

<https://doi.org/10.17116/repro201723487-97>

## Нейроангиогенез в эндометрии у женщин с эндометриозом и хронической тазовой болью: высокая экспрессия вазоактивного интестинального пептида

Д.м.н., проф. В.А. БУРЛЕВ<sup>1,2</sup>, врач, н.с. Н.А. ИЛЬЯСОВА<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» (дир. — д.м.н., проф., акад. РАН Г.Т. Сухих) Минздрава России, Москва, Россия, 117997; <sup>2</sup>Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Уппсала, Швеция

**Цель исследования** — оценить интенсивность экспрессии VIP и СЭФР-А в сосудах, пролиферативный индекс в сосудах и в эпителии желез, плотность CD31 и VIP в эутопическом эндометрии как в контрольной группе, так и у больных с перитонеальной формой эндометриоза без хронической тазовой боли и с болью, а также изучить содержание VIP, СЭФР-А, IL-6 в крови у обследованных больных.

**Материал и методы.** Иммуногистохимия использовалась для исследования экспрессии VIP, СЭФР-А и плотности микрососудов в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом. Метод ELISA использовали для определения концентрации VIP, СЭФР-А, IL-6 в сыворотке крови.

**Результаты.** Показано, что больные с эндометриозом и хронической тазовой болью имеют более высокую экспрессию VIP в эутопическом эндометрии, чем больные с эндометриозом без хронической боли. Экспрессия VIP в эндометрии является самой низкой в контрольной группе. У больных с эндометриозом содержание VIP в крови повышено в 2 раза в отсутствие боли и в 2,7 раза при наличии боли по отношению к контролю. Содержание VIP в крови более 10 нг/мл позволяет предсказать хроническую тазовую боль при эндометриозе с чувствительностью 98,6% и специфичностью 79,3%.

**Выводы.** Содержание VIP в крови можно использовать для объективной оценки боли при эндометриозе. Оценка экспрессии VIP в эутопическом эндометрии может быть использована для характеристики локальных повреждений нейроангиогенеза при эндометриозе. Роль VIP в патогенезе эндометриоза с хронической тазовой болью устанавливает обоснование потенциальной терапевтической цели.

*Ключевые слова:* эндометриоз, эутопический эндометрий, ангиогенез, нейрогенез.

## Neuroangiogenesis in endometrium of women with endometriosis and chronic pelvic pain: high expression of vasoactive intestinal peptide

V.A. BURLEV<sup>1,2</sup>, N.A. ILYASOVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» (dir. — d.m.n., prof., akad. RAN G.T. Sukhikh) Ministry of Healthcare of the Russia, Moscow, Russia, 117997; <sup>2</sup>Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden

**Objectives** — to estimate the intensity of the expression of VIP and VEGF-A in the vessels, the proliferative index in the vessels and in the epithelium of the glands, the density of CD31 and VIP in the eutopic endometrium, both in the control group and in patients with peritoneal form of endometriosis without chronic pelvic pain and with pain, and so to study the content of VIP, VEGF-A, IL-6 in the blood of the patients.

**Material and methods.** Immunohistochemistry was used to study the expression of VIP, VEGF-A and microvessel density in eutopic endometrium in women with endometriosis. The ELISA method was used to determine the concentration of VIP, VEGF-A, IL-6 in serum.

**Results.** It has been shown that patients with endometriosis and chronic pelvic pain have a higher expression of VIP in the eutopic endometrium than patients with endometriosis without chronic pain. Expression of VIP in the endometrium is the lowest in the control group. In patients with endometriosis in the blood, the VIP content is increased 2 times without pain and 2.7 times with pain in relation to control. The VIP content in the blood at a concentration of more 10 ng/ml allows predicting chronic pelvic pain in endometriosis with a sensitivity of 98.6% and a specificity of 79.3%.

**Conclusion.** The VIP content in the blood can be used for an objective assessment of pain in endometriosis. Evaluation of the VIP expression in the eutopic endometrium can be used to characterize local lesions of neuroangiogenesis in endometriosis. The role of VIP in the pathogenesis of endometriosis with chronic pelvic pain establishes the rationale for a potential therapeutic goal.

*Keywords:* endometriosis, eutopic endometrium, angiogenesis, neurogenesis.

Эндометриоз поражает до 10% женщин репродуктивного возраста и до 60% девочек-подростков и женщин с тазовой болью [25]. Клиническая картина

различна, но часто включает один или несколько симптомов: дисменорея (болезненная менструация), глубокая диспареуния (болезненный половой акт),

симптомы кишечника или мочевыделительной системы, недостаточная подвижность и хроническая тазовая боль [12, 25, 38], что значительно ухудшает качество жизни взрослых женщин и подростков [39].

Основные патологические механизмы боли, связанные с эндометриозом, по-прежнему, в значительной степени неясны, часто это обусловлено воспалением, наличием микродеминелинизированных сенсорных нервных волокон в функциональном слое эндометрия и наличием перитонеальных эндометриоидных гетеротопий по сравнению с нормальной брюшиной, а также при глубоком инфильтративном эндометриозе [27, 34, 49]. По мнению Е.А. Коган и соавт. [4], хронически повреждаемые и регенерирующие нервные волокна могут являться источником постоянной и интенсивной ноцицептивной стимуляции, лежащей в основе нейропатического болевого синдрома. Кроме этого, показано, что психоэмоциональное состояние женщин с эндометриозом в сочетании с болевым синдромом, а также степень болевого синдрома связаны с наличием высокой экспрессии PGP 9.5, NF, NGF и его рецептора NGFRp75 в очагах эндометриоза и окружающей ткани [5]. В то же время медикаментозное лечение при эндометриозе, способствующее развитию аменореи, препятствует возникновению так называемого провоспалительного каскада в ходе ежемесячной ретроградной менструации, уменьшает число нервных окончаний в эндометриоидных очагах, служит профилактикой формирования в структурах ноцицептивной системы очагов повышенной возбудимости [6]. По данным N. Tokushige и соавт. [46], гормональное лечение эндометриоза способствует статистически достоверному снижению плотности нервных волокон в эндометрии и миометрии.

