doi: 10.17116/repro201723161-69

Стресс-лимитирующие и стресс-реализующие системы эндометрия при эндометриозе: влияние лечения на экспрессию белков стресса и ангиогенез

Д.м.н., проф. В.А. БУРЛЕВ[1,2], врач, н.с. Н.А. ИЛЬЯСОВА[1,2]

[1]ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» (дир.— акад. РАН Г.Т. Сухин) Минздрава России, Москва, Россия; [2]Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Уппсала, Швеция

Цель исследования — изучить интенсивность экспрессии альфаВ-кристаллина, сосудисто-эндотелиального фактора роста АВ (СЭФР-А) и его рецептора (СЭФР Р1), плотности микрососудов в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза в структурах эутопического эндометрия в период «окна имплантации» и провести анализ этих данных в зависимости от наступления беременности до и после лечения.

Материал и методы. Иммуногистохимический метод был использован для исследования экспрессии альфаВ-кристаллина и ангиогенеза в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) использован для определения концентрации альфаВ-кристаллина, СЭФР-А, рСЭФР Р1 в сыворотке крови. Исследование крови и эндометрия проводилось до и после лечения. Наступление беременности у больных эндометриозом оценивали спустя 6 мес после окончания лечения. Иммуногистохимические данные и данные ИФА были сравнены у женщин с эндометриозом и наступившей и ненаступившей беременностью по отношению к здоровым.

Результаты. Полученные данные о содержании альфаВ-кристаллина в крови свидетельствуют о 22-кратном его увеличении у больных с перитонеальной формой эндометриоза и ненаступившей беременностью после лечения. Наиболее низкие его значения в крови отмечены в норме. Оценка экспрессии альфаВ-кристаллина в эутопическом эндометрии показала ее снижение в эпителии желез эутопического эндометрия у больных с эндометриозом и ненаступившей беременностью по отношению к больным с наступившей беременностью или здоровым женщинам. Уровень экспрессии альфаВ-кристаллина у больных с эндометриозом и наступившей беременностью был подобен таковому у здоровых женщин. Высокие или низкие значения уровня экспрессии альфаВ-кристаллина соответствовали шансам ненаступления беременности. Содержание СЭФР-А и СЭФР Р1 сопряжено с уровнем альфаВ-кристаллина. Превышение в 22 раза содержания альфаВ-кристаллина в крови у больных с ненаступившей беременностью после лечения и одновременное снижение экспрессии этого показателя в эндометрии свидетельствуют о том, что эти данные могут использоваться для характеристики эндотипа.

Выводы. Определение экспрессии альфаВ-кристаллина у больных с эндометриозом может быть использовано для характеристики эндотипа.

Ключевые слова: эндометрий, бесплодие, эутопический эндометрий, альфаВ-кристаллин, наступление беременности.

Stress-limiting and stress-realizing systems in endometrium of endometriosis: effects of treatment on the expression of stress proteins and angiogenesis

V.A. BURLEV[1,2], N.A. ILYASOVA[1,2]

[1]Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» Ministry of Healthcare of the Russia (director — G.T. Sukhikh, MD, PhD, professor, academician of Russian Academy); [2]Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden

Objective. To examine the expression intensity of alphaB-crystallin, VEGF-A, VEGFR1, microvessel density in healthy women and in patients with peritoneal endometriosis in eutopic endometrium during the implantation window and to analyze the pregnancy outcome before and after the treatment.

Method. Immunohistochemistry was used to study the expression of alphaB-crystallin and angiogenesis in eutopic endometrium in women with endometriosis. ELISA method was used to determine the concentration of alphaB-crystallin, VEGF-A, sVEGFR1 in serum. The study was carried out blood and endometrium before and after treatment. Pregnancy outcome in patients with endometriosis was evaluated in 6 months after the treatment. Immunohistochemical data and ELISA data were compared in women with endometriosis with and without pregnancy and healthy women.

Results. AlphaB-crystallin content in the blood showed its 22 fold increase in patients with peritoneal endometriosis and pregnancy after treatment. The lowest values of alphaB-crystallin in the blood observed in healthy women. Expression levels of alphaB-crystallin in the eutopic endometrium showed that it was reduced in the epithelium of eutopic endometrial glands in patients with endometriosis and without pregnancy compared to the healthy women with pregnancy. Expression levels of alphaB-crystallin in patients with endometriosis and pregnancy were similar to those in healthy women. The content and the expression of VEGF-A and sVEGFR1 are associated with alphaB-crystallin.

Conclusion. AlphaB-crystallin expression in patients with endometriosis can be used to assess endotype.

Keywords: endometriosis, infertility, eutopic endometrium, alphaB-crystallin, outcome pregnancy.

© В.А. Бурлев, Н.А. Ильясова, 2017

e-mail: vbourlev@mail.ru

Одной из нерешенных проблем эндометриоза является разнородность механизмов патогенеза в их ассоциации с эндотипами, что затрудняет персонализацию терапии для достижения наступления беременности или в процессе прогрессирования заболевания и перехода в инфильтративную форму. В основе этих представлений лежит фенотип эндометриоза как совокупность клинических и физиологических признаков. Получение новых знаний на молекулярном уровне свидетельствует о наличии молекулярных фенотипов, которые включают связанные с клиническими проявлениями патобиологические характеристики и маркеры. При наличии определенного патобиологического маркера, который является субстратом или основанием для патогенетической терапии, такое состояние следует называть эндотипом [11, 13]. До настоящего времени для эндометриоза эндотипы не установлены. Несомненно, что в будущем в терапии эндометриоза эндотипы будут играть решающую роль, определяя стратегию и эффективность лечения.

