

Ангиогенез и пролиферация в спайках брюшины малого таза у больных с перитонеальной формой эндометриоза

Д.м.н., проф. В.А. БУРЛЕВ^{1,3}, к.м.н. Е.Д. ДУБИНСКАЯ², н.с. Н.А. ИЛЬЯСОВА¹,
д.м.н., проф. А.С. ГАСПАРОВ², А.В. БУРЛЕВ¹

¹Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова; ²кафедра акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины Российского университета дружбы народов, Москва; ³Отделение здоровья матери и ребенка, университет Упсалы, Упсала, Швеция

Пролиферативная активность в сосудах и процессы ангиогенеза в спайках брюшины малого таза у больных с воспалением и без эндометриоза наиболее выражены на системном, локальном и тканевом уровнях по отношению к больным с эндометриозом и без воспаления.

Ключевые слова: эндометриоз, ангиогенез, пролиферация, перитонеальные спайки.

В последнее время отечественные и зарубежные исследователи интенсивно продолжают изучать механизмы ангиогенеза и пролиферации, нарушение которых способствует формированию спаечного процесса. Соответствующий анализ литературных данных представлен В.А. Бурлевым и соавт. в обзоре [2]. Эти научные данные свидетельствуют, что формирование новых кровеносных сосудов в спайках брюшины доказано и подтверждено в экспериментах на животных [12]. Однако особенности этого процесса, а также его пусковые механизмы развития в клинике до настоящего момента остаются не изученными.

Ангиогенез, т.е. формирование новых кровеносных сосудов из уже существующих, «запускается» в том случае, когда расстояние между клетками и капиллярами становится достаточным для адекватной доставки кислорода и питательных веществ [14]. Роль ангиогенеза в патогенезе эндометриоза нами подробно изучена и доказана [1, 3, 4, 11]. Этот процесс регулируется клеточной гипоксией посредством изменения соотношения активаторов и ингибиторов ангиогенеза [25, 26].

Митотическая активность в железистом эпителии эктопического эндометрия при перитонеальном эндометриозе, как было показано нами [6], связана с ангиогенной и апоптотической активностью в сосудах и строме тазовой брюшины, так же как и с повышенным уровнем сосудисто-эндотелиального фактора роста (СЭФР-А) в перитонеальной жидкости и сыворотке крови. Повышение ангиогенеза и снижение апоптоза в тазовой брюшине напрямую зависят от пролиферативной и ангиогенной активности эктопического эндометрия. При низкой пролиферативной и ангиогенной активности эктопического эндометрия эти процессы сочетаются с неактивным ангиогенезом и высо-

ким апоптозом в тазовой брюшине. Эти результаты способствуют раскрытию патогенетической роли тазовой брюшины по отношению к нетазовой в пролиферации желез эктопического эндометрия и его сосудов. Следовательно, развитие эктопического эндометрия, а возможно и образование спаек [3], у больных с перитонеальной формой генитального эндометриоза основано на близких или совпадающих патогенетических механизмах, связанных с повреждением сосудов брюшины.

Процесс формирования спаечного процесса в малом тазу является универсальным для любого ее повреждения как уникальная реакция брюшины [5]. Он формируется и развивается как при эндометриозе, так и в его отсутствие при перенесенной инфекции или они сочетаются.

Однако причины формирования тазовых перитонеальных спаек (ТПС) до настоящего времени остаются малоизученными, также не установлены и механизмы развития спаечного процесса при перитонеальной форме наружного генитального эндометриоза.

Цель исследования — изучить состояние ангиогенеза и пролиферации в сосудах перитонеальных спаек у больных с перитонеальной формой эндометриоза, спаечным процессом в малом тазу и бесплодием по отношению к сравнительной группе больных с бесплодием, перитонеальными спайками и без эндометриоза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 77 пациенток, получивших хирургическое лечение в гинекологическом отделении городской клинической больницы

e-mail: Eka-dubinskaya@ynadex.ru

цы №79 (Москва), являющемся клинической базой кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины ФПК МР РУДН. Показанием для проведения лапароскопии во всех случаях явилось бесплодие.

В 1-ю группу сравнения вошли 47 пациенток с ТПС и бесплодием, во 2-ю, основную группу, были включены 30 пациенток с перитонеальным эндометриозом, спаечным процессом в малом тазу и бесплодием. Диагноз спаечного процесса был установлен при лапароскопии, эндометриоз верифицировался по результатам гистологического исследования гетеротопий. В связи с тем что ранее нами уже были получены нормативные показатели состояния ангиогенеза на системном и локальном уровнях [1] у пациенток, которым проводилась стерилизация маточных труб лапароскопическим доступом, в настоящем исследовании набор контрольной группы с подобной целью был нецелесообразен. Дизайн: одномоментное исследование, стратифицированная рандомизация. Определение достаточности выборки осуществлялось исходя из необходимого и достигаемого в ходе исследования уровня достоверности ($p < 0,05$).

Критерии включения в 1-ю группу: больные репродуктивного возраста с ТПС 3—4-й стадии распространенности (AFS), отсутствием перитонеальной формы генитального эндометриоза.

Критерии включения во 2-ю группу: больные репродуктивного возраста со спаечным процессом в малом тазу 3—4-й стадии распространенности (AFS) и перитонеальной формой генитального эндометриоза, отсутствием воспалительных заболеваний придатков матки в анамнезе.