Одним из нейротрансмиттеров, идентифицированных в нервных волокнах, является вазоактивный интестинальный пептид (VIP) [27, 46]. VIP широко представлен в организме человека и является плейотропным нейропептидом, состоящим из 28 аминокислот. Биологические эффекты VIP реализуются с помощью белковых рецепторов класса В G-белок — VPAC1, VPAC2 и PAC1. VIP оказывает иммуномодулирующее, расслабляющее гладкие мышцы и ангиогенное действие в дополнение к его роли в передаче боли в периферической и центральной нервной системах [13, 18, 20].

В настоящее время термин «нейроангиогенез» используется для описания совместного проявления уникальных сосудистых и нервных факторов в эутопическом эндометрии и в эндометриоидных имплантатах (гетеротопии). Хемокины, продуцируемые эктопическими эндометриальными стромальными клетками, активируют моноциты, а эндометриоидная ткань инфильтрируется активированными макрофагами и Т-клетками [23]. Местная воспалительная среда способствует синтезу и секреции из

эктопического эндометрия и активированных перитонеальных макрофагов и нейтрофилов в перитонеальную жидкость нейротрофических и ангиогенных факторов роста, в частности сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР) [10, 11, 18, 23, 51]. Ряд цитокинов, в частности интерлейкин (IL)-6 и -8, и другие провоспалительные биомолекулы также накапливаются в перитонеальной жидкости у женщин с эндометриозом [7, 41, 52].

Для роста гетеротопий необходима неоваскуляризация и увеличение плотности микрососудов (ПМС) по сравнению с окружающей тканью, внутри и вокруг перитонеальных эндометриотических имплантатов и ректовагинального инфильтративного эндометриоза [30]. Более того, сообщалось о положительной корреляции между ПМС в эндометриозе и симптомами боли в тазовой области [35]. Ранее в 2006 г. мы показали повышенную локальную ангиогенную активность, в том числе ПМС, как в эутопическом эндометрии у больных с эндометриозом по сравнению со здоровыми женщинами, так и в эктопическом эндометрии с высокой пролиферативной активностью [16].

Установлено, что экспрессия VIP в эутопическом эндометрии коррелирует с болью, возникающей при биопсии эндометрия в ходе выполнения офисной гистероскопии [24]. Кроме этого, у больных наблюдалось повышение экспрессии СЭФР в эндометрии по данным иммуногистохимии и содержание СЭФР в крови.

Метаанализ биомаркеров эндометрия для оценки роли боли у больных с эндометриозом установил VIP как «перспективный маркер для дальнейшего исследования» [21].

Учитывая известную роль VIP в передаче периферической боли и регуляции иммунного ответа, следует предположить о возможном участии VIP в боли, связанной с эндометриозом.

Цель исследования — оценить интенсивность экспрессии VIP и СЭФР-А в сосудах, пролиферативный индекс в сосудах и в эпителии желез, плотность CD31 и VIP в эутопическом эндометрии как в контрольной группе, так и у больных с перитонеальной формой эндометриоза без хронической тазовой боли и с болью, а также изучить содержание VIP, СЭФР-А, IL-6 в крови у обследованных больных.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 85 больных с бесплодием и перитонеальной формой эндометриоза, диагностированного во время лапароскопии. Рандомизация и подбор больных осуществлялись совместно с д.м.н. Т.Е. Самойловой, д.м.н. Е.Д. Дубинской, д.м.н., проф. А.С. Гаспаровым, к.м.н. М.А. Шороховой, к.м.н. М.Ф. Дорфманом, к.м.н. Н.С. Щетининой, к.м.н. А.С. Онищенко, врачом О.М. Векилян.

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Письменное информированное согласие на участие больных в исследовании было получено у всех пациенток. Все больные были разделены на две группы: без наличия признаков хронической тазовой боли (34 больные) и с наличием признаков хронической тазовой боли (51).

Критерии включения в исследование: женщины репродуктивного возраста (от 27 до 37 лет); перитонеальная форма эндометриоза I—III стадии, согласно классификации Американского общества репродуктивной медицины (rASRM) [42], 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. Оценка боли проводили по визуально-аналоговой шкале (ВАШ), как было описано нами ранее [15].

Критерии исключения: возраст пациентки старше 37 лет, наружный генитальный эндометриоз IV стадии, аллергические реакции на гозерелин 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, сальпингооариолизис. 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.

Больным перед оперативным лечением был проведен забор крови для лабораторных исследований. В ходе хирургической операции проведено раздельное диагностическое выскабливание полости матки и получен биоптат эндометрия. При непосредственной визуализации гетеротопий осуществлялась их биопсия.

Контрольную группу составили 53 пациентки, которым производилась стерилизация с использованием лапароскопического доступа. Эндометриоз в этой группе исключался после тщательного исследования висцеральной и париетальной брюшины на наличие гетеротопических эндометриоидных очагов. Ультразвуковое и гистероскопическое исследование 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 с использованием 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 хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до момента исследования. Все образцы биопсии эндометрия были получены в LH+7 ( $\pm 2$ ), исходя из ежемесячной оценки фазы менструального цикла и дня менструального цикла образцов эндометрия, согласно стандартным критериям.

**Иммуногистохимический анализ.** Образцы тканей эутопического эндометрия разделялись на две части, одна из которых 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 VIP в сосудах, СЭФР-А в сосудах и соответствующее распределение по клеточным элементам выполнена при использовании иммуногистохимического метода в условиях стандартного протокола, как это было описано нами ранее [16]. 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 поликлональные антитела к VIP (AB982; «EMD Millipore Corp., MA», США) с системой визуализации EnVision G/2 System/AP, Permanent Red («Dako, Agilent Technologies») и моноклональные антитела к СЭФР-А («Dako A/S», Дания).