Одним из подходов к выделению эндотипов является, на наш взгляд, изучение стресс-лимитирующих систем. Это связано с тем, что увеличение эффективности стресс-лимитирующих систем при стрессорных повреждениях дает адаптированному организму преимущества и защитное действие метаболитов. В то же время стресс-реакции и превращение их в чрезмерные или низкие по интенсивности и длительности могут из звена адаптации трансформироваться в звено патогенеза, играя важную и решающую роль в возникновении эндогенных заболеваний и, следовательно, профилактика и терапия таких состояний представляют в настоящее время нерешенную задачу [12].

Многие годы изучение этой проблемы носило схоластический характер с привлечением косвенных умозаключений, а не прямых доказательств и свидетельств объективного характера. Стрессорные ситуации в организме, несомненно, многообразны и не до конца изучены, в том числе и с позиций роли белков теплового шока (БТШ). Способность этих белков не допускать денатурацию и сохранять функциональную активность белковых субстратов выдвигает их на первое место среди многих систем, обеспечивающих полноценную жизнедеятельность клеточных организаций. У всех БТШ есть одна общая функция — защита клетки от неблагоприятных воздействий, хотя механизмы этой защиты различны, включая непосредственное участие всех БТШ в защите клеточных белков от разных видов денатурации, окисления, стресс-индуцированного апоптоза и стабилизации клеточных структур.

Известно, что БТШ синтезируются в ответ на стресс у всех видов организмов — от бактерии до человека. Их спектры видоспецифичны, однако у каждого вида можно выделить три группы белков, различающихся по молекулярной массе и их функциям в клетке: БТШ90 — группа белков, которые у дрожжей имеют молекулярную массу 104 кДа, у млекопитающих — 90 кД, а у Drosophila — 83 кД; БТШ70 — семейство белков с молекулярной массой 70 кД; БТШ — малые с молекулярной массой от 15 до 30 кД, включая α- и β-кристаллины млекопитающих [7].

Проведенные нами исследования [7, 19] по изучению содержания альфаВ-кристаллина в крови и перитонеальной жидкости свидетельствуют о 8- и 12-кратном (соответственно) увеличении этого показателя до лечения у больных с перитонеальной формой эндометриоза и ненаступлением беременности. Оценка экспрессии альфаВ-кристаллина в эутопическом эндометрии показала ее снижение в эпителии желез эутопического эндометрия у больных с эндометриозом и ненаступившей беременностью по отношению к женщинам с наступившей беременностью или здоровым женщинам. Уровень экспрессии альфаВ-кристаллина у больных с эндометриозом и наступившей беременностью был подобен таковому и у здоровых женщин. Высокий или низкий уровень экспрессии альфаВ-кристаллина соответствовал шансам ненаступления беременности. Данные в эутопическом эндометрии согласуются с результатами в эктопическом эндометрии. Проведенная оценка уровня экспрессии альфаВ-кристаллина свидетельствует о том, что данный показатель может использоваться как биомаркер эндометриальной восприимчивости, а определение экспрессии альфаВ-кристаллина является прогностически значимым для рецептивности эутопического эндометрия и наступления беременности у больных с эндометриозом.

Исследований, связанных с изучением роли альфаВ-кристаллина в наступлении беременности у больных с перитонеальной формой эндометриоза до и после лечения, в доступной литературе нам не встретилось.

Цель исследования — изучить интенсивность экспрессии альфаВ-кристаллина, сосудисто-эндотелиального фактора роста (СЭФР-А) и его рецептора (СЭФР Р-1), плотности микрососудов (ПМС) в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза в структурах эутопического эндометрия в период «окна имплантации» и провести анализ этих данных в зависимости от наступления беременности до и после лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 65 больных с бесплодием и перитонеальной формой эндометриоза, диагностированного во время лапароскопии. Рандомизация и подбор больных осуществлялись совместно с д.м.н. Т.Е. Самойловой, к.м.н. М.А. Шорохо-

вой, д.м.н. Е.Д. Дубинской, д.м.н., проф. А.С. Гаспаровым, к.м.н. М.Ф. Дорфманом, врачом О.М. Векилян. Клиническая характеристика больных и дизайн исследования были представлены нами ранее [7—9, 20]. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Информированное согласие на участие больных в исследовании было получено от всех пациенток.

Критерии включения в исследование: женщины репродуктивного возраста (от 27 до 37 лет); перитонеальная форма эндометриоза I—III стадии, согласно классификации Американского общества репродуктивной медицины [22], бесплодие, отсутствие приема других гормональных препаратов для лечения наружного генитального эндометриоза на протяжении 3 мес перед началом исследования. Клинические проявления наружного генитального эндометриоза: нарушение менструальной функции (мено- и метроррагии), боли в нижних отделах живота и поясничной области различной интенсивности, диспареуния, бесплодие.

Критерии исключения: возраст пациентки старше 37 лет, наружный генитальный эндометриоз IV стадии, аллергические реакции на гозерелина ацетат, беременность, лактация, средняя и тяжелая экстрагенитальная патология.

