions of perivascular growth in myometrium compared to those areas in women with painless adenomyosis.

Conclusions: Adenomyosis is a chronic inflammatory disease accompanied by dysfunction of the uterine immune re-

Для корреспонденции: Оразов Мекан Рахимбердыевич, канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов, e-mail: omekan@mail.ru

activity. Inflammatory and immune processes in the uterus with adenomyosis contribute to the persistence and growth of endometrial implants. In adenomyosis, associated with chronic pelvic pain syndrome, there is increase in the number of activated macrophages, natural killer cells and T-helper cells in the perivascular regions and in areas of remodeling of the myometrium are carriers of the nerves, which leads to increased neurogenic inflammation and sensitivity of nociceptors, activation of peripheral nerve fibers and the generation of pain.

Key words: adenomyosis; pelvic pain; inflammation; macrophages; natural killer cells; T-helper cells

For citation: Orazov, M.R., Radzinskiy V.E., Nosenko O.M. The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 40–44.

For correspondence: Orazov Mekan Rahimberdievich, e-mail: omekan@mail.ru

Thanks to: The authors express gratitude to the conduct morphological and immunohistochemical studies M.D. Professor Department of Histology and Embryology of Zaporizhia National Medical University of Ministry of Health of Ukraine, Professor Sulaieva Oksana Nikolaeвна and the Head of Department of pathology of Rresearch Institute of Urology Efremov Gennady Dmitrievich.

Общеизвестно, что эндометриоз развивается на фоне нейроиммуногормональной дисфункции [1, 2]. Несмотря на то, что эндометриоз, как правило, считается гормональнозависимым заболеванием, существует точка зрения, что дисфункция иммунной системы может быть одним из возможных факторов развития эндометриоза. Адекватно функционирующая иммунная система элиминирует клетки эндометрия, располагающиеся за пределами слизистой оболочки матки. У пациенток с эндометриозом дисфункция иммунной реактивности позволяет эктопическому эндометрию пролиферировать и внедряться в подлежащие ткани. Клетки эктопического эндометрия вызывают декструктивные изменения в миометрии и развитие воспаления. [3, 4], которая сопровождается изменением фенотипических свойств макрофагов, усилением В-клеточного иммунного ответа, появлением аутоантител к собственному эктопическому эндометрию и снижением активности и цитотоксичности естественных киллеров (НК). Экспериментально доказано, что клетки эндометрия могут имплантироваться только в регионах с измененными клеточно-опосредованными иммунными реакциями [5].

С другой стороны, возможно, что иммунологические изменения вокруг эндометриозных очагов лишь вторичны по отношению к развитию эндометриоза [6].

Изменения иммунной реактивности при аденомиозе подтверждает ряд исследований. Исследование эластазы лейкоцитов и альфа-1-ингибитора протеиназы у пациентов с различными стадиями аденомиоза выявило активацию реакций врожденного иммунитета у всех больных с аденомиозом [7]. Было показано нарушение T (H) 17-Treg баланса как в периферической крови, так и в матках больных с диффузной и очаговой формами аденомиоза [9]. Отмечено, что наличие диффузного или типа «аденомиома» аденомиоза связано с заметным увеличением плотности макрофагов и НК-клеток в строме эндометрия, по сравнению с очаговым аденомиозом [10].

Воспалительный процесс, при аденомиозе, сопровождается высвобождением различных аллогенов, что

способствует функциональным и структурным изменениям ноцицепторов в месте альтерации и вызывает повышение их возбудимости (периферическую сенситизацию) [11]. Интерлейкин-1 (IL-1), продуцируемый активированными макрофагами, индуцирует синтез простагландинов, избыточная концентрация которых может быть ответственна за возникновение боли [12].

Работы, посвященные иммуногистохимическому изучению иммунновоспалительного аллогенеза при аденомиозе малочисленны.

Цель исследования — изучение роли иммунновоспалительных процессов в развитии аденомиоза и ассоциированного с ним болевого синдрома.

Методика

Объектом исследования служили 56 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с диффузным аденомиозом II—III степени, сопровождающимся выраженным болевым синдромом, и 30 маток пациенток с безболевым вариантом аденомиоза (контроль). Пациентки были прооперированы в пролиферативную фазу цикла.