**Определение плотности микрососудов (ПМС) и плотности VIP** проводили, как описано ранее [16], 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  $\text{мм}^2$ . Для визуализации микрососудов использовали моноклональные антитела к CD31 («Dako, Agilent Technologies») и поликлональные к VIP (AB982; «EMD Millipore Corp., MA», США) с системой визуализации EnVision G/2 System/AP, Permanent Red («Dako, Agilent Technologies») в соответствии с рекомендациями производителя. Показатель плотности CD31 и VIP выражали как среднюю интенсивность окрашивания  $\times$  % от площади на  $1 \text{ мм}^2$ .

**Проведение вестерн-блоттинга.** Использовали по 5 образцов ткани ( $\sim 30 \text{ мг}$ ) эутопического эндометрия от женщин контрольной группы, эутопического и эктопического эндометрия от больных с эндо-

метриозом без боли и с болью, как это было описано нами ранее [15]. Ткани гомогенизировали с использованием TissueLyser II («Qiagen AB», Швеция) в RIPA Lysis and Extraction buffer (Thermo Fisher Scientific), содержащие ингибиторы протеаз и фосфатаз. Суспензию центрифугировали и собирали супернатант. Концентрацию белка определяли с помощью анализа Bradford Reagent («Sigma-Aldrich Sweden AB») и спектрофотометра Epoch Microplate («BioTek Instruments, Inc.», VT, США). Денатурированные образцы белка (20 мкг, белок/проба), SeeBlue Plus2 как предварительно окрашенный белковый стандарт («Thermo Fisher Scientific») и положительный контроль клеточного лизата SK-N-SH (sc-2410; «Santa Cruz Biotechnology Inc.», TX, США) подвергались гель-электрофорезу в буфере NuPAGE MOPS SDS с помощью NuPAGE Bis-Tris 4–12% (Invitrogen, «Thermo Fisher Scientific»). По окончании электрофореза гель переносили на мембрану Immobilon-FL PVDF (EMD Millipore). Мембраны блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере Odyssey (PBS) (LI-COR Biotechnology, NE, США), а затем инкубировали в течение 12 ч при 4 °C с первичными антителами. Использовали кроличьи поликлональные антитела к VIP (AB982; EMD Millipore) и мышинные моноклональные к Actin $\beta$  (C4) (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) в блокирующем буфере Odyssey (PBS). Мембраны промывали четыре раза в TBS-Tween (pH 8,0; 0,5 M TRIS, 1,5 M NaCl, 0,1% Твин). Затем их инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темной камере с вторичными антителами (IRDye 800CW), козы к кроличьим IgG и IRDye 680RD козы к мышинным IgG (LI-COR Biotechnology), в блокирующем буфере Odyssey (PBS). Полосы были визуализированы с использованием инфракрасного Imager Odyssey и изображения были проанализированы с помощью программного обеспечения Image Studio Lite 5.0 (LI-COR Biotechnology).

**Проведение извлечения РНК и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (RT-qPCR).** Суммарную РНК экстрагировали с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) после разрушения образцов ткани в TissueLyser II (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя и как было описано нами ранее [15]. Концентрации РНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 («Thermo Fisher Scientific»), а целостность РНК оценивали с помощью системы BiiAnalyzer Agilent 2100 («Agilent Technologies»). В исследование были включены только образцы с целостностью РНК пять или более. Синтез первой нити комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием SuperScript VILO Master Mix (Invitrogen, «Thermo Fisher Scientific») в соответствии с протоколом производителя. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием анализа-

торов TaqMan Fast Universal PCR Master Mix и TaqMan Gene Expression в системе PCR в реальном времени StepOnePlus («Applied Biosystems», «Thermo Fisher Scientific»). Использовались праймеры Thermo Fisher Scientific: вазоактивный кишечный пептид (VIP, Hs00175021-m1) и человеческий  $\beta$ -актин (ACTB, 4326315E) в качестве эндогенного контроля. Все образцы выполнялись в трех экземплярах. Относительные изменения экспрессии генов были проанализированы с использованием метода 2- $\Delta\Delta T$  [31].

**Анализ сыворотки крови.** Определение содержания в сыворотке крови VIP (в нг/мл), СЭФР-А (в нг/мл), IL-6 (в пг/мл) проводили с помощью иммуноферментного анализа с применением стандартных наборов (ЕК-064-16, «Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Ca», США; «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  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). В зависимости от конкретных условий применялись: ANOVA, критерий Вилкоксона, U-критерий Манна—Уитни. Различия между группами считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика больных.** Клинические данные у больных с перитонеальной формой эндометриоза по отношению к контрольной группе характеризовались бесплодием, хроническими тазовыми болями, метроррагиями, диспареунией, а при лапароскопии различной локализацией гетеротопий на брюшине. Результаты оценки клинических данных представлены в **табл. 1**. Как следует из приведенных данных, возраст и индекс массы тела в группе больных с эндометриозом без боли и с болью статистически значимо не различались. В то же время статистически значимо дисменорея наблюдалась чаще в группе без боли, а сочетание дисменореи и диспареунии чаще в группе с болью. Хроническая тазовая боль статистически значимо наблюдалась у больных с болью (4,8 балла по шкале ВАШ). Отсутствовали статистически значимые различия между группами по критериям rASRM о распространенности эндометриоза на брюшине. Эти результаты позволили провести сравнение изученных показателей в крови и в эутопическом эндометрии у обследованных больных. Детальная клиническая характеристика больных была представлена нами ранее [1–3, 35].

**Содержание VIP, СЭФР-А, IL-6 в сыворотке крови у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.** Как следует из **табл. 2**, статистически значимое повышение содержания

Таблица 1. Клиническая характеристика обследованных больных

Показатель	Больные с эндометриозом		p
	боль (-) (n=34)	боль (+) (n=51)	
Возраст ( $\pm SD$ ), годы	31,8 $\pm$ 3,7	32,3 $\pm$ 3,9	>0,05
Индекс массы тела ( $\pm SD$ ), кг/м <sup>2</sup>	22,1 $\pm$ 2,1	23,4 $\pm$ 3,4	>0,05
Только дисменорея, абс. (%)	20 (58,8)	16 (31,4)	<0,05
Только диспареуния, абс. (%)	5 (14,7)	6 (11,8)	>0,05
Сочетание дисменореи и диспареунии, абс. (%)	9 (26,5)	29 (56,8)	<0,05
Хроническая тазовая боль (ВАШ, 0–10 см) ( $\pm SD$ )	0,0 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 1,2	<0,05
rASRM stage 1–2, абс. (%)	25 (73,5)	35 (68,6)	>0,05
rASRM stage 3, абс. (%)	9 (26,5)	16 (31,4)	>0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: нахождение различий осуществлялось с помощью критерия Манна–Уитни.