Общие критерии для больных 1-й и 2-й групп: первичное и вторичное бесплодие, отсутствие сопутствующей гинекологической патологии, отсутствие гормональной терапии в течение предшествующих 3 мес, отсутствие указаний на оперативные вмешательства в анамнезе.

Лапароскопия проводилась в стандартных условиях с использованием оборудования фирмы «Karl Storz» по традиционной методике. Все оперативные вмешательства производились под эндотрахеальным наркозом. Для создания пневмоперитонеума использовался CO_2 , подача газа и поддержание внутрибрюшного давления осуществлялись с помощью инсуффлятора фирмы «Lawton». Введение троакаров осуществлялось в латеральных подвздошно-паховых областях после предварительной трансиллюминации передней брюшной стенки и под обязательным визуальным контролем со стороны брюшной полости. В ходе операции захват тканей и манипуляции осуществлялись с помощью атравматичных или жестких зажимов. Разделение спаек производилось тупым и острым путем с применением диссектора, микроножниц и эндоскопической коагуляционной иглы.

Гемостаз достигался с применением моно- и биполярной коагуляции. Туалет брюшной полости выполняли с помощью аквауратора фирмы «Эндомедиум». Объем оперативного лечения определялся интраоперационно в зависимости от хирургического диагноза. Во всех случаях проводился сальпингоооариолизис с обеих сторон. При наличии гидросальпинксов выполнялась сальпингостомия и фимбриопластика, при наличии серозоцеле — их опорожнение. У пациенток с наружным генитальным эндометриозом проводилась коагуляция эндометриоидных гетеротопий либо их иссечение.

Состояние полости матки и ее слизистой оболочки оценивалось жидкостной гистероскопией, которая проводилась с помощью жесткого 7-миллиметрового гистероскопа фирмы «Karl Storz» после предварительного расширения цервикального канала расширителями Гегара. В качестве среды для расширения цервикального канала использовали изотонический раствор хлорида натрия. Биоптаты эндометрия, полученные при гистероскопии, подвергались гистологическому исследованию.

Информированное согласие на использование крови и ткани спаек малого таза для проведения исследований было получено у всех пациенток. Кровь для исследования у всех пациенток получали в стандартных условиях из кубитальной вены, утром в день операции. Образцы крови помещали в стерильные пробирки, передавали в лабораторию в сумке-холодильнике, центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин при температуре 10 °С. Образцы сыворотки крови хранили при температуре –70 °С до момента исследования.

Спайки малого таза для исследования получали при лапароскопии, согласно стандартной методике: спайка малого таза захватывается мягким зажимом и натягивается; осуществляется биполярная коагуляция обоих полюсов ее сращения с органами малого таза; рассечение мест коагуляции микроножницами и извлечение спайки через троакар; при необходимости — дополнительный гемостаз с использованием биполярной коагуляции; промывание спайки в физиологическом растворе (0,9% раствор хлорида натрия) с последующей консервацией материала в растворе формалина (50 мл) в течение 24 ч; извлечение спайки из формалина мягким зажимом с последующей консервацией в 70% этиловом спирте до момента проведения исследования.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Анализ содержания СЭФР-А, 1-го растворимого рецептора к СЭФР (pСЭФР P1), 2-го растворимого рецептора к СЭФР (pСЭФР P2), фактора роста фибробластов 2 (ФРФ-2), фактора роста гепатоцитов (ФРГ) в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости проводился с помощью ИФА с применением стандартных наборов (R&D systems, США). Определение высокочувствительного С-реактивного белка и интерлей-

кина-6 в сыворотке крови выполнялось с помощью ИФА с использованием стандартных наборов (R&D systems, США). Проведение реакций и расчет результатов осуществляли в стандартных условиях, согласно рекомендациям производителя.

Иммуногистохимический анализ. Образцы спаек брюшины малого таза подвергались иммуногистохимическому анализу, как было описано нами ранее [9, 10]. Измерения плотности микрососудов были проведены на основе применения первичных моноклональных античеловеческих антител CD31 (DAKO A/S, Glostrup, Дания) при концентрации 0,3 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовались лошадиные антимышьи антитела при концентрации 1,0 г/мл. Подсчет результатов осуществлялся в пяти различно выбранных полях размером 0,109 мм². Средние значения микрососудистой плотности рассчитывались и выражались как число микрососудов в 1 мм². Диаметр микрососудов измерялся с использованием высокоточной цифровой линейки с ценой деления 0,1 мкм. Анализ проводился двумя операторами при увеличении 400 раз с помощью цифровой камеры JVC 3-CCD к световому микроскопу (Nikon Laborphot, «Nikon», Токио, Япония). Изображения были оцифрованы с помощью персонального компьютера и программы анализа изображений Pro-plus для Windows XP. Поскольку данные литературы и наши собственные результаты [9, 10] свидетельствуют об отсутствии зависимости плотности микрососудов от фазы менструального цикла, этот параметр не учитывался при оценке результатов.

Анализ экспрессии Ki-67 (пролиферативный индекс, в %), СЭФР-А и ФРФ-2 в сосудах спаек малого таза проводился с использованием гистохимического метода в условиях стандартного протокола. Для визуализации применялись моноклональные антитела к СЭФР-А и ФРФ-2 [6, 9].