Всем пациенткам были выполнены оперативные вмешательства путем лапароскопии с использованием оборудования фирмы «Karl Stors» (Германия): иссечение и/или коагуляция очагов наружного генитального эндометриоза, разделение спаек в области малого таза, сальпингоовариолизис. В процессе операции с целью исключения внутриматочной патологии производилась жидкостная гистероскопия с помощью жесткого гистероскопа с микрогистероскопической насадкой и наружным диаметром 88 мм («Karl Stors», Германия), а также диагностическое выскабливание слизистой матки.

У больных перед оперативным лечением (1-я группа) был проведен первый забор крови для лабораторных исследований. В ходе хирургической операции выполнено раздельное диагностическое выскабливание полости матки — первая биопсия эндометрия. После хирургического лечения больные получали гозерелина ацетат в течение 3 мес. По окончании гормонального лечения 24 больные продолжили наблюдение и 41 отказалась от дальнейшего наблюдения. Учитывая высокую вариабельность социального статуса больных с эндометриозом, включенных в исследование, и изменение социального поведения на этапах наблюдения и лечения, не оказывалось воздействие на выбор больных закончить или продолжить наблюдение.

Пациентки, которым планировалась вторая биопсия эндометрия (2-я группа, n=24), ожидали нормализации менструального цикла и предохранялись от наступления беременности барьерным методом в течение 3 мес. По окончании срока ожидания им была проведена пайпель-биопсия с последующим патоморфологическим анализом для лабораторного контроля и верификации исходов хирургического и гормонального лечения и забор крови для лабораторного контроля. После этого они наблюдались в течение 6 мес для диагностики наступления беременности. Из 24 женщин 2-й группы у 10 (41,7%) наступила беременность, а у 14 (58,3%) беременность не наступила.

Контрольную группу составили 20 пациенток, которым производилась стерилизация с использованием лапароскопического доступа. Эндометриоз у женщин этой группы исключался после тщательного исследования висцеральной и париетальной брюшины на наличие гетеротопических эндометриоидных очагов. Ультразвуковое и гистероскопическое исследования матки позволили исключить у пациенток этой группы наличие аденомиоза.

Ультразвуковое исследование органов малого таза у больных проводилось до оперативного лечения и после окончания курса терапии с помощью аппарата Aloka SSD-2000 при использовании трансвагинального датчика с частотой 7,5 МГц.

Кровь для исследования получали из кубитальной вены в стандартных условиях у всех пациенток утром до операции. Образцы сыворотки и перитонеальной жидкости хранились при −70 °С до момента исследования. Все образцы биопсии эндометрия были получены в LH+7 (±2), исходя из ежемесячной оценки фазы менструального цикла и дня менструального цикла образцов эндометрия, согласно стандартным критериям.

Иммуногистохимический анализ. Образцы тканей эутопического эндометрия были разделены на две части, одна из них направлялась для морфологического исследования, вторая — подвергалась консервированию в растворе формалина для иммуногистохимического анализа. По данным патоморфологического исследования, все полученные образцы представляли собой ткань эндометрия.

Оценка экспрессии альфаВ-кристаллина и соответствующее распределение по клеточным элементам выполнены при использовании полуколичественной системы гистологической шкалы (HSCORE) [7, 19]: $\Sigma\ Pi(i+1)$, где i — интенсивность окрашивания (от 0 — слабое окрашивание до 3 — самое интенсивное окрашивание), Pi — процент окрашивания эпителиальных клеток для каждой интенсивности от 0 до 100%. Доказано, что система HSCORE является надежным инструментом оценки экспрессии эндометриальных белков по отношению к количественному определению методом обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции.

Анализ экспрессии СЭФР-А и его рецептора СЭФР Р1 в эутопическом и эктопическом эндоме-

Таблица 1. **Содержание в сыворотке крови альфаВ-кристаллина, СЭФР-А, рСЭФР Р1 в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза в зависимости от наступления (ЭБ+) или ненаступления беременности (ЭБ–) до и после лечения (*M±SD*)**

Параметр	1-я группа (*n*=65)		2-я группа (*n*=24)		Норма (*n*=23)	*p*<0,05
	ЭБ+ (*n*=28)	ЭБ– (*n*=37)	ЭБ+ (*n*=10)	ЭБ– (*n*=14)		
АльфаВ-кристаллин, нг/мл	4,6±2,07	39,9±33,8	14,6±2,07	76,1±27,4	3,4±2,9	1–2, 3—4 1–3,4
СЭФР-А, нг/мл	282,7±85,6	274,8±70,3	391,3±66,2	438±45,9	107±17,5	5—1,2,3,4 4—1,2,3 3—1,2,4
рСЭФР Р1, пг/мл	147,3±34,5	131,4±38,1	177±33,6	142±52,8	37,3±9,3	5—1,2,3,4

Примечание. Здесь и в табл. 2: расчет статистической достоверности различий проводился по методу Манна—Уитни.

трии проводился с использованием иммуногистохимического метода в условиях стандартного протокола, как это было описано нами ранее [2, 3, 14]. Результаты учитывали с помощью цифровой обработки данных и программы Image-Pro Plus (версия 4.0 for Windows) и выражали в условных единицах (усл. ед.): 0 усл. ед. — отсутствие реакции, 1 усл. ед. — от 0,1 до 33,3%, 2 усл. ед. — от 33,3 до 66,6%, 3 усл. ед. — от 66,6 до 99,9%. Процент реакции вычислялся от максимального значения экспрессии. Для визуализации использовали моноклональные антитела к альфаВ-кристаллину, СЭФР-А, СЭФР Р1 («DAKO A/S», Дания).