Таблица 2. Содержание VIP, СЭФР-А, IL-6 в сыворотке крови у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью (M $\pm$ SD)

Маркер	Контрольная группа (n=53)	Больные с эндометриозом		Достоверность
		боль (-) (n=34)	боль (+) (n=51)	
VIP, нг/мл	5,5 $\pm$ 3,2	11,4 $\pm$ 4,7	19,6 $\pm$ 4,3	$p_{1-2,3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
СЭФР-А, нг/мл	98 $\pm$ 27	197 $\pm$ 69	269 $\pm$ 83	$p_{1-2,3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
IL-6, пг/мл	4,79 $\pm$ 2,93	4,24 $\pm$ 1,12	6,98 $\pm$ 4,9	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,02$ $p_{2-3}<0,001$

Таблица 3. Пролиферативный индекс Ki-67 (%), экспрессия VIP в сосудах (SCORE), плотность на 1 мм<sup>2</sup> CD31 и плотность на 1 мм<sup>2</sup> VIP в эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью (M $\pm$ SD)

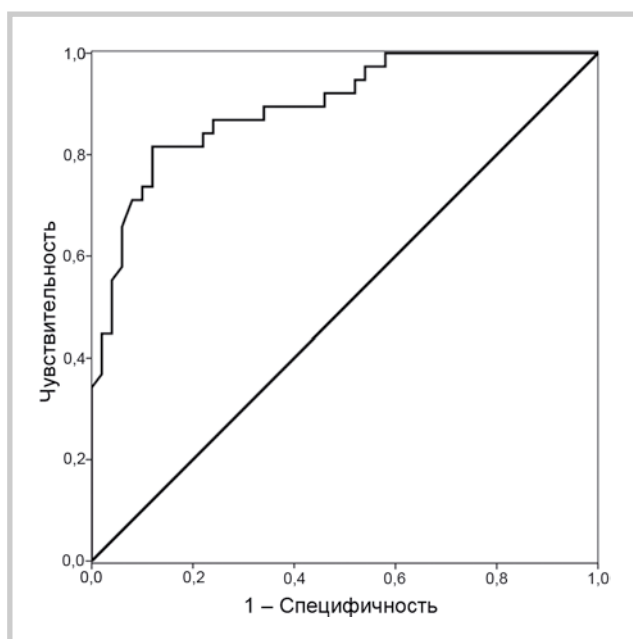
Показатель	Контрольная группа (n=53)	Больные с эндометриозом (n=85)		Достоверность
		без боли (n=34)	с болью (n=51)	
VIP, сосуды, SCORE	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,4	$p_{1-3}<0,05$
VIP, плотность на 1 мм <sup>2</sup>	4,85 $\pm$ 2,8	12,6 $\pm$ 5	17,75 $\pm$ 6	$p_{1-2,3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
ПМС, CD31, на 1 мм <sup>2</sup>	231,7 $\pm$ 80	364,5 $\pm$ 101	452,8 $\pm$ 170	$p_{1-2,3}<0,05$
Ki-67, % эндотелий сосудов	3,6 $\pm$ 1,1	4,1 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 1,2	$p_{1-3}<0,05$
Ki-67, % эпителий желез	11,7 $\pm$ 3,7	12,1 $\pm$ 2,8	14,5 $\pm$ 3,8	$p_{1-3}<0,05$
СЭФР-А, сосуды (SCORE)	2,1 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,8	$p_{1-3}<0,05$

VIP в крови отмечено у больных пациенток с эндометриозом — в 2,1 раза без боли и в 3,6 раза при наличии боли. Содержание СЭФР-А в крови показало достоверно значимые различия в сторону увеличения у больных с эндометриозом — в 2 раза в отсутствие боли и в 2,7 раза при наличии боли по отношению к контрольной группе. Содержание IL-6 в крови не имело статистически значимых различий в норме и у больных с эндометриозом и без боли, но было увеличено в 1,5 раза ( $p<0,001$ ) у больных с наличием боли.

**Качественная ROC-модель для VIP в сыворотке крови у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.** Проведение ROC-анализа (рис. 1) для массива данных о содержании

VIP в крови было показано, что у больных с эндометриозом и хронической тазовой болью площадь под кривой (AUC) составила для VIP 0,96. Используя предельное значение концентрации VIP в сыворотке 10,6 нг/мл, можно предсказать хроническую тазовую боль при эндометриозе с чувствительностью 98,6% и специфичностью 79,3%. Эти данные можно использовать и для построения объективной шкалы оценки интенсивности тазовой боли по уровню VIP в крови в отличие от субъективной шкалы ВАШ.

**Пролиферативный индекс Ki-67 (%), экспрессия VIP в сосудах (SCORE), плотность на 1 мм<sup>2</sup> CD31 и плотность на 1 мм<sup>2</sup> VIP в эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.** Как следует из табл. 3,



**Рис. 1.** Качественная ROC-модель для VIP в сыворотке крови у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.

экспрессия VIP в сосудах эутопического эндометрия была наименьшая в норме и статистически значимо повышалась у больных с болью в 2 раза. Плотность VIP на 1 мм<sup>2</sup> была также наименьшей в норме, статистически значимо повышалась в 2,6 раза у больных с эндометриозом и достигала наибольших значений (увеличение в 3,7 раза) у больных при наличии боли.

Исследование ПМС для CD31 на 1 мм<sup>2</sup> позволило установить статистически значимое увеличение ПМС по отношению к норме у больных с эндометриозом без наличия боли в 1,7 раза, а с болью в 1,9 раза.