Интенсивность окрашивания. Интенсивность иммуногистохимического окрашивания оценивалась двумя независимыми исследователями (В.А. Бурлев и Н.А. Ильясова) в пяти подлежащих областях при 400-кратном увеличении: 0 — сравнима с негативным контролем; 1 — при слабом окрашивании (едва видно, но не более); 2 — между слабым и сильным; 3 — сильное окрашивание. Интенсивность градуировалась полуколичественно с использованием H-SCORE и рассчитывалась по уравнению:

$H-SCORE = \sum P_i (i + 1)$, где i — интенсивность окрашивания 1, 2 или 3 (слабое, умеренное или сильное соответственно); P_i — процент клеток с различной интенсивностью 0 — 100%. H-SCORE вычисляли путем умножения суммы процентов клеток с различной интенсивностью на интенсивность окрашивания. Этот вариант полуколичественного анализа имеет низкий уровень ошибки как у одного оператора, так и между операторами. Исследователь, опре-

деляющий H-SCORE, был независим от экспериментальных данных, которые оценивались.

Статистический анализ. Для анализа результатов использовали статистические компьютерные программы SPSS (версия 10.0.7) for Windows. Результаты исследования представлены как средние ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). В зависимости от конкретных условий применялись: ANOVA, критерий Вилкоксона, U-критерий Манна—Уитни, критерий Крускала—Уоллиса. Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Описание клинической характеристики больных. Основной жалобой, с которой женщины обратились к врачу, являлось отсутствие наступления беременности.

Анализ репродуктивного анамнеза показал, что в 1-й группе было 15 (31,9%) больных с первичным бесплодием и 32 (68,1%) со вторичным, во 2-й группе — 13 (43,3%) и 17 (56,7%) соответственно ($p > 0,05$). Исходы беременности до наступления вторичного бесплодия у больных 1-й группы (32 пациентки): роды — 5 (15,6%), медицинские аборт — 19 (59,4%), самопроизвольные выкидыши — 3 (9,4%), медицинский аборт и самопроизвольный выкидыш — 2 (6,3%), роды и самопроизвольный выкидыш — 2 (6,3%), роды и самопроизвольный выкидыш и медицинский аборт — 1 (3,0%). Исходы беременности до наступления вторичного бесплодия у 17 пациенток 2-й группы: роды — 1 (5,9%), медицинские аборт — 8 (47,1%), самопроизвольные выкидыши — 4 (23,5%), медицинский аборт и самопроизвольный выкидыш — 3 (17,6%), роды и самопроизвольный выкидыш — 1 (5,9%).

Следовательно, структура исходов беременностей различалась у пациенток 1-й и 2-й групп. Медицинские аборт составляли в обеих группах около половины случаев. У пациенток 2-й группы в 3 раза чаще отмечались самопроизвольные выкидыши, сочетание медицинского аборта и самопроизвольного выкидыша. У пациенток 1-й группы в 2 раза чаще в анамнезе были указания на наличие родов. Возможно, наличие большего количества родов в анамнезе было связано с тем, что возникновение вторичного бесплодия, связанного с наличием ТПС, было обусловлено воспалительными заболеваниями придатков матки, перенесенными после первых родов.

Анализ гинекологического статуса показал, что при бимануальном исследовании у пациенток обеих групп размеры матки соответствовали нормальным. У пациенток 1-й и 2-й групп отмечено ограничение ее подвижности, что было связано с наличием спаечных сращений. У 20 (42,5%) пациенток 1-й группы

и у 12 (40%) 2-й группы при пальпации придатков отмечалась их тяжесть. Болезненность при пальпации области придатков наблюдалась у 19 (40,4%) пациенток 1-й группы и у 10 (33,3%) — 2-й. У 9 (19,1%) пациенток 1-й группы при осмотре было выявлено двустороннее или одностороннее увеличение яичников. У остальных пациенток бимануальное исследование не выявило патологических изменений со стороны придатков матки. При пальпации области крестцово-маточных связок и заднего свода влагалища у 21 (70%) пациентки 2-й группы было обнаружено их укорочение и уплотнение, а также выраженная болезненность при исследовании. Наличие спаечного процесса в дооперационном периоде диагностировано у 39 (82,9%) пациенток 1-й группы и у 22 (73%) — во 2-й. Диагноз наружного генитального эндометриоза был установлен по результатам гинекологического исследования у 25 (83,3%) женщин 2-й группы.

Все пациентки были обследованы терапевтом, окулистом и эндокринологом с целью выявления у них заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, мочевыделительной систем, а также заболеваний желудочно-кишечного тракта для исключения другой соматической патологии, способной повлиять на состояние ангиогенеза. Все обследованные больные были правильного телосложения, физическое развитие соответствовало возрастной норме. Как в 1-й группе, так и во 2-й, у пациенток преобладали заболевания органов пищеварения (хронический гастрит, язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки) — в половине случаев. У каждой 10-й пациентки со спаечным процессом в малом тазу было диагностировано ожирение. В 3 раза чаще в основной группе в анамнезе были указания на болезни органов дыхания. Возможно, увеличение количества заболеваний органов дыхания у пациенток 1-й группы связано с нарушением в системе иммунитета вследствие перенесенных воспалительных заболеваний придатков матки и наличия их хронических форм.