Определение плотности микрососудов (ПМС) проводили, как было описано ранее [7, 8] в стандартных условиях с использованием иммуногистохимического метода и последующей цифровой обработкой данных с помощью программы Image-Pro Plus (версия 4.0 for Windows). Все результаты выражали в усл. ед. в 1 мм². Для визуализации микрососудов использовали моноклональные антитела к CD31 («DAKO A/S», Дания).

Анализ сыворотки крови. Анализ содержания альфаВ-кристаллина, СЭФР-А, растворимого рецептора 1 к СЭФР (рСЭФР Р1) в сыворотке крови проводился с помощью иммуноферментного анализа с применением стандартных наборов (R&D systems, США). Проведение реакции и расчет результатов осуществляли в стандартных условиях, согласно рекомендациям производителя.

Статистический анализ. Для анализа результатов использовали статистические компьютерные программы IBM SPSS Statistics 20. Результаты исследования представлены как средние±стандартное отклонение (*M*±*SD*). В зависимости от конкретных условий применялись: ANOVA, критерий Вилкоксона, *U*-критерий Манна—Уитни, критерий Краскала—Уоллиса. Различия между группами считались достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика больных. Клинические данные у больных с перитонеальной формой эндометриоза с наступившей и ненаступившей беременностью, обследованных на этапе, предшествующем началу лечения (оперативное лечение и гормональное лечение), не имели статистически значимых различий [7—9, 19, 20].

Содержание в крови альфаВ-кристаллина, СЭФР-А, рСЭФР Р1 в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза в зависимости от наступления или ненаступления беременности до и после лечения. Как следует из **табл. 1**, статистически значимое повышение содержания альфаВ-кристаллина установлено в крови у больных с ненаступившей беременностью как в 1-й группе (до лечения), так и во 2-й группе (после лечения). Однако во 2-й группе эти значения были более высокими. Так, содержание альфаВ-кристаллина в крови было повышено в 22 раза по отношению к норме (76,1 нг/мл против 3,4 нг/мл) и в 5 раз по отношению к больным с наступившей беременностью (76,1 нг/мл против 14,6 нг/мл). Наиболее низкие значения альфаВ-кристаллина в крови отмечены в норме. Анализ содержания СЭФР-А в крови в зависимости от наступления беременности до и после лечения показал наличие статистически значимых различий между нормой и больными эндометриозом. Содержание СЭФР-А после лечения у больных с ненаступившей беременностью в 4 раза было выше нормы (438 нг/мл против 107 нг/мл) и статистически значимо по отношению к больным с наступившей беременностью. В группе больных до лечения таких различий не наблюдалось. Содержание рСЭФР Р1 в крови показало достоверно значимые различия в сторону увеличения во всех группах по отношению к нормативным значениям, но без различий в зависимости от наступления беременности или лечения.

Экспрессия альфаВ-кристаллина и показатели ангиогенеза в середине секреторной фазы эутопического эндометрия в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза в зависимости от наступления или ненаступления беременности до и после лечения. Из **табл. 2** следует, что экспрессия альфаВ-кристаллина в эутопическом эндометрии выявляется только в цитозоле эпителия желез в норме, у больных с наступившей и ненаступившей беременностью до и после

***Таблица 2*. Экспрессия альфаВ-кристаллина и показателей ангиогенеза в эпителии желез в середине секреторной фазы эутопического эндометрия в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза в зависимости от наступления (ЭБ+) или ненаступления (ЭБ–) беременности до и после лечения (*M±SD*)**

Параметр	1-я группа (*n*=65)		2-я группа (*n*=24)		Норма (*n*=23)	*p*<0,05
	ЭБ+ (*n*=28)	ЭБ– (*n*=37)	ЭБ+ (*n*=10)	ЭБ– (*n*=14)		
АльфаВ-кристаллин (HSCORE)	1,6±0,4	1,1±0,3	2,1±0,2	0,6±0,3	1,8±0,2	1—2, 3—4 5—2,3,4
СЭФР-А (SCORE)	2,2±0,5	2,2±0,4	2,3±0,3	2,6±0,2	2,3±0,3	4 — 1,2,3,5
СЭФР Р1 (SCORE)	1,8±0,4	1,55±0,3	1,7±0,1	1,3±0,2	2,0±0,3	5 — 2,4 3—4
ПСМ в 1 мм^2	280±45	327±25	310±31	351±37	218±59	5 — 1,2,3,4 4—1,3

лечения. В поверхностном эпителии и в клетках стромы такой экспрессии не установлено. Отмечается статистически значимое снижение экспрессии альфаВ-кристаллина у больных с эндометриозом, у которых после лечения не наступила беременность. Наблюдается статистически значимое увеличение экспрессии альфаВ-кристаллина у больных после лечения при наступлении беременности. Различий в экспрессии альфаВ-кристаллина в норме и у больных с наступившей беременностью не выявлено. Отсутствовали различия в экспрессии СЭФР-А в изученных группах, однако она была значительно в 3 раза снижена по отношению к норме у больных во 2-й группе с ненаступившей беременностью. Экспрессия СЭФР Р1 была достоверно снижена в группе больных с ненаступившей беременностью по отношению к контролю и к группе больных с наступившей беременностью. В то же время ПМС в 1 мм^2 была достоверно выше у больных с ненаступившей беременностью по отношению к норме и к группе больных с наступившей беременностью.

