

Подходы к оценке ароматазной активности в эндометриоидных гетеротопиях

Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

Резюме. Представлены результаты оценки активности фермента ароматазы в очагах эндометриоза у пациенток с генитальным эндометриозом и в эндометрии женщин без гинекологической патологии. В аспекте развития и прогрессирования эндометриоза рассмотрены роль данного фермента в организме человека и его значение в патогенезе заболевания. Ароматаза является ключевым ферментом в синтезе эстрогенов и повышение ее активности может приводить к росту эндометриоидных гетеротопий. В качестве способа определения ароматазы в тканях был выбран иммуногистохимический анализ, который позволяет достоверно и точно определять накопление фермента в исследуемых образцах. Обследовано 45 пациенток с эндометриозом и 9 здоровых женщин. Все пациентки прошли клинико-лабораторное обследование, всем женщинам были выполнены лапаро- и гистероскопия. Обнаружено, что активность фермента существенно повышена в эндометриоидных гетеротопиях по сравнению с эндометрием пациенток, у которых не было выявлено гинекологической патологии. Так, относительная площадь экспрессии фермента в очагах эндометриоза в 34 раза превышала площадь экспрессии в эндометрии здоровых женщин. Средняя яркость и оптическая плотность экспрессии ароматазы в тканях больных эндометриозом и здоровых женщин достоверно не различались. Полученные данные свидетельствуют о возможности локального синтеза эстрогенов непосредственно в очагах эндометриоза и могут создавать предпосылки для прогрессирования заболевания и формирования его рецидивов, в том числе и во время лечения гормональными препаратами. Результаты работы могут служить патогенетическим основанием применения ингибиторов ароматазы в лечении эндометриоза.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, ароматаза, иммуногистохимическое исследование, активность ароматазы, рецидивы эндометриоза.

Введение. Вне зависимости от приверженности к одной из существующих теорий развития эндометриоза можно выделить наиболее «популярные» в настоящий момент направления в исследовании патогенеза данного заболевания – это исследования отличий эндометрия у пациенток с эндометриозом от эндометрия здоровых женщин, изучение свойств брюшины и перитонеальной жидкости, а также эндометриоидных гетеротопий. Исследования различных характеристик эндометрия и эндометриоидных гетеротопий могут не только помочь в выяснении причин развития заболевания и различной степени тяжести его течения, но также, в перспективе, оказаться полезными в разработке новых методов и схем лечения. Безусловно, «автономность» эндометриоидных гетеротопий – одна из наиболее интересных проблем в патогенезе заболевания. Это свойство роднит эндометриоз с другими опухолевыми процессами и дает возможность создавать экспериментальные модели заболевания. «Автономность» эндометриоидных гетеротопий может быть объяснена генетическими факторами, а в патогенезе заболевания реализуется на нескольких уровнях – это и регуляция собственного роста, и продукция биологически активных веществ, и участие в метаболизме половых гормонов, в том числе самостоятельный их синтез.

Не вызывает сомнения связь развития и прогрессирования заболевания с уровнем эстрогенов в орга-

низме женщины. В принципе, гормональное лечение эндометриоза сегодня – это создание временной гипоестрогемии, которая может быть различной выраженности, но, несомненно, обладает лечебным эффектом. Интересными представляется изучение причин возникновения рецидива заболевания на фоне и после окончания терапии агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ) – препаратами, долгое время считающимися «золотым стандартом» в лечении эндометриоза и приводящими к выраженному снижению уровня стероидных половых гормонов, что и обуславливает большинство их побочных эффектов. Безусловно, не все рецидивы заболевания могут быть объяснены приемом «некачественных» лекарственных средств или нерадикально проведенным хирургическим этапом лечения. Причиной рецидива заболевания на фоне системной гипоестрогемии может быть повышенный синтез эстрогенов непосредственно в эндометриоидных гетеротопиях.

Повышение экспрессии ароматазы (фермента, ответственного за синтез стероидных половых гормонов) описано и в эутопичном эндометрии у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) [1]. По другим данным активность данного фермента может также коррелировать с выраженностью симптомов болезни (диспареуния, бесплодие) [3].