Анализ индекса пролиферации (Ki-67, %) в эндотелии сосудов показал, что наблюдалось статистически значимое увеличение в 1,5 раза у больных с эндометриозом и наличием боли по отношению к контрольной группе. Аналогичные результаты были

получены в эпителии желез. Так, в группе больных с болью по отношению к контролю наблюдались статистически значимые различия в сторону увеличения в 1,3 раза.

Экспрессия СЭФР-А в сосудах соответствовала распределению данных индекса пролиферации в сосудах. Так, не установлено статистически значимых различий между контрольной группой и больными с эндометриозом и без боли. В то же время у больных с болью наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии СЭФР-А ( $p < 0,05$ ).

**Относительный уровень белка VIP (вестерн-блоттинг) и относительная экспрессия VIP mRNA (qRT-PCR) в эутопическом эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.** Вестерн-блоттинг использовали для определения экспрессии белка VIP в эутопическом эндометрии (табл. 4). Проводилось сравнение нормального эутопического эндометрия и эутопического эндометрия у больных с эндометриозом и болью (боль-, боль+); бета-актин использовался в качестве внутреннего контроля. Результаты анализировались с использованием Image Studio Software (LI-COR, Inc) и оценивались на основании непараметрического U-теста Манна—Уитни. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее низкие значения экспрессии VIP были в нормальном эндометрии ( $0,09 \pm 0,06$  нг/мл). При эндометриозе с отсутствием хронической тазовой боли величина экспрессии возрастает статистически значимо в 3 раза ( $0,27 \pm 0,12$  нг/мл). При сочетании эндометриоза и хронической тазовой боли экспрессия VIP по отношению к нормативным значениям возрастает в 4,6 раза.

Результаты изучения экспрессии мРНК VIP в эутопическом и эктопическом эндометрии у женщин с эндометриозом в зависимости от тазовой боли представлены в табл. 3. В качестве контроля использовались образцы женщин с нормальным эндометрием. Уровень экспрессии мРНК измеряли с помощью количественной ПЦР в реальном времени и нормировали на уровень гена с помощью актина В. Каждый эксперимент повторяли три раза. Результаты проанализированы методом 2-Ct и оценивались с использованием непараметрического U-критерия

**Таблица 4.** Относительный уровень белка VIP (вестерн-блоттинг — WB) и относительная экспрессия VIP mRNA (qRT-PCR) в эутопическом эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью ( $M \pm SD$ )

Ткань		WB VIP/beta-actin	qRT-PCR VIP/beta-actin
Контрольная группа			
боль (-)	1	$0,09 \pm 0,06$ ( $n=5$ )	$0,0012 \pm 0,0008$ ( $n=7$ )
Больные с эндометриозом			
боль (-)	2	$0,27 \pm 0,12$ ( $n=5$ )	$0,0012 \pm 0,0004$ ( $n=6$ )
боль (+)	3	$0,42 \pm 0,05$ ( $n=5$ )	$0,0054 \pm 0,0044$ ( $n=4$ )
			$> 0,05$
$p_{1-2} < 0,05$			$< 0,02$
$p_{2-3} < 0,05$			$< 0,0038$
$p_{1-3} < 0,0005$			

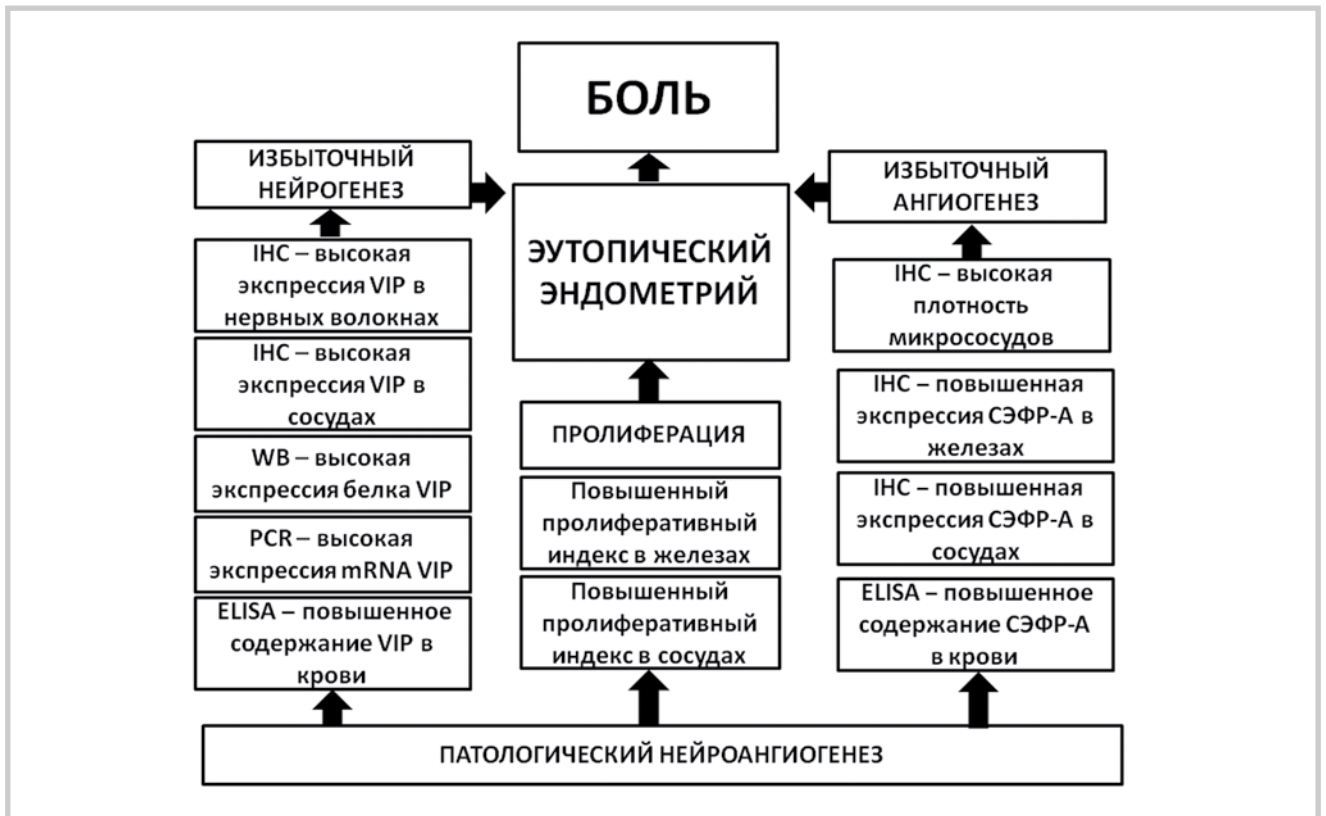


Рис. 2. Блок-схема патологического нейроангиогенеза в эутопическом эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.