Распределение больных в зависимости от интенсивности экспрессии альфаВ-кристаллина в эпителии желез эутопического эндометрия в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза с наступившей и ненаступившей беременностью до и после лечения. Основываясь на том, что экспрессия альфаВ-кристаллина в эпителии желез эутопического эндометрия учитывалась полуколичественным методом (HSCORE), приводящим к вариабельности результатов, было проведено распределение больных в группах в зависимости от интенсивности этой экспрессии. Как следует из **табл. 3**, в норме 91,3% женщин имеют среднюю интенсивность экспрессии (HSCORE 1,1—2,0) и только у 4,35 и 4,35% наблюдается соответственно сильная (HSCORE 2,1—3,0) и низкая экспрессия (HSCORE 0,1—1,0). В случае наступления беременности у больных с перитонеальной формой эндометриоза как до, так и после лечения эти показатели статистически значимо не отличались от контрольных значений. У больных с ненаступившей беременностью как до, так и после лечения наблюдались статистически значимые различия в распределении экспрессии альфаВ-кристаллина по отношению к контрольной группе и больным с наступившей беременностью. Средние значения экспрессии у них (HSCORE 1,1—2,0) наблюдались у 10,8% до лечения и у 21,4% после лечения (в норме у 91,3% женщин), сильная экспрессия (HSCORE 2,1—3,0) — у 37,8% и 14,3% соответственно (в норме у 4,35%), низкая экспрессия (HSCORE 0,1—1,0) — у 51,4 и 64,3% соответственно (в норме у 4,35%). Следовательно, для нормы и больных с наступившей беременностью характерна средняя экспрессия альфаВ-кристаллина, а для больных с ненаступившей беременностью низкая экспрессия.

Сравнительная фенотипическая характеристика экспрессии альфаВ-кристаллина, ПМС, СЭФР-А, СЭФР Р1, ЭР, ЭР-α, ЭР-β, ПР-А+В, ПР-В, IL-1RI, IL-6-Rα, LIF, LIF-Rα, gp130, SOCS1 в эндометрии у больных с эндометриозом и бесплодием в зависимости от наступления или ненаступления беременности до и после лечения. В течение 2010—2014 гг. нами проведены исследования по теме «Изучение ассоциации между эндометриальными маркерами и фертильностью у женщин с и без эндометриоза» (учетный номер в НТИМИ №0465/03/10) между ФГБ НЦАГИП им. В.И. Кулакова Минздрава России и Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Уппсала, Швеция по поиску молекулярных предикторов наступления или ненаступления беременности у больных с бесплодием и перитонеальной формой эндометриоза до и после лечения [4—7, 9, 19, 20]. В **табл. 4** приведены диагностические данные о 16 эутопических эндометриальных иммуногистохимических предикторах наступления или ненаступления беременности у больных с перитонеальной формой эндометриоза до и после лечения. Показатель 1 (альфаВ-кристаллин) характерен для стресса, показатели 2—4 (ПМС, СЭФР-А, СЭФР Р1) — для ангиогенеза, показатели 6—10 (ЭР, ЭР-α, ЭР-β, ПР-А+В, ПР-В) — рецепторы к стероидам, показатели 11—16 (IL-1RI, IL-6-Rα, LIF, LIF-Rα, gp130, SOCS1) — интерлейкины. Приведенные показатели охватывают наиболее значимые процессы, которые могут участвовать в формировании бесплодия, обусловленного недостаточной функциональной активностью эутопического эндометрия. Характерными нарушениями в эндометрии для ненаступления беременности являются:

Таблица 3. **Распределение больных в зависимости от интенсивности экспрессии альфаВ-кристаллина в эпителии желез эутопического эндометрия в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза с наступившей (ЭБ+) и ненаступившей беременностью (ЭБ–) до и после лечения (HSCORE), абс. (%)**

HSCORE	1-я группа (n=65)		2-я группа (n=24)		Норма (n=23)	p<0,05
	ЭБ+ (n=28)	ЭБ– (n=37)	ЭБ+ (n=10)	ЭБ– (n=14)		
Сильная (HSCORE 2,1—3,0)	2 (7,2)	14 (37,8)	1 (10,0)	2 (14,3)	1 (4,35)	1,3,5—2,4
Средняя (HSCORE 1,1—2,0)	23 (82,1)	4 (10,8)	8 (80,0)	3 (21,4)	21 (91,3)	1,3,5—2,4
Низкая (HSCORE 0,1—1,0)	3 (10,7)	19 (51,4)	1 (10,0)	9 (64,3)	1 (4,35)	1,3,5—2,4
Всего	28 (100)	37 (100)	10 (100)	14 (100)	23 (100)	

Примечание. Расчет значений статистически значимых различий (p) осуществлялся по методу Крускала—Уоллиса χ^2-тесту (сравнение показателей в трех группах), попарное сравнение с использованием критерия Манна—Уитни.