С патогенетической точки зрения, это объясняется тем фактом, что локально синтезированные

эстрогены создают все условия для пролиферации и инвазивного роста самих очагов эндометриоза. Также активность ароматазы в очагах эндометриоза может быть причиной рецидивов эндометриоза, в том числе и на фоне системной гипоэстрогенемии. Ароматаза катализирует последний этап в синтезе эстрогенов, а именно переход андростендиона и тестостерона в эстрон и эстрадиол соответственно (рис. 1).

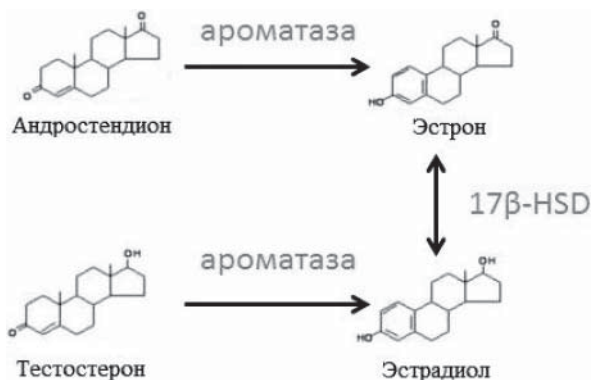


Рис. 1. Схема синтеза половых гормонов

Цель исследования. Определить активность фермента ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях у больных НГЭ.

Материалы и методы. Обследованы 45 больных с диагнозом НГЭ. Диагноз всем пациенткам устанавливался во время проведения лапароскопии при обнаружении эндометриоидных гетеротопий на брюшине малого таза, матки, маточных трубах, яичниках, цистаденом яичников с характерным «шоколадным» содержанием. В обязательном порядке диагноз подтверждался результатами гистологических исследований. Возраст больных варьировал от 22 до 44 лет и в среднем составил $31,24 \pm 1,51$ года. При анализе характеристик менструального цикла отмечено, что средний возраст менархе составил $13,05 \pm 0,42$ года (колебался от 11 до 17 лет), средняя длительность менструации – $5,43 \pm 0,40$ дней (различия от 3 до 11 дней), а средняя длительность менструального цикла составила $28,02 \pm 0,70$ дней (от 24 до 38 дней). При обращении в стационар пациентки наиболее часто предъявляли жалобы на хронические тазовые боли (42,22%) и бесплодие (62,22%). У 46,43% пациенток бесплодие носило первичный характер, 53,57% больных в анамнезе имели беременности. Длительность бесплодия варьировала от 1 до 14 лет и в среднем составила $5,75 \pm 1,31$ лет.

Стадирование заболевания проводилось на основании пересмотренной классификации Американского общества фертильности (R-AFS): I стадия заболевания выявлена у 15,56% пациенток, II ст. – у 15,56% женщин, III ст. – у 17,78% и IV ст. – у 51,10% соответственно. Следует отметить, что балльная оценка распространения эндометриоза варьировала в пределах от 2 до 150 (максимально возможное количество

баллов). Помимо эндометриоидных гетеротопий на брюшине малого таза интраоперационно наиболее часто обнаруживались эндометриоидные кисты яичников (46,67%) и позадишеечный эндометриоидный инфильтрат (31,11%). В 1 случае был выявлен эндометриоз экстрагенитальной локализации (аппендикулярного отростка). Сопутствующая спаечная болезнь органов малого таза при лапароскопии выявлена у 64,44% больных.

У 75,56% пациенток эндометриоз был выявлен впервые, у 24,44% больных установлен рецидив НГЭ.

В качестве объекта сравнения были выбраны фрагменты эндометрия здоровых женщин, так как именно из заброшенного через маточные трубы эндометрия, согласно теории J. Sampson, и образуются эндометриоидные гетеротопии [4]. В исследование были включены 9 женщин в возрасте от 26 до 38 лет, составившие контрольную группу. У них при выполнении лапаро- и гистероскопии не было выявлено гинекологической патологии. У всех женщин наблюдался регулярный менструальный цикл. Возраст наступления менархе колебался от 12 до 16 лет и в среднем составил $12,78 \pm 1,07$ года. Длительность менструации варьировала от 4 до 7 дней (средняя длительность составила $5,39 \pm 0,60$ дней), а продолжительность менструального цикла составляла от 26 до 32 дней (средняя продолжительность – $28,78 \pm 1,26$ дней). Таким образом, ни возраст больных, ни характеристики менструального цикла в основной и контрольной группах достоверно не отличались ($p > 0,05$).