Семейный анамнез отягощен у 18 (38,3%) больных 1-й группы и у 13 (43,3%) — 2-й группы. В 1-й группе — по онкологическим заболеваниям у 8 (17,0%), по заболеваниям желудочно-кишечного тракта — у 4 (8,5%), по заболеваниям сердечно-сосудистой системы — у 4 (8,5%) и по сахарному диабету — у 3 (6,4%). Во 2-й группе — соответственно у 7 (23,3%), у 3 (10%), у 2 (6,7%) и у 1 (3,3%).

Следовательно, у каждой третьей пациентки с ТПС 3—4-й стадии и вторичным бесплодием соматический семейный анамнез был отягощен. У пациенток 2-й группы в 1,5 раза чаще в анамнезе регистрировались онкологические заболевания у ближайших родственников, в 2 раза реже относительно 1-й группы встречался сахарный диабет. У 3 (6,4%) пациенток с ТПС и бесплодием отмечен отягощен-

ный аллергический анамнез (у 1 — на йод, у 1 — на нестероидные противовоспалительные средства, у 1 — на хлорид кальция). У 1 пациентки группы сравнения аллергоанамнез также был отягощен (реакция на анальгин).

Семейный гинекологический анамнез отягощен у 23 (48,9%) пациенток 1-й группы и у 20 (66,6%) больных 2-й. Из них: в 1-й группе — у 10 (21,2%) пациенток и во 2-й группе — у 6 (20%), у ближайших родственников был диагностирован спаечный процесс в малом тазу или в брюшной полости, соответственно у 4 (8,5%) и 8 (26,6%) пациенток — эндометриоз (аденомиоз, перитонеальный эндометриоз или эндометриоидные кисты яичников), у 4 (8,5%) и у 4 (13,3%) — миома матки, у 5 (10,6%) и у 2 (6,6%) — патология эндометрия. Следовательно, семейный гинекологический анамнез у пациенток с ТПС и бесплодием, включенных в 1-ю группу, достоверно не отличался от такового у женщин 2-й группы. Частота спаечного процесса в малом тазу в анамнезе у родственников больных 1-й и 2-й групп не различалась, однако у пациенток 2-й группы в 3 раза чаще семейный гинекологический анамнез был отягощен по заболеваемости эндометриозом.

В ходе гистероскопии и последующего гистологического исследования образцов эндометрия было установлено, что частота внутриматочной патологии зависит от типа происхождения спаек. У пациенток со спайками, связанными с воспалением (1-я группа), и спайками и эндометриозом (2-я группа) результаты гистологического исследования эндометрия были представлены следующим образом: хронический эндометрит — у 7 (14,9%) и у 2 (6,7%) соответственно ($p < 0,05$); внутриматочные синехии — у 4 (8,5%) и у 2 (6,7%) соответственно ($p > 0,05$); гиперплазия эндометрия — у 11 (23,4%) и у 8 (26,6%) соответственно ($p > 0,05$); полипы эндометрия различного типа — у 7 (29,8%) и у 5 (16,6%) соответственно ($p < 0,05$). Патологии эндометрия выявлено не было у 11 (23,4%) пациенток 1-й группы и у 13 (43,3%) 2-й группы ($p < 0,05$). Следовательно, результаты гистологического исследования свидетельствуют о преобладании пациенток с хроническим эндометритом, а также полипами эндометрия в 1-й группе пациенток со спайками и воспалением.

Суммируя клинический анализ больных обеих групп, следует отметить, что они были сопоставимы по основным клиническим результатам обследования, однако имели различия по результатам анамнестических и объективных данных. Так, у больных 1-й группы наблюдалось преобладание экстрагенитальных хронических заболеваний, выраженность клинических признаков хронического воспаления, хронического эндометрита и полипов эндометрия. Все эти данные устанавливают справедливость проведенной рандомизации для последующего сопоставления больных по лабораторным показателям.

Содержание С-реактивного белка и ИЛ-6 в сыворотке крови у больных со спаечным процессом в малом тазу без эндометриоза и с эндометриозом. Анализ показал, что у больных 1-й группы содержание С-реактивного белка и ИЛ-6 в сыворотке крови составило соответственно $2,7 \pm 0,62$ мг/л и $10,4 \pm 1,2$ пг/мл. Эти результаты были достоверно повышены по отношению к больным 2-й группы и референсным значениям. Следовательно, у больных 1-й группы по отношению к больным 2-й группы наблюдались объективные признаки хронического воспалительного процесса. У больных с эндометриозом во 2-й группе достоверных различий в содержании С-реактивного белка и ИЛ-6 в сыворотке крови по отношению к референсным показателям не отмечено.

Ангиогенная активность в сыворотке крови и перитонеальной жидкости у больных со спаечным процессом в малом тазу без эндометриоза и с эндометриозом.

Сыворотка крови. Данные содержания СЭФР-А, рСЭФР Р1, рСЭФР Р2, ФРФ-2 и ФРГ представлены в табл. 1. У больных со спаечным процессом, воспалением и без эндометриоза (1-я группа) показатели СЭФР-А, рСЭФР Р1, рСЭФР Р2 в сыворотке крови достоверно различались от таковых в контрольной и 2-й группах. Различия в содержании ФРФ-2 между группами были недостоверны. Значимые различия обнаружены для концентрации ФРГ между 1-й группой и контролем.