Таблица 4. **Сравнительная фенотипическая характеристика экспрессии альфаВ-кристаллина, ПМС (CD31), СЭФР-А, СЭФР Р1, ЭР, ЭР- α, ЭР- β, ПР-А+В, ПР-В, IL-1RI, IL6-Rα, LIF, LIF-Rα, gp130, SOCS1 в эндометрии у больных с эндометриозом и с бесплодием до и после лечения [4—7, 9, 19, 20]**

№	Показатель	Бесплодие при эндометриозе			
		наступление беременности		ненаступление беременности	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
1	АльфаВ-кристаллин	Умеренная	Умеренная	Низкая	Низкая
2	ПМС (CD31)	«	«	Высокая	Высокая
3	СЭФР-А	«	«	Умеренная	Умеренная
4	СЭФР Р1	«	«	Низкая	Низкая
6	ЭР	«	«	Умеренная	Умеренная
7	ЭР-α	«	«	Высокая	Высокая
8	ЭР-β	«	«	Умеренная	Умеренная
9	ПР-А+В	«	«	Низкая	Низкая
10	ПР-В	«	«	«	«
11	IL-1RI	«	«	«	«
12	IL6-Rα	«	«	Умеренная	Умеренная
13	LIF	«	«	Низкая	Низкая
14	LIF-Rα	«	«	«	«
15	gp130	«	«	«	«
16	SOCS1	«	«	«	«

— низкий уровень экспрессии белков стресса (альфаВ-кристаллин);

— высокая активность ангиогенеза (ПМС);

— высокая активность рецепторов эстрадиола (ЭР-α) и низкая активность рецепторов прогестерона (ПР-А+В, ПР-В);

— низкая активность рецептора интерлейкина IL-1 (IL-1RI);

— низкая активность интерлейкинов, приводящая к нарушению сигнального пути LIF (LIF, LIF-Rα, gp130, SOCS1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что образовавшийся в процессе селекции клан животных, способных к одомашниванию, обладает более мощными стресс-реализующими системами и соответственно более эффективными стресс-лимитирующими системами, которые ограничивают гормональный ответ на стрессоры и с большой долей вероятности могут подавлять страх и агрессивное поведение при контактах с человеком. Разумеется, это не означает, что стресс-лимитирующие системы сами по себе могут определять поведение или выживание, но эти системы образуют важные звенья сложных поведенческих доминант. От состояния этих звеньев в высокой степени зависит эффективность индивидуальной адаптации организма к многообразным биологическим и социальным факторам среды и повышение шансов организма на выживание в процессе естественного отбора и овладения средой [12].

Стресс-лимитирующие системы участвуют в регуляции функциональной активности эндометрия, нацеленной на подготовку ткани для нидации бластоцисты и наступления беременности [7, 19]. К этой системе следует отнести альфаВ-кристаллин, а к стресс-реализующими системам — факторы роста сосудов (ангиогенез), рецепторы к стероидным и пептидным гормонам, факторы пролиферации и апоптоза, про- и антиинфламаторные факторы, интерлейкины [4—7, 9, 19, 20]. Несомненно, что инте-

гративные процессы в эндометрии в связи с наступлением беременности связаны с этими стресс-зависимыми системами. Однако при различных патологических состояниях, сопровождающихся бесплодием, могут наблюдаться различные варианты или эндотипы, которые имеют характерные особенности и, возможно, собственные механизмы коррекции. Наибольшее распространение при эндометриозе получила комбинированная терапия — сочетание хирургического лечения с последующим применением агонистов или антагонистов ГнРГ, но, конечно, без учета эндотипа [10, 21, 23]. В то же время анализ эффективности лечения боли и/или бесплодия при эндометриозе показал низкое качество доказательств лапароскопического удаления гетеротопий и гормонального лечения. Кроме этого, все решения относительно лечения боли и репродуктивной функции, связанные с эндометриозом, должны быть основаны на подробном обсуждении с пациенткой всех имеющихся вариантов лечения [17]. Следовательно, роль эндотипов при эндометриозе тесно связана с выбором тактики лечения и ее эффективностью.

В ходе предыдущих исследований нами показана роль альфаВ-кристаллина в прямой модуляции ангиогенеза в эутопическом и эктопическом эндометрии при перитонеальной форме эндометриоза и бесплодии [7, 19]. Аналогичные данные были получены A. Dimberg и соавт. [16] относительно роли альфаВ-кристаллина при опухолевом ангиогенезе.

В дополнение к этому альфаВ-кристаллин в эутопическом эндометрии можно рассматривать и как универсальный модулятор для поддержки ядерных и мембранных рецепторов к прогестерону и эстрадиолу, полноценного проявления функции про- и антиинфламаторных белков, пролиферации и апоптоза, синхронизации процессов между эндометрием и эмбрионом. Показано, что нелинейный характер зависимости относительной начальной скорости агрегации от отношения молярных концентраций альфаВ-кристаллин/белок-мишень обусловлен динамической четвертичной структурой альфаВ-кристаллина. Установлено, что снижение антиагрегационной активности альфаВ-кристаллина при облучении УФ-светом происходит в результате необратимой денатурации белковых молекул и образования межсубъединичных сшивок [1]. Недостаток и избыточная продукция альфаВ-кристаллина приводят к конфликту интересов различных сигнальных путей и неоправданной денатурации белков [15], их повреждению и, как следствие, к снижению функциональной активности эндометрия. Следовательно, альфаВ-кристаллин в норме и при эндометриозе является составной частью стресс-лимитирующей системы эутопического эндометрия и может рассматриваться как соответствующий маркер. Получение лекарственных субстанций на основе альфаВ-кристаллина [18] и их будущая доказанная терапевтическая эффективность позволят выделить соответствующий эндотип. Наличие эндотипа, т.е. фенотипического признака, соотнесенного с альфаВ-кристаллином и связанного с ним лекарственного препарата, будет весьма перспективным направлением для лечения эндометриоза.