Полученные после гистерэктомии образцы стенки матки, включающие эндометрий и миометрий обрабатывали общепринятыми в гистологической практике методами и готовили парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Общую морфологическую оценку проводили при окраске гематоксилином и эозином. Для оценки характера межклеточных коопераций различные линии клеток визуализировали иммуногистохимически. Для идентификации, оценки количества и пространственного распределения макрофагов, T-хелперов и НК использовали мышинные антитела (MAT): к CD68, Macrophage (клон PG-M1, «Diagnostic BioSystems», США); CD4 (клон EP204, «Diagnostic BioSystems», США); CD56 (клон 123C3.D5, «Diagnostic BioSystems», США) соответственно. При иммунофенотипировании макрофагов использовали

в качестве маркера зрелых и активированных макрофагов CD68; CD4 — как маркер Т-хелперов; CD56 — как маркер NK-клеток.

Оценивали удельную плотность иммунопозитивных клеток в условных единицах (количество окрашенных в коричневый цвет клеток на тысячу стромальных клеток).

Для «демаскировки» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (ДАКО, Дания) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR при 450W 3 раза по 3,5 мин. После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (ДАКО, Дания) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (ДАКО, Дания) наносили первичные антитела (RTU). Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+, Дания. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (ДАКО, Дания). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Съемку осуществляли на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония). Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую оптически прозрачную среду Permanent Mounting Medium (ДАКО, Дания).

Комплексный морфометрический анализ, проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1.

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы «Statistica for Windows, 7».

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования лейкоцитарная инфильтрация в эндометрии и в миометрии при болевой форме аденомиоза была более значительно выражена, чем при безболевой. Инфильтраты располагались не только в зонах вокруг очагов аденомиоза, но и свободно в строме — между пучками гладких миоцитов. Причем, если в эндометрии лейкоцитарная инфильтрация носила преимущественно диффузный характер, то в миометрии наблюдались преимущественно периваскулярные скопления лимфоцитов. При этом количество CD68-позитивных клеток в эктопическом эндометрии больных с болевой формой аденомиоза было значимо выше ($49,3 \pm 2,3$ усл. ед.), чем при безболевой ($21,2 \pm 1,7$ усл. ед., $p < 0,01$). Характерно, что при этом макрофаги определялись преимущественно в периваскулярных регионах, хотя незначительная часть их обнаруживалась вблизи маточных желез и даже в их просвете. Особенно многочисленными оказались

CD68-позитивные клетки в участках эктопического роста эндометрия. Здесь макрофаги всегда обнаруживались не только в периваскулярном регионе, но и в зонах инвазии маточных желез и характеризовались высокой интенсивностью метки. Полученные данные коррелируют с результатами исследования [13], согласно которому аденомиозная ткань содержит значительно больше CD68-позитивных клеток, чем соответствующий аутологичный эндометрий.

В ряде участков обнаруживались прямые контакты CD68-позитивных клеток с эпителием эктопических маточных желез. Однако, макрофаги выявлялись не только в очагах аденомиоза, но также в достаточном большом количестве — в самом миометрии, как вокруг крупных кровеносных сосудов мезометрии, так и в прослойках стромы между пучками гладких миоцитов. И здесь закономерно выявлялась периваскулярная локализация CD68-позитивных клеток. Кроме того, в большом количестве макрофаги присутствовали в участках лейкоцитарной инфильтрации стромы, — особенно вокруг очагов аденомиоза с признаками дистрофии и десквамации клеток. Менее многочисленными оказались свободные макрофаги, одиночно расположенные между пучками гладких миоцитов. Проведение сравнительного анализа количества макрофагов в миометрии у пациенток основной группы и группы контроля показало усиление рекрутирования данных клеток при аденомиозе, осложненном формированием синдрома тазовой боли. Причем CD68-позитивные клетки были ассоциированы не только с зонами роста эктопического эндометрия, но и с периваскулярным регионом, являющимся местом локализации нервных структур и центром процессов ремоделирования стенки матки при данной патологии, как было нами показано ранее [14].