Перитонеальная жидкость. Содержание СЭФР-А в перитонеальной жидкости в контрольной группе было достоверно больше, чем в сыворотке. При этом у больных 1-й группы эти различия были незначимы, а во 2-й группе были достоверны. Обращает на себя внимание тот факт, что содержание СЭФР-А в 1-й группе было максимальным по отношению к контрольной и 2-й группе. Максимальные значения содержания ангиогенных факторов во 2-й группе отмечены для рСЭФР Р1, рСЭФР Р2, ФРФ-2, ФРГ. Отличия в содержании рСЭФР Р1, ФРФ-2, ФРГ между сывороткой и перитонеальной жидкостью были значимыми во всех группах, а для рСЭФР Р2 только для 2-й группы.

Пролиферативный индекс и ангиогенная активность в спайках тазовой брюшины у больных со спаечным процессом в малом тазу без эндометриоза и с эндометриозом. Как следует из табл. 2, пролиферативный индекс в сосудах и плотность микрососудов в спайках малого таза достоверно выше у больных 1-й группы относительно 2-й группы. Подобные изменения зарегистрированы при анализе экспрессии СЭФР-А в сосудах и ФРФ-2 в сосудах в спайках тазовой брюшины: эти показатели также были достоверно выше у больных 1-й группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что базальные мембраны (БМ) являются пленками, на которых располагаются все клет-

Таблица 1. Ангиогенная активность в сыворотке крови (С) и в перитонеальной жидкости (ПЖ) у больных со спаечным процессом в малом тазу без эндометриоза и с эндометриозом ($M \pm SD$)

Параметр	Контрольная группа	1-я группа: спайки 3–4-й стадии без эндометриоза (n=47)	2-я группа: спайки 3–4-й стадии с эндометриозом (n=30)
СЭФР-А, пг/мл:			
С	$97,8 \pm 11,5$	$376,7 \pm 46,8$	$164,5 \pm 34,5$
ПЖ	139 ± 36	498 ± 174	294 ± 44
p	<0,05	>0,05	<0,05
рСЭФР Р1, пг/мл			
С	$38,2 \pm 8,9$	$87 \pm 17,4$	$42,4 \pm 7,9$
ПЖ	127 ± 46	225 ± 91	178 ± 37
p	<0,05	<0,05	<0,05
рСЭФР Р2, пг/мл			
С	1890 ± 997	3456 ± 534	2005 ± 632
ПЖ	2775 ± 438	4836 ± 878	3456 ± 378
p	>0,05	>0,05	>0,05
ФРФ-2, пг/мл			
С	$4,1 \pm 1,1$	$9,3 \pm 2,7$	$5,5 \pm 3,2^*$
ПЖ	$54 \pm 8,3$	$86,7 \pm 12,4$	$48,4 \pm 8,9$
p	<0,05	<0,05	<0,05
ФРГ, пг/мл			
С	621 ± 151	$979,5 \pm 207$	674 ± 189
ПЖ	1020 ± 77	1550 ± 90	1364 ± 89
p	<0,05	<0,05	<0,05

Примечание. Достоверность различия показателей между 2-й группой в сравнении с контрольной и 1-й группами во всех случаях $p < 0,05$, кроме отмеченного звездочкой (*) — $p > 0,05$. Здесь и в табл. 2: расчет статистических различий осуществлялся с помощью ANOVA.

ки организма. Исключение составляют клетки соединительной ткани и крови. Одна сторона БМ заполнена клеткой или слоем клеток, а другая сторона БМ контактирует с фиторетикулярным межклеточным матриксом. Все это в полной мере относится и к брюшине. Эндотелий кровеносных сосудов, в том числе и капилляров, также располагается на БМ. Следовательно, между строением брюшины и кровеносных сосудов имеется много общего. В построении БМ участвуют коллагены, протеогликаны, неколлагеновые гликопротеины. Все компоненты БМ синтезируются прилегающими к ним клетками. Особую роль выполняют интегрин, белки плазматической мембраны клеток, соединяющие клетку с БМ. К белкам БМ относится коллаген 4-го типа — основной структурный белок БМ. Значительную массу БМ составляют протеогликаны, при этом гепарансульфатпротеогликанов больше, чем хондроитинсульфатпротеогликанов. Среди неколлагеновых гликопротеинов отмечается ламинин. Следовательно, белки БМ содержат специфические центры связывания с другими молекулами БМ и с клеточными мембранами. Это обеспечивает высокоупорядоченное позиционирование молекул в БМ [8].

Полученные результаты выполненной работы свидетельствуют об изменении пролиферативной и ангиогенной активности при спаечном процессе в малом тазу. В первую очередь это связано с нарушением соотношения между про- и антиангиогенными факторами на системном, локальном и тканевых уровнях преимущественно за счет повышения активности проангиогенных. При этом существенный вклад вносит функционирующий эктопический эндометрий при перитонеальной форме эндометриоза и/или воспалительный процесс.