Манна—Уитни. Установлено, что экспрессия гена VIP в эутопическом эндометрии в норме и у больных с эндометриозом и без тазовой боли статистически значимо не различалась и составила  $0,0012 \pm 0,0008$  и  $0,0012 \pm 0,0004$  соответственно. У больных с эндометриозом и тазовой болью экспрессия гена VIP была увеличена в 4,5 раза и составила  $0,0054 \pm 0,0044$ .

**Блок-схема патологического нейроангиогенеза в эутопическом эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза и хронической тазовой болью.** На рис. 2 представлена модель формирования боли при патологическом нейроангиогенезе в эутопическом эндометрии при эндометриозе и хронической тазовой боли. Для формирования боли, по данным проведенного исследования, необходимо сочетание трех компонентов: избыточного нейрогенеза, избыточного ангиогенеза и пролиферации.

Избыточный нейрогенез складывается из повышенного содержания VIP в крови (ELISA, иммуноферментный анализ), высокой экспрессии мРНК VIP (PCR, ПЦР) в эндометрии, высокой экспрессии белка VIP (WB, вестерн-блоттинг) в эндометрии, высокой экспрессии VIP (ИНС, иммуногистохимия) в сосудах эндометрия, высокой экспрессии VIP (ИНС) в нервных волокнах эндометрия.

Избыточный ангиогенез включает повышенное содержание СЭФР-А в крови (ELISA), повышенную экспрессию СЭФР-А (ИНС) в сосудах эндометрия,

повышенную экспрессию СЭФР-А (ИНС) в эпителии желез эндометрия, высокую ПМС эндометрия.

Проявление пролиферативной активности основано на повышенном пролиферативном индексе в эпителии сосудов и в железах. Эти данные дополняют наши ранее опубликованные результаты [16]. В соответствии с данными при высоком индексе пролиферации и ангиогенной активности в эндометрии у больных с перитонеальной формой эндометриоза наблюдалось большее число больных с хронической тазовой болью. К сожалению, в этой публикации нам не удалось подтвердить результаты данными о нейрогенезе, и поэтому этот акцент не получил должного отражения. В представленной работе роль нейрогенеза доказана.

Сопряжение сигнальных путей нейрогенеза, ангиогенеза и пролиферации приводит к формированию феномена хронической боли, связанной с эутопическим эндометрием у больных с эндометриозом. Для возникновения такой боли необходим длительный период формирования патологического нейроангиогенеза как фундамента или необходимого субстрата, без которого проявление боли не возникает.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Боль по-прежнему является преобладающим симптомом при эндометриозе и может иметь различ-

ное происхождение: ноцицептивная, невропатологическая и воспалительная или, вероятно, комбинация всех трех [36]. Первоначальные сообщения об уникальном присутствии сенсорных нервных волокон в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом были поставлены под сомнение, вполне вероятно, что нервные волокна эндометрия коррелируют с болью независимо от основного заболевания [22, 40]. Однако усиление иннервации перитонеальных эндометриоидных гетеротопий и при глубоком инфильтративном эндометриозе может быть более тесно связано с эндометриозом и воспалением и соответственно с болью в области малого таза [10, 32, 45, 50]. Воспаление вызывает нейроангиогенез, присутствующий эндометриозу, и экспрессию белков, участвующих в ангиогенезе, с активацией провоспалительных и клеточных механизмов регенерации, таких как VEGF, простагландин E2, COX-2, IL-6 и АКТГ. Эти результаты были продемонстрированы в гетеротопиях при эндометриозе и в перитонеальной жидкости на модели химерной мыши с использованием человеческой эндометриоидной линии клеток [9]. Длительное воспаление вызывает изменения микрососудистого фенотипа эндотелиальных клеток, которое напрямую играет решающую роль в ангиогенезе и связано с состоянием иммунных реакций [19]. Несмотря на то что уровень VIP повышен при воспалении, существуют и другие механизмы, посредством которых VIP стимулирует ангиогенез. VIP стимулирует синтез индуцированного ишемией VEGF в клетках карциномы предстательной железы и культивируемых микрососудистых эндотелиальных клетках, но может также давать проангиогенный эффект, не зависящий от гипоксии [17, 28, 51]. Будущие исследования могут выявить, играет ли VIP роль регулятора: в образовании кровеносных сосудов эндометрия, в нормальной регенерации после менструации, является результатом хронического воспаления при эндометриозе или и то и другое.

Результаты настоящего исследования показывают, что ангиогенная активность, полуколичественно выраженная как ПМС, существенно увеличивается в эутопическом эндометрии у женщин с эндометриозом и наличием боли по сравнению с контролем и больными с эндометриозом без хронической тазовой боли. Иммуногистохимические исследования показали усиление окрашивания VIP у больных с эндометриозом и наличием боли. Нейроангиогенез включает нейронное продуцирование СЭФР-А и стимуляцию роста кровеносных сосудов вместе с прорастающими нервами, и, наоборот, сосуды могут производить наведенные сигналы для роста аксонов [26]. Особый интерес в контексте проведенного исследования представляют факты о том, что парасимпатические VIP-содержащие нервные волокна следуют за кровеносными сосудами и регулируют вазодилатацию [48]. Из этого следует, что иммуногистохимиче-

ское окрашивание для VIP будет увеличиваться в ткани с более высокой ПМС. В наших образцах эндометрия VIP-иммунореактивность наблюдалась главным образом в кровеносных сосудах, но также в нервных волокнах и, возможно, иммунных клетках в строме. Необходимо более детальное исследование для уточнения источников продукции VIP в эндометрии и их относительной важности.