Все пациентки прошли обследование, включающее: сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр, ультразвуковое исследование органов малого таза, клиничко-лабораторное обследование.

Эндоскопическую операцию проводили по стандартизированной методике с помощью эндовидеохирургического оборудования фирмы «Karl Storz» (Германия). Во время операции осматривались органы брюшной полости и малого таза, при обнаружении эндометриоидных поражений оценивалась степень распространенности эндометриоза (как было указано выше). Материалами исследования явились фрагменты эндометриоидных гетеротопий, иссеченных с перитонеальной брюшины и фрагменты эндометрия здоровых женщин контрольной группы.

Хирургический этап лечения и забор материала для исследования выполнялся на базе отделения оперативной гинекологии и отдела эндокринологии репродукции; гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследования проводились в отделе патоморфологии Научно-исследовательского института акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург).

Кусочки гетеротопий и эндометрия фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (pH 7,2), обезжизняли с помощью автоматической станции проводки материала «Leica TP1020» и заливали в парафин. Для морфологического изучения срезы окра-

шивали гематоксилином-эозином по стандартной методике. Затем для ИГХ исследования парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Использовали первичные моноклональные антитела к цитохрому P450 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 использованием пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 7.0, Microsoft Excel и др.), а также 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 (сопряжённых) выборок использовали парный *Ud*-критерий (Вилкоксона). Анализ зависимости между признаками проводили с помощью *gs*-критерия Спирмена. Для всех критериев и тестов величина критического уровня значимости принималась равной 0,05, то есть различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что относительная площадь экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях достоверно отличалась от площади экспрессии в эндометрии контрольной группы (11,94 и 0,35% соответственно), рисунки 2 и 3. Площадь экспрессии в эндометрии пациенток без гинекологической патологии 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 3,51 до 29,34% (средняя площадь экспрессии $11,94 \pm 2,11\%$). Средняя яркость экспрессии ароматазы в очагах эндометриоза составила от 91,46 до

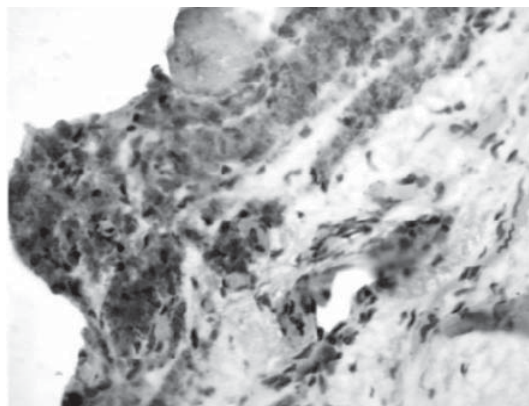


Рис. 2. Экспрессия ароматазы в эндометриоидной гетеротопии (иммуногистохимическое исследование с антителами к ароматазе, ув. $\times 400$)

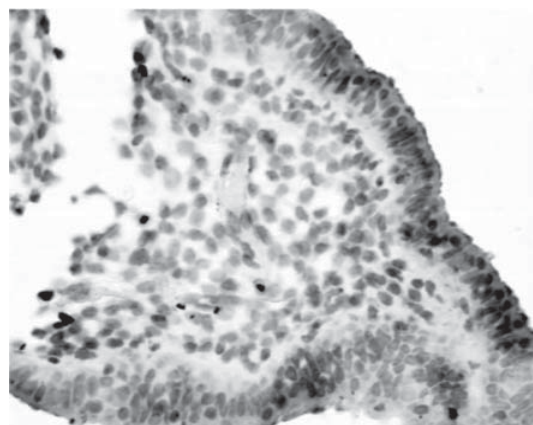


Рис. 3. Экспрессия ароматазы в эндометрии контрольной группы (иммуногистохимическое исследование с антителами к ароматазе, ув. $\times 400$)

191,16 ед. яркости (среднее значение – $139,96 \pm 8,17$ ед. яркости). При оценке экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях оптическая плотность составила от 0,1266 до 0,4624 (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. яркости). При оценке экспрессии ароматазы в эндометрии здоровых женщин оптическая плотность составила от 0,1844 до 0,4236 (среднее значение – $0,2943 \pm 0,0616$ отн. ед.).