Формирование новых сосудов в спайках малого таза изучено на моделях животных и считается универсальным процессом, необходимым для запуска патологических механизмов формирования спаек [12, 24]. Ангиогенез при этом является саморегулируемым и строго контролируемым последовательным процессом, включающим этапы дегенерации сосудистой БМ и интерстициального матрикса, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, заканчивающуюся тубулогенезом и формированием капилляров.

Протеолитические ферменты (матриксные металлопротеазы и активаторы плазминогена), выработка которых регулируется факторами роста, являются фундаментальными факторами всех стадий ангиогенеза, в том числе дегенерации периваскулярного матрикса и тканевой стромы, миграции и пролиферации эндотелиальных клеток сосудов [13]. Факторы роста, такие как СЭФР-А и его рецепторы, ФРФ, являются ангиогенными и участвуют в регуляции экспрессии протеолитических ферментов. Следовательно, изменения содержания ангиогенных факторов роста предшествуют нарушению экспрессии ферментов, роль которых в процессах формирования и дегенерации фибрина хорошо изучена.

Роль ангиогенеза в патогенезе эндометриоза изучена нами ранее [3]. В настоящее время считается, что СЭФР-А индуцирует ангиогенез посредством активации рСЭФР Р2, в то время как рСЭФР Р1 является инертным фактором, регулирующим возможность данного взаимодействия [26]. Воспалительная реакция, обусловленная СЭФР, регулируется рСЭФР Р1 путем повышения мобилизации миелоидных предшественников из костного мозга в кровь, повышения их дифференцировки, мобилизации и активации, а также посредством повышения продукции цитокинов макрофагами. Доказано также, что протеазы индуцируют цитотоксичность периферических нейтрофилов *in vitro*. Как следствие, происходит активация Т-лимфоцитов и макрофагов, которые моделируют воспалительный ответ [23].

ФРГ и его рецепторы являются митогеном, морфогеном и ангиогеном в отношении эндотелиальных клеток сосудов и эндометриальных эпителиальных клеток. Считается, что его продукция регулируется эстрогенами и прогестероном [15, 30]. Продукция ФРГ осуществляется мезенхимными клетками и макрофагами в ответ на воздействие различных воспалительных медиаторов и не зависит от фазы менструального цикла, что описано в литературе при эндометриозе [17]. Доказано, что прямая стимуляция макрофагов в культуре эстрогенами и прогестероном приводит к повышению секреции ФРГ и СЭФР макрофагами перитонеальной жидкости. При этом концентрация ФРГ при стимуляции эстрогенами увеличивается только в случае наличия эндоме-

Таблица 2. Проллиферативный индекс и ангиогенная активность в спайках тазовой брюшины у больных со спаечным процессом в малом тазу без эндометриоза и с эндометриозом ($M \pm SD$)

Параметр	1-я группа: спайки 3–4-й стадии без эндометриоза ($n=47$)	2-я группа: спайки 3–4-й стадии с эндометриозом ($n=30$)
Проллиферативный индекс в сосудах (Ki-67), %	0,69±0,1	0,47±0,07
Плотность микрососудов (MVD, CD31)	121,4±12,4	79,3±7,6
Экспрессия СЭФР-А в сосудах, H-SCORE	1,7±0,07	1,2±0,05
Экспрессия ФРФ-2 в сосудах, H-SCORE	1,4±0,1	0,9±0,2

Примечание. $p < 0,05$ — между 1-й и 2-й группой.

триоза, однако содержание СЭФР увеличивается независимо от наличия заболевания как при контакте с эстрогенами, так и при взаимодействии с прогестероном [18]. Интересным фактом является и то, что концентрация ФРГ коррелирует со стадией эндометриоза, согласно классификации Американского общества фертильности (AFS), также этот показатель может рассматриваться в качестве критерия для оценки активности заболевания [21, 29].

ФРФ-2 (основной фактор роста) стимулирует пролиферацию клеток мезодермы и нейроэктодермы, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, нейробласты и кератиноциты. Он дает хемотаксический и митогенный эффект в отношении эндотелиальных клеток *in vitro*, включая индукцию выработки факторов, повреждающих БМ и обеспечивающих миграцию капиллярных эндотелиальных клеток в коллагеновый матрикс с формированием капилляроподобных структур [9]. Считается, что ФРФ-2 является регулятором ангиогенеза *in vivo*, обеспечивающим процессы заживления ран и репарации тканей, включая формирование спаечного процесса в брюшной полости.

Имеются данные о том, что системная энзимотерапия положительно влияет на частоту формирования послеоперационных спаек, существенно снижая ее. Авторы связывают наличие данного эффекта со снижением содержания ангиогенных факторов роста, в частности СЭФР-А и ФРФ-2, что подтверждает роль этих маркеров в развитии спаечного процесса и данные, представленные в исследовании [22]. Наиболее изученным механизмом, влияющим на выработку СЭФР и его рецепторов, является гипоксия — фундаментальный биологический процесс, необходимый в качестве адаптации живого организма в различных жизненных и биологических ситуациях. В литературе [23, 28] представлены данные об изменении ангиогенеза при эндометриозе, а также при спаечном процессе в малом тазу.