Поскольку иммуногистохимические исследования при эндометриозе чувствительны к абберациям из-за гетерогенности исследуемой популяции, качества образцов тканей и методологических несоответствий, мы дополнили наше исследование с помощью qRT-PCR и вестерн-блоттинга. Уровень VIP-пептидов в эутопическом эндометрии по данным вестерн-блоттинга подтвердил результаты иммуногистохимического исследования. В то же время экспрессия мРНК не поддерживала различий между больными с эндометриозом и отсутствием боли и нормой, по данным иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. Отмечалось только небольшое увеличение уровня VIP мРНК у больных с эндометриозом и наличием боли по сравнению с двумя другими когортами пациентов. Являются ли эти несоответствия реальными различиями или это зависит от размера выборки образцов для анализа qPCR и WB? Учитывая, что для нахождения статистических различий использовался критерий Манна—Уитни, данное положение правомерно.

Наиболее интересным с клинической точки зрения является вопрос о связи концентрации IL-6 в крови с болью по аналогии с гипотезой о роли воспаления в нейроангиогенезе. Ряд авторов [44, 53] указывают на то, что IL-6 является как экстренным регулятором патологической боли, так и триггером локальной боли. В проведенной работе показано, что содержание IL-6 в крови повышено у женщин с хронической тазовой болью, что свидетельствует о наличии признаков воспаления в области малого таза, которое в свою очередь поддерживается высокими значениями ПМС в гетеротопиях при перитонеальной форме эндометриоза [16]. В исследовании I. Velasco и соавт. [47] установлено, что у больных с эндометриозом наблюдался более высокий уровень IL-6, чем у женщин с доброкачественными, не эндометриоидными кистами яичников. Более того, концентрация IL-6 коррелировала с интенсивностью дисменореи и хронической болью в области таза. В более раннем исследовании [40] было установлено, что женщины с эндометриозом имеют повышенные значения уровня IL-6 в перитонеальной жидкости, что коррелировало с результатами лапароскопических исследований по распространению эндометриоза и спазмами в области таза, однако связь с болью обнаружить не удалось. В проведенном исследовании основным показателем для лапароскопии было бесплодие, а не боль. Оценку тяжести тазовой бо-



ли и дисменореи проводили в соответствии с ограничением трудоспособности и диспареунией. Оценку боли проводили по шкале ВАШ от 0 до 10 баллов, средняя оценка боли у 51 женщины с болью составила 4,8 балла.

Наши результаты показали присутствие VIP в волокнах малого сенсорного нерва, а также его участие в воспалительных процессах, что указывает на предполагаемую роль VIP в реализации боли, связанной с эндометриозом. Это предположение частично подтверждается связью между иммуногистохимическими данными в эндометрии и оценкой боли во время гистероскопической биопсии, продемонстрированной А. Di Spiezio Sardo и соавт. [21]. Авторы исследовали экспрессию панели маркеров нервных волокон в эндометрии у женщин с и без эндометриоза/аденомиоза, у которых боль была более 5 баллов по шкале ВАШ. Обнаружено самое высокое соотношение между болью и исследуемыми маркерами у пациентов с эндометриозом/аденомиозом при иммуногистохимическом окрашивании VIP не только в нервных волокнах, но и в сосудах и стромальных клетках. Однако авторами не предпринималась попытка проверить иммуногистохимические результаты с помощью количественного анализа и, следовательно, эти данные должны интерпретироваться с осторожностью.

В представленной работе был проведен цикл исследований по экспрессии VIP в эутопическом эндометрии с использованием методов иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, ПЦР и оценки его содержания в крови. На основании полученных результатов была сформирована гипотеза о наличии у больных с эндометриозом и хронической тазовой болью схожих признаков сверхэкспрессии VIP и нейродегенерации. Следовательно, эндометриоз следует отнести к ассоциированным с VIP заболеваниям: вилома (синдром Вернера—Моррисона), рассеянный склероз, артриты, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [8, 14, 29, 33, 43]. Последующие исследования природы этого явления позволят подтвердить или опровергнуть вы-

сказанное предположение. Несомненно, что тазовая боль при эндометриозе не является только проявлением патологического нейроангиогенеза, но может быть ее существенной составляющей.

Таким образом, показано, что больные с эндометриозом и хронической тазовой болью имеют более высокую экспрессию VIP в эутопическом эндометрии, чем больные с эндометриозом без хронической боли. Экспрессия VIP в эндометрии является самой низкой в контрольной группе. У больных с эндометриозом в крови содержание VIP повышено в 2 раза у пациенток без боли и в 2,7 раза у пациенток с наличием боли по отношению к контролю. Содержание VIP в крови при концентрации более 10 нг/мл позволяет предсказать хроническую тазовую боль при эндометриозе с чувствительностью 98,6% и специфичностью 79,3%. В будущем функциональные исследования в эндометрии могут выявить роль VIP в патогенезе эндометриоза с хронической тазовой болью для обоснования потенциальной терапевтической цели.