Проведенная в настоящем исследовании оценка экспрессии альфаВ-кристаллина в эутопическом эндометрии и в крови до и после лечения у больных с перитонеальной формой эндометриоза показала статистически значимое повышение его содержания в крови у больных с ненаступившей беременностью как до, так и после лечения по отношению к норме. После лечения содержание альфаВ-кристаллина в крови при ненаступившей беременности было повышено в 22 раза по отношению к норме и в 5 раз по отношению к больным с наступившей беременностью. Наиболее низкие его значения в крови отмечены в норме. Содержание СЭФР-А в крови в зависимости от наступления беременности до и после лечения показало наличие статистически значимых различий между нормой и данными у больных эндометриозом. Содержание СЭФР-А после лечения у больных с ненаступившей беременностью в 4 раза было выше, чем в норме, и статистически значимо по отношению к больным с наступившей беременностью. В группе больных до лечения таких различий не наблюдалось. Содержание рСЭФР Р1 в крови достоверно не различалось между больными с наступившей и ненаступившей беременностью, но было увеличено во всех группах по отношению к нормативным значениям.

Статистически значимое снижение экспрессии альфаВ-кристаллина в эутопическом эндометрии отмечается у больных с эндометриозом, у которых после лечения не наступила беременность. В то же время установлено статистически значимое увеличение экспрессии альфаВ-кристаллина во 2-й группе после лечения и наступившей беременностью. Экспрессия СЭФР-А в эндометрии была значительно (в 3 раза) снижена по отношению к норме во 2-й группе больных с ненаступившей беременностью.

Анализ распределения больных в зависимости от интенсивности экспрессии альфаВ-кристаллина в эпителии желез эутопического эндометрия в норме и у больных с перитонеальной формой эндометриоза с наступившей и ненаступившей беременностью до и после лечения показал, что средние значения экспрессии при ненаступившей беременности (HSCORE 1,1—2,0) наблюдались у 10,85% до лечения и 21,4% после лечения (в норме у 91,3% женщин), сильная экспрессия (HSCORE 2,1—3,0) — у 37,81 и 14,3% после лечения (в норме у 4,35%), низкая экспрессия (HSCORE 0,1—1,0) — у 51,4 и 64,3% соответственно (в норме у 4,35%). Следовательно, для нормы и больных с наступившей беременностью

характерна средняя экспрессия альфаВ-кристаллина, а для больных после лечения с ненаступившей беременностью — низкая экспрессия.

На основании проведенных исследований получены диагностические данные о 16 эутопических эндометриальных иммуногистохимических предикторах наступления или ненаступления беременности у больных с перитонеальной формой эндометриоза до и после лечения, что свидетельствует о наличии фенотипических различий между группами. У больных с наступившей беременностью отсутствуют фенотипические различия как до, так и после лечения и они соответствуют нормативным значениям. У больных с ненаступившей беременностью наблюдается повышение экспрессии ПМС (CD31), ЭР-α и снижение экспрессии альфаВ-кристаллина, СЭФР Р1, ПР-А+В, ПР-В по отношению к нормативным значениям как до, так и после лечения. Лечение не оказывает влияния на фенотипические свойства эндометрия, и оно не связано с эндотипами.

Следовательно, при эндометриозе после лечения и при ненаступлении беременности наблюдается преобладание стресс-лимитирующей активности в крови (альфаВ-кристаллин) и снижение ее в эндометрии с одновременным нарастанием активности стресс-реализующей системы (увеличение плотности микрососудов). Снижение стресс-лимитирующей активности в эндометрии ограничивает гормональный ответ ткани на стрессоры (снижение экспрессии ПР-А+В, ПР-В, IL-1RI, LIF, LIF-Rα, gp130, SOCS1), и в конечном счете наблюдается подавление наступления беременности.

Таким образом, проведенные исследования по изучению содержания альфаВ-кристаллина в крови свидетельствуют о 22-кратном его увеличении у больных с перитонеальной формой эндометриоза и ненаступлением беременности после лечения. Наиболее низкие значения альфаВ-кристаллина в крови отмечены в норме. Оценка экспрессии альфаВ-кристаллина в эутопическом эндометрии показала ее снижение в эпителии желез эутопического эндометрия у больных с эндометриозом и ненаступившей беременностью по отношению к больным с наступившей беременностью или здоровым женщинам. Уровень экспрессии альфаВ-кристаллина у больных с эндометриозом и наступившей беременностью был подобен таковому у здоровых женщин. Высокие или низкие значения уровня экспрессии альфаВ-кристаллина соответствовали шансам ненаступления беременности. Содержание и экспрессия СЭФР-А и СЭФР Р1 сопряжены с уровнем альфаВ-кристаллина. Превышение в 22 раза содержания альфаВ-кристаллина в крови у больных с ненаступившей беременностью после лечения и одновременное снижение экспрессии этого показателя в эндометрии свидетельствуют о том, что эти данные могут использоваться для характеристики эндотипа. Разработка фармакологических препаратов на основе альфаВ-кристаллина [18] позволит для больных с перитонеальной формой эндометриоза соотносить эндотип к патогенетически обоснованному лечению.