Нервные окончания в миометрии и эндометриоидных гетеротопиях потенциально могут быть стимулированы различными воспалительными цитокинами, в том числе гистамином, серотонином, брадикинином, простагландинами, лейкотриенами, интерлейкинами, ацетилхолином, факторами роста (сосудисто-эндотелиальным (VEGF), фактором некроза опухоли, эпидермальным, тромбоцитарным, трансформирующим фактором роста- β и фактором роста нервов (NGF)). Многие из указанных выше веществ секретируются макрофагами [15]. Повышение плотности макрофагов и секретируемых ими альгоенов может быть связано с возникновением болевых ощущений у женщин с аденомиозом. Кроме того, активированные макрофаги могут способствовать росту нервных волокон вследствие увеличения продукции IL-1 β и усиления продукции NGF [16], повышения экспрессии нейротрофического фактора (brain-derived neurotropic factor

— BDNF) — ключевого фактора роста и дифференциации структур периферической нервной системы [17], интенсификации продукции VEGF, который может выступать в качестве нейротрофического фактора, стимулирующего рост нервных волокон [15, 18]. Ранее, нами было доказано статистически значимое увеличение количества сенсорных нервных структур при аденомиозе с болевым синдромом [14].

Помимо клеток неспецифического иммунитета, в эндометрии и миометрии пациенток с аденомиозом было увеличено и количество клеток специфической иммунной защиты.

Интересные результаты были получены при оценке количества и распределения НК клеток при аденомиозе, считающихся одними из наиболее многочисленных клеток в эндометрии в физиологических условиях. Большинство НК в миометрии экспрессируют CD56, который по своей природе является нейральной молекулой адгезии (NCAM-1). Аналогичная молекула экспрессируется на плазмолемме симпатических нервных волокон [19]. Более того, предполагается возможность гомотипических взаимодействий между молекулами NCAM-1, что предполагает высокую вероятность прямого взаимодействия НК с нервными волокнами.

В значительном количестве CD56-позитивные клетки выявлялись в эндометрии и миометрии пациенток с аденомиозом, сопровождающимся болевым синдромом. В эндометрии они регистрировались как под покровным эпителием, так и между железами. В отдельных участках выявлялись непосредственные контакты НК с клетками железистого эпителия, а иногда наблюдалось их интраэпителиальное расположение. Характерно, что интраэпителиальное расположение НК было ассоциировано с усиленной пролиферацией железистых эпителиоцитов. Однако более типичной была структурная колокализация НК с сосудами и стромальными элементами. Сравнительный анализ количества CD56 в миометрии у пациенток с болевой и безболевой формой аденомиоза показало статистически значимое усиление рекрутирования данных клеток при аденомиозе, осложненным формированием синдрома тазовой боли, по сравнению с безболевым фенотипом заболевания ($47,4 \pm 2,7$ и $17,2 \pm 1,8$ усл. ед. соответственно). К аналогичному заключению пришли и другие исследователи [18]. Известно, что три наиболее характерных цитокина, продуцируемых НК (IL-12, IL-15 и IL-18), являются мощными стимуляторами ангио- и нейрогенеза. Можно предположить, что повышение количества НК является одним из ведущих механизмов стимуляции ангиогенеза, предопределяющего рост нервных волокон и формирование болевого синдрома.

CD4-позитивные клетки выявлялись в большом количестве в виде диффузной сети в эндометрии, а также под покровным эпителием и в строме между железами. У части пациентов выявлена интраэпителиальная локализация CD4-позитивных клеток (Т-хелперов) между пролиферирующими эпителиоцитами маточных желез. Основная масса эндометриальных CD4-позитивных клеток выявлялась в пространствах между очагами эктопии в миометрии. Здесь Т-лимфоциты локализовались преимущественно в периваскулярных регионах — чаще одиночно, у некоторых пациентов — группами.

Высоким оказалось и количество CD4-позитивных клеток в миометрии — они располагались преимущественно между пучками гладких миоцитов, в составе стромальных элементов, а также в значительном количестве вдоль мелких сосудов миометрия. При этом количество данных клеток у больных с болевой формой аденомиоза статистически значимо превышало таковое у пациенток с безболевой — ($52,1 \pm 2,2$ против $19,9 \pm 2,5$ усл. ед. соответственно) и было сопряжено с выраженностью ремоделирования миометрия. Не исключено, что данные клетки относятся к фенотипу Т-регуляторных CD4+CD25+ лимфоцитов, которые с одной стороны обеспечивают формирование иммунологической толерантности, а с другой известны как мощные продуценты TGF- β . стимулирующего формирование миофибробластов и эпителио-мезенхимную трансформацию.