При сравнении показателей пациенток, прооперированных в различные фазы менструального цикла, отмечено, что у больных эндометриозом в первую фазу менструального цикла площадь экспрессии ароматазы в эндометриоидных гетеротопиях составляла от 3,51 до 22,78% (среднее значение – $9,25 \pm 5,12\%$), а у больных, прооперированных во вторую фазу менструального цикла, составила от 5,96 до 29,34% (среднее значение – $17,15 \pm 8,77\%$). Эти различия оказались достоверными ($p < 0,04$). Другие полученные данные (средняя яркость и оптическая плотность) в зависи-

мости от фазы менструального цикла достоверно не отличались.

Заключение. Определено, что наиболее значимым параметром при оценке активности ароматазы является площадь экспрессии. Этот показатель достоверно отличается в эндометрии пациенток контрольной группы и в эндометриоидных гетеротопиях, и, следовательно, именно данный параметр целесообразно определять для оценки активности ароматазы при эндометриозе. Средняя яркость и оптическая плотность в эндометрии пациенток контрольной группы и в очагах эндометриоза больных НГЭ достоверно не отличаются.

Таким образом, активность ароматазы, достоверно повышенная в очагах эндометриоза, объясняет синтез эстрогенов в самих гетеротопиях и может быть одной из причин развития заболевания и резистентности к стандартной лекарственной терапии. Также это подтверждается тем фактом, что применение препаратов, блокирующих данный фермент (ингибиторов ароматазы) в модели эндометриоза у мышей приводит к уменьшению размера очагов эндометриоза

и подавлению в них клеточной пролиферации [2]. Полученные данные являются патогенетическим обоснованием для применения ингибиторов ароматазы в комбинированной терапии у больных с распространенными формами генитального эндометриоза, особенно при рецидивирующем характере течения заболевания и резистентностью к проводимой ранее гормональной терапии.

Литература

1. Сонова, М.М. Экспрессия ароматазы в патогенезе эндометриоза / М.М. Сонова, И.П. Борзенкова // XXX юбил. итог. конф. молодых ученых. Тр. конф. – М., 2008. – С. 313–315.
2. Bilotas, M. Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis / M. Bilotas [et al.] // Fertility and sterility. – 2010. – Vol. 93, № 8. – P. 2513–2518.
3. Maia, H.Jr., Correlation between aromatase expression in the eutopic endometrium of symptomatic patients and the presence of endometriosis / H.Jr. Maia, C. Haddad, J. Casoy // International journal of women's health. – 2012. – № 4. – P. 61–65.
4. Sampson, J.A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity / J.A. Sampson // American journal of obstetrics & gynecology. – 1927. – Vol. 14. – P. 422.

A.S. Molotkov

Approaches to evaluation of aromatase activity in endometriosis heterotopies

Abstract. The results of the evaluation of the activity of the enzyme aromatase in endometriosis in women with endometriosis and endometrium of women without gynecological pathology are presented. In the aspect of the development and progression of endometriosis we examined the role of this enzyme in the human body and its role in disease pathogenesis. Aromatase is a key enzyme in the synthesis of estrogen and its increased activity can lead to the growth of endometrial heterotopias. As a method for determination of aromatase in the tissues we selected immunohistochemical analysis, which can reliably and accurately identify the accumulation of the enzyme in the sample. The study involved 45 patients with endometriosis and 9 healthy women. All patients underwent clinical and laboratory examination, all women were performed laparoscopy and hysteroscopy. It was found that the enzyme activity increased substantially in endometrioid heterotopias compared with the endometrium of patients who showed no gynecological pathology. Thus, the relative expression of the enzyme in the area of endometriosis is 34 times the size of the expression in the endometrium of healthy women. Average brightness and the optical density of aromatase expression in the tissues of patients with endometriosis and healthy women did not significantly differ. Those data suggest the possibility of local synthesis of estrogen directly into endometriosis and can create conditions for disease progression and the formation of its recurrence, including treatment with hormonal therapy. The results can serve as a pathogenetic basis of aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis.

Key words: genital endometriosis, aromatase, immunohistochemical study, activity of aromatase, recurrences of endometriosis.

Контактный телефон: +7-921-312-86-01; 328-98-45; e-mail: arseny.molotkov@gmail.com