Благодарности. Выражаем благодарность professor Matts Olovsson, Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Уппсала, Швеция за участие в обсуждениях и поддержку. Работа выполнена по теме «Изучение ассоциации между эндометриальными маркерами и фертильностью у женщин с и без эндометриоза» (учетный номер в НТИМИ №0465/03/10). Финансовая, научная, правовая и политическая поддержка осуществлялась Шведской королевской академией наук, Шведским медицинским исследовательским советом (гранд №8683), Фондом планирования семьи в Уппсале, Университетом Уппсалы, Швеция, ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинаталогии им. В.И. Кулакова», Минздрава России и Минздравом России.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борзова В.А. *Механизмы защитного действия шаперонов при агрегации белков*: Дисс. ... канд. биол. наук. 2016;181.
2. Бурлев В.А. Пролиферативная и ангиогенная активность эутопического и эктопического эндометрия у больных с перитонеальной формой эндометриоза. *Проблемы репродукции*. 2006;1:78-87.
3. Бурлев В.А. Аутопаракринные нарушения регуляции ангиогенеза при пролиферативных формах заболеваний женской репродуктивной системы. *Акушерство и гинекология*. 2006;3: 34-40.
4. Бурлев В.А. Роль растворимых и клеточных селектинов в наступлении беременности при лиганд-рецепторных взаимодействиях эмбриона и эндометрия. *Проблемы репродукции*. 2014;5:66-72.
5. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Плотность нервных волокон и экспрессия ядерных изоформ рецепторов эстрогенов и прогестерона в эутопическом эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза: влияние на наступление беременности. *Проблемы репродукции*. 2014;6:61-69.
doi: 10.17116/repro201420661-69
6. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Изменения сигнальных путей LIF и IL-1 у больных с перитонеальной формой эндометриоза и бесплодием. *Проблемы репродукции*. 2015;4:99-109.
doi: 10.17116/repro201521499-109
7. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Экспрессия alphaB-crystallin в эутопическом и эктопическом эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза: наступление беременности. *Проблемы репродукции*. 2016;1:12-19.

doi: 10.17116/repro201622112-19

8. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Особенности сигнального пути LIF/LIFR/gp130/SOCS1 на фоне лечения у больных с перитонеальной формой генитального эндометриоза и бесплодием. *Проблемы репродукции*. 2016;2:24-32.

   doi: 10.17116/repro201622224-32

9. Бурлев В.А., Ильясова Н.А. Профиль гормонов и экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в эндометрии у больных с эндометриозом и бесплодием на фоне лечения. *Проблемы репродукции*. 2016;22(4):66-75.

   doi: 10.17116/repro201622466-75

10. Бурлев В.А., Шорохова М.А., Самойлова Т.Е. Современные принципы патогенетического лечения эндометриоза. *Consilium Medicum*. 2007;9(6):8-12.

11. Курбачева О.М., Павлова К.С. Фенотипы и эндотипы бронхиальной астмы: от патогенеза и клинической картины к выбору терапии. *Российский Аллергологический журнал*. 2013;1:15-24.

12. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г *Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам*. М.: Медицина. 1988;256.

13. Статья Р. Эндотипы и фенотипы астмы — от алгоритма обследования до подбора терапии. *Медицинский Совет*. 2015;(4):8-19.

   doi: 10.21518/2079-701X-2015-4-8-19

14. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction*. 2006;132(3):501-509.

   doi: 10.1530/rep.1.01110

15. Chaudhuri R, Cheng Y, Middaugh C.R., Volkin D.B. High-throughput biophysical analysis of protein therapeutics to examine interrelationships between aggregate formation and conformational stability. *AAPS J*. 2014;16:48-64.

   doi: 10.1208/s12248-013-9539-6

16. Dimberg A, Rylova S, Dieterich LC, Olsson AK, Schiller P, Wikner C, Bohman S, Botling J, Lukinius A, Wawrousek EF, et al. alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis. *Blood*. 2008;111:2015-2023.

   doi: http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-04-087841

17. Duffy JMN, Arambage K, Correa FJS, Olive D, Farquhar C, Garry R, Barlow DH, Jacobson TZ. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014; Issue 4:Art. No:CD011031.

   doi: 10.1002/14651858.CD011031.pub2

18. Lawrence S, Shalina SO, William HR. Alpha B-crystallin as a therapy for ischemia or inflammation, patent US 8771689 B2, July 8, 2014.

19. Moberg C, Bourlev V, Ilyasova N, Olovsson M. Levels of oestrogen receptor, progesterone receptor and αB-crystallin in eutopic endometrium in relation to pregnancy in women with endometriosis. *Hum Fertil (Camb)*. 2014 Jun 19;1-8.

   doi: 10.3109/14647273.2014.922705

20. Moberg C, Bourlev V, Ilyasova N, Olovsson M. Endometrial expression of LIF and its receptor and peritoneal fluid levels of IL-1a and IL-6 in women with endometriosis are associated with the probability of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(2):429-437.

   doi: 10.1007/s00404-015-3626-0

21. Brown J, Pan A, Hart RJ. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;Issue 12:Art. No:CD008475.

   doi: 10.1002/14651858.CD008475.pub2

22. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67:817-821.

   doi: 10.1016/S0015-0282(97)81391-X

23. Farmer JE, Prentice A, Breeze A, Ahmad G, Duffy JMN, Watson A, Pick A. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for endometriosis: bone mineral density. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003;Issue 4:Art. No:CD001297.

   doi: 10.1002/14651858.CD001297