Таким образом, аденомиоз является хроническим воспалительным заболеванием, обусловленным изменением иммунной реактивности. Как известно, провоспалительные цитокины приводят к усилению нейрогенного воспаления и увеличению чувствительности ноцицепторов, активации периферических нервных структур, благодаря чему, закрепляется связь между аденомиозом и генерацией тазовой боли.

References

1. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K., Fujishita A., Sekine I., Ishimaru T., Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Hum. Reprod.* 2010; 25(3): 642-53. doi: 10.1093/humrep/dep437.
2. Liu X., Shen M., Qi Q., Zhang H., Guo SW. Corroborating evidence for platelet-induced epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis. *Hum. Reprod.* 2016; Feb 22. pii: dew018.
3. Senturk L.M., Arici A. Immunology of endometriosis. *J. Reprod. Immunol.* 1999; 43(1): 67-83.
4. Vinatier D., Cosson M., Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur. Obstet. Gynecol. Biol.* 2000; 91(2): 113-25.

5. Dmowski W.P., Steele R.W., Baker G.F. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981; 41: 377-83.
6. Kralickova M., Vetvicka V. Immunological aspects of endometriosis: a review. *Ann. Transl. Med.* 2015; 3(11): 153. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.08.
7. Sorokina A.V. Patogenez, prognozirovanie i postgenomnaja diagnostika adenomioza. diss. Moscow, 2012. (in Russian)
8. Yang J.H., Chen M.J., Chen H.F., Lee T.H., Ho H.N., Yang Y.S. Decreased expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells in eutopic endometrium in women with adenomyosis. *Hum. Reprod.* 2004; 19(9): 1974-8.
9. Gui T., Chen C., Zhang Z., Tang W., Qian R, Ma X et al. The disturbance of TH17-Treg cell balance in adenomyosis. *Fertil. Steril.* 2014; 101(2): 506-14. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.10.050.
10. Tremellen K.P., Russell P., Tremellen K.P., Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. *J. Reprod. Immunol.* 2012; 93(1): 58-63. doi: 10.1016/j.jri.2011.12.001.
11. Moalem G., Tracey D.J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.* 2006; 51(2): 240-64.
12. Taylor R.N. Endometriosis. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management.* Ed. by J.F. Strauss III, R.L. Barbieri. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004 : 691-711.
13. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor in adenomyosis and autologous endometrium. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2002; 9(2): 93-7.
14. Orazov M.R., Nosenko O.M. Innervacionnyj apparat i nejro-tkanevye otnoshenija v miometrii u pacientok s adenomiozom. *Reproduktivnaja endokrinologija.* 2014; 6: 79-84. (in Russian)
15. Tran L.V., Tokushige N., Berbic M., Markham R., Fraser I.S. Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum. Reprod.* 2009; 24(4): 835-41. doi: 10.1093/humrep/den483.
16. Bandtlow C.E., Meyer M., Lindholm D., Spranger M., Heumann R., Thoenen H. Regional and cellular codistribution of interleukin 1 beta and nerve growth factor mRNA in the adult rat brain: possible relationship to the regulation of nerve growth factor synthesis. *J. Cell. Biol.* 1990; 111: 1701-11.
17. Shibata A., Zelyvanskaya M., Limoges J., Carlson K.A., Gorantla S. et al. Peripheral nerve induces macrophage neurotrophic activities: regulation of neuronal process outgrowth, intracellular signaling and synaptic function. *J. Neuroimmunol.* 2003; 142: 112-29.
18. Wang F., Shi X., Qin X., Wen Z., Zhao X., Li C. Expression of CD56 in patients with adenomyosis and its correlation with dysmenorrhea. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2015; 194: 101-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.08.027.
19. Armentero M.T., Levandis G., Bazzini E. Cerri S., Ghezzi C. et al. Adhesion molecules as potential targets for neuroprotection in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2011; 43(3): 663-8. doi: 10.1016/j.nbd.2011.05.017.

Поступил 17.12.15

Сведения об авторах:

Радзинский Виктор Евсеевич — д.мед.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов; отрасль специализации — акушерство и гинекология; 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Носенко Елена Николаевна — д.мед.н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии Одесского национального медицинского университета, отрасль специализации — акушерство и гинекология; адрес: 65082, Украина, г.Одесса, пер. Валиховский, 2; e-mail: nosenko.olena@gmail.com