Экзогенные причины, влияющие на баланс факторов роста, связаны с усилением пролиферации в эу- и эктопическом эндометрии при взаимодействии с семенной жидкостью при эндометриозе [19]. Этот эффект обусловлен наличием в семенной жидкости активных молекул (простагландины E_2 , ФРГ и эстрадиола), оказывающих стимулирующее действие на эндометрий [16]. Семенная жидкость попадает в полость матки или брюшную полость посредством гематогенной диссеминации либо прямой тканевой перфузии через передний и задний своды влагалища после полового акта. Содержащиеся в ней активные молекулы (в частности, простагландины E_2) повышают клеточную пролиферацию, подавляют апоптоз и индуцируют выработку некоторых протеолитических ферментов, способствующих инвазии эктопического эндометрия при эндометриозе [16]. Не исключено, что эти же механизмы способствуют под-

держанию адекватного кровоснабжения сформированных спаек.

Эндогенными регуляторами ангиогенеза и баланса факторов роста являются половые стероидные гормоны: эстрогены — стимуляторы, андрогены и прогестерон — природные супрессоры. Следовательно, такие процессы, как менструальное кровотечение, репарация тканей, регенерация, воспаление, ангиогенез, имплантация бластоцисты и прогрессирование беременности, являются результатом сбалансированной регуляции роста и дифференцировки яичников, эндометрия, пролиферации, апоптоза и ангиогенеза, регулируемых половыми стероидами [20]. Известно также, что эстрогены дают противовоспалительный и вазопротекторный эффект. Показано, что в отсутствие эстрогенов активация макрофагов в процессе заживления раны стимулирует воспалительную реакцию, тогда как эстрогены и прогестерон вызывают их активацию с развитием репарации ткани, ангиогенеза и ремоделирования [27].

Значительная роль в стимуляции выработки факторов роста макрофагами перитонеальной жидкости принадлежит также половым стероидам (эстрогенам и прогестерону), концентрация которых в перитонеальной жидкости весьма высока. Это позволило сделать вывод о том, что половые стероиды являются аутокринными регуляторами функции макрофагов и стромальных клеток. При этом не исключено, что в патогенезе неадекватной реакции брюшины на раздражение существенная роль принадлежит двум основным механизмам: воспалительному ответу и действию половых гормонов [18]. Половые гормоны также определяют барьерную функцию эндометрия, защищающую органы малого таза от восходящей инфекции [20].

С учетом дизайна исследования — стратифицированной рандомизации и полученных данных была разработана гипотеза. Известно, что все БМ в организме человека являются двухслойными (БМ 1-го типа), за исключением капилляров почечного клубочка, где БМ трехслойная и клетки располагаются по обе стороны (БМ 2-го типа). Схожесть строения БМ брюшины и сосудов позволяет предложить объединенную модель повреждения сосудов и брюшины. Ответная реакция брюшины и сосудов на повреждения может быть одинаковой или близкой по своим проявлениям. Наблюдаемое усиление ангиогенной и пролиферативной активности в сосудах спаек брюшины свидетельствует о возможности объединения этих процессов за счет универсальности строения БМ брюшины и сосудов. БМ 1-го типа под действием повреждающих факторов — воспаления в 1-й группе больных и эктопического эндометрия при эндометриозе у больных 2-й группы могут трансформироваться в БМ, имеющую признаки 1-го и/или 2-го типа. Следовательно, спайки, как и эндометриоидные гетеротопии, име-

ют «эволюционный» признак, проявляющийся во времени от начала заболевания до его реализации [1]. Подобие БМ сосудов и брюшины объясняет рост и развитие спаек как ангиогенных образований, являющихся основой для динамических процессов заживления и ремоделирования, а не представляющих собой инертную фиброзную ткань. Полученные в ходе исследования данные подтверждают такое предположение, опубликованное нами в научной литературе [2, 6]. Существенную роль в образовании спаек и их «эволюционных» преобразованиях как ангиогенных образований оказывают состояние и патологическая активность поврежденных органов (сальпингит, оофорит, пиосальпинкс, сальпингоофорит) и тканей (эндометрит, эндометриоидные гетеротопии, эндометриоидные кисты) непосредственно или опосредованно через перитонеальную жидкость.

Таким образом, анализ результатов исследования пролиферативной активности в сосудах и процессов ангиогенеза в спайках брюшины малого таза показал, что у больных с воспалением и без эндометриоза наблюдаются наиболее выраженные изменения как на системном, так и на локальном уровне в сравнении с больными с эндометриозом и без воспаления. Существенное влияние на выраженность образования спаек оказывает перитонеальная жидкость, в которой обнаружены наиболее достоверно значимые ангиогенно зависимые изменения у больных с воспалением по отношению к больным с эндометриозом. В настоящем исследовании не проводились оценка и сравнение уровня воспаления в спай-

ках в этих группах, что будет предметом дальнейших исследований. Установленные изменения на системном (сыворотка крови), локальном (перитонеальная жидкость) и тканевом (спайки) уровнях сопровождаются снижением антиангиогенной активности. Выявленные различия в выраженности ангиогенеза и пролиферации в сосудах спаек малого таза следует, несомненно, учитывать как при разработке методов профилактики и лечения спаек, так и при выборе способов воздействия в зависимости от клинической ситуации. Совершенствование знаний о процессах, связанных с образованием спаек, позволяет осуществлять таргетный поиск методов и технологий для предотвращения их образования и повышения эффективности лечения больных.

Благодарности. Выражаем благодарность профессору Маттсу Оловссону и сотрудникам Отделения здоровья матери и ребенка университета Упсалы (Упсала, Швеция) за участие в обсуждениях и поддержку. Работа выполнена на основе инициативного, добровольного и двустороннего международного научного сотрудничества между профессором Владимиром Бурлевым (Российская Федерация) и профессором Маттсом Оловссоном (Швеция). Финансовая, научная, правовая и политическая помощь осуществлялась Шведской Королевской Академией наук, Шведским медицинским исследовательским советом (проект №8683), Университетом Упсалы (Швеция), Российской академией медицинских наук, Научным центром акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздравсоцразвития России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлев В.А. Проллиферативная и ангиогенная активность эндометриального и эктопического эндометрия у больных с перитонеальной формой эндометриоза. Пробл репрод 2006;1:78—87.
2. Бурлев В.А., Дубинская Е.Д., Гаспаров А.С. Перитонеальные спайки: от патогенеза до профилактики. Пробл репрод 2009;3:36—44.
3. Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Дубинская Е.Д. Ангиогенез эктопического эндометрия. Пробл репрод 2005;1:7—13.
4. Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Волков Н.И. и др. Плотность микрососудов и ангиогенная активность в эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза. Пробл репрод 2004;6:51—56.
5. Бурлев В.А., Лец Н.И. Роль брюшины в патогенезе наружно-генитального эндометриоза (обзор литературы). Пробл репрод 2001;1:25—29.
6. Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Бурлев А.В., Дубинская Е.Д. Тазовая и внетазовая брюшина: ангиогенная активность и апоптоз у больных с перитонеальной формой генитального эндометриоза. Пробл репрод 2010;4:7—15.
7. Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Шишканова О.А. Циклический ангиогенез эндометриального эндометрия. Пробл репрод 2006;6:22—30.
8. Биохимические основы патологических процессов. Под ред. Е.С. Северина, М: Медицина 2000;304.
9. Bourlev V., Larsson A., Olovsson M. Elevated levels of fibroblast growth factor-2 in serum from women with endometriosis. Am J Obstet Gynecol 2006;194:755—759.
10. Bourlev V., Pavlovitch S., Stygar D. et al. Different proliferative and apoptotic activity in peripheral versus central parts of human uterine leiomyomas. Gynecol Obstet Invest 2003;55:199—204.
11. Bourlev V., Ilyasova N., Adamyan L. et al. Signs of reduced angiogenic activity after surgical removal of deeply infiltrating endometriosis. Fertil Steril 2010;94:1:52—57.
12. Bugatti G., Boeckx W., Gruft L. et al. Experimental model for neoangiogenesis in adhesion formation. Hum Reprod 1995;10:2290—2294.
13. Chegini N., Kotseos K., Bennett B. et al. Matrix metalloproteinase (MMP-1) and tissue inhibitor of MMP in peritoneal fluids and sera and correlation with peritoneal adhesions. Fertil Steril 2001;76:1207—1211.
14. Ellis L.M., Liu W., Fan F. Role of angiogenesis inhibitors in cancer treatment. Oncology 2001;15:Suppl 8:39—46.
15. Fukaya T., Sugawara J., Yoshida H. Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis:

- original investigation and a review of literature. *Gynecol Obstet Inv* 1999;47:1:11—16.
16. *Harris S.G., Padilla J., Koumas L. et al.* Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23:3:144—150.
 17. *Khan K.N., Masuzaki H., Fujishita A. et al.* Regulation of hepatocyte growth factor by basal and stimulated macrophages in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:49—60.
 18. *Khan K.N., Masuzaki H., Fujishita A. et al.* Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:7:2004—2013.
 19. *Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K.* Effect of human seminal fluid on the growth of endometrial cells of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;149:2:204—209.
 20. *Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K.* Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol* 2008;60:5:383—404.
 21. *Khan K.N., Masuzaki H., Fujishita A.* Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:4:458—466.
 22. *Minaev S.V., Obozin V.S., Barnash G.M., Obedin A.N.* The influence of enzymes on adhesive processes in the abdominal cavity. *Eur J Pediatr Surg* 2009;19:6:380—383.
 23. *Molinas C.R., Binda M.M., Koninckx P.R.* Angiogenic factors in peritoneal adhesion formation. *Gynecol Surg* 2006;3:157—167.
 24. *Molinas C.R., Campo R., Dewerchin M.* Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum-enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in transgenic mice. *Fertil Steril* 2003;80:Suppl 2:803—811.
 25. *Pinsky D.J., Liao H., Lawson C.A. et al.* Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. *J Clin Inv* 1998;102:919—928.
 26. *Pugh C.W., Ratcliffe P.J.* Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677—684.
 27. *Routley C.E., Ashcroft G.S.* Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. *Wound Repair Reg* 2009;17:1:42—50.
 28. *Sharkey A.M., Day K. et al.* Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by Hypoxia. *JCE* 2000;1:1:402—409.
 29. *Yoshida S., Harada T., Mitsunari M.* Hepatocyte growth factor/Met system promotes endometrial and endometriotic stromal cell invasion via autocrine and paracrine pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2:823—832.
 30. *Zhang X.* Hepatocyte growth factor system in the mouse uterus: variation across the estrous cycle and regulation by 17-beta-estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 2010;82:6:1037—1048.