**Благодарности.** Выражаем благодарность professor M. Olovsson, PhD C. Moberg, PhD Th. Kunovac Kallak, E. Davey Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden за участие в обсуждениях и поддержку. Работа выполнена по теме: «Изучение ассоциации между эндометриальными маркерами эутопического и эктопического эндометрия и тазовой болью у женщин с эндометриозом», учетный номер Минобрнауки в НТИМИ 0431/01/15. Финансовая, научная, правовая и политическая поддержка осуществлялась Шведской королевской академией наук, Шведским медицинским исследовательским советом (грант №8683), Фондом планирования семьи в Уппсале, Университетом Уппсалы, Швеция, ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России и Минздравом России.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. 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;22(1):12-19. [Burlev VA, Ilyasova NA. AlphaB-crystallin expression in eutopic and ectopic endometrium among the patients with peritoneal form endometriosis: pregnancy outcome. *Problemy reproduktivii*. 2016;22(1):12-19. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/repro201622112-19>
2. 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;22(2):24-32. [Burlev VA, Ilyasova NA. Particular signaling LIF/LIFE/gp130/SOCS1 pathway in patients with peritoneal endometriosis and infertility. *Problemy reproduktivii*. 2016; 22(2):24-32. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/repro201622224-32>
3. 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;4:66-75. [Burlev VA, Ilyasova NA. Sex hormone levels and the nucleons isoforms expression of estrogen and progesterone receptors in eutopic endometrium of patients with peritoneal form endometriosis and infertility. *Problemy reproduktivii*. 2016;22(4):66-75. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/repro201622466-75>

4. Коган Е.А., Парамонова Н.Б., Демур Т.А., Файзуллина Н.М., Овакимян А.С., Адамян Л.В. Морфологический субстрат и патогенетические механизмы синдрома тазовой боли при эндометриозе. *Архив патологии*. 2014;6:37-43. Доступно по: <https://www.mediasphera.ru/issues/arkhiv-patologii/2014/6/030004-1955201465> Ссылка активна на 01.06.2017. [Kogan EA, Paramonova NB, Demura TA, Faizullina NM, Ovakimyan AS, Adamian LV. The morphological substrate and pathogenetic mechanisms of pelvic pain syndrome in endometriosis. *Arkhiv patologii*. 2014;6:37-43. (In Russ.)]. Available at: <https://www.mediasphera.ru/issues/arkhiv-patologii/2014/6/030004-1955201465> Accessed June 01, 2017
5. Овакимян А.С., Адамян Л.В., Коган Е.А., Козаченко И.Ф., Чернов Д.Н., Арсланян К.Н. Болевой синдром при эндометриозе: клинико-морфологические и молекулярные механизмы. *Проблемы репродукции*. 2015;6:31-38. [Ovakimyan AS, Adamyan LV, Kogan EA, Kozachenko IF, Chernov DN, Arslanyan KN. Pain syndrome in endometriosis: clinical, morphological and molecular mechanisms. *Problemy reproduktivnoy*. 2015;6:31-38. <https://doi.org/10.17116/repro201521631-38/>
6. Чернуха Г.Е. Эндометриоз и хроническая тазовая боль: причины и последствия. *Проблемы репродукции*. 2011;5:83-89. Доступно по: <https://elibrary.ru/item.asp?id=18949312> Ссылка активна на 01.06.2017 [Chernukha GE. The endometriosis and chronic pelvic pain: the causes and effects. *Problemy reproduktivnoy*. 2011;5:83-89. (In Russ.)]. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=18949312> Accessed June 01, 2017
7. Ahn SH, Edwards AK, Singh SS, Young SL, Lessey BA, Tayade C. IL-17A Contributes to the pathogenesis of endometriosis by triggering proinflammatory cytokines and angiogenic growth factors. *J Immunol*. 2015;195(6):2591-2600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501138>
8. Apodaca-Torrez FR, Triviño M, Lobo EJ, Goldenberg A, Triviño T. Extra-pancreatic vipoma. *Abcdarqbras cirdig*. 2014;27(2):222-224. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202014000300015>
9. Arosh JA, Lee JeH, Balasubramanian D, Stanley JA, Long CR, Meagher MW, Osteen KG, Bruner-Tran KL, Burghardt RC, Starzinski-Powitz A, Banua SK. Molecular and preclinical basis to inhibit PGE2 receptors EP2 and EP4 as a novel nonsteroidal therapy for endometriosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(31):9716-9721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507931112>
10. Asante A, Taylor RN. Endometriosis: the role of neuroangiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:163-182. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142158>
11. Bajo AM, Juarranz MG, Valenzuel P, Martínez P, Prieto JC, Guijarro LG. Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human uterus. *Peptides*. 2000;21(9):1383-1388. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00282-5](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00282-5)
12. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science*. 2005;308(5728):1587-1589. <https://doi.org/10.1126/science.1111445>
13. Bokor A, Kyama CM, Vercrusse L, Fassbender A, Gevaert O, Vodolazkaia A, De Moor B, Fülöp V, D'Hooghe T. Density of small diameter sensory nerve fibres in endometrium: a semi-invasive diagnostic test for minimal to mild endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(12):3025-3032. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep283>
14. Bourcier ME, Vinik AI. sunitinib for the treatment of metastatic paraganglioma and vasoactive intestinal polypeptide-producing tumor (VIPoma) pancreas. 2013;42(2):348-352. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31825c53fa>
15. Bourlev V, Moberg C, Ilyasova N, Davey E, Kunovac Kallak Th, Olovsson M. Vasoactive intestinal peptide is upregulated in women with endometriosis and chronic pelvic pain. In thesis: The Human endometrium. Studies on Angiogenesis and Endometriosis. 2016;identifiers Available at: URN: urn:nbn:se:uu:diva-314225 OAI: 2017oai:DiVA.org:uu-314225 DiVA: diva2:1070106 Accessed June 01, 2017
16. 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. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01110>
17. Collado B, Carmena MJ, Clemente C, Prieto JC, Bajo AM. Vasoactive intestinal peptide enhances growth and angiogenesis of human experimental prostate cancer in a xenograft model. *Peptides*. 2007;28(9):1896-1990. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.015>
18. Couvineau A, Laburthe M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol*. 2012;166(1):42-50. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01676.x>
19. Danese S, Deban L. Does the mucosal microcirculation play a role in IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:Suppl 2:125-126. <https://doi.org/10.1002/ibd.20716>
20. Dickinson T, Fleetwood-Walker SM. VIP and PACAP: very important in pain? *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(8):324-329. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01340-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01340-1)
21. Di Spiezio Sardo A, Florio P, Fernandez LM, Guerra G, Spinelli M, Di Carlo C, Filippeschi M, Nappi C. The potential role of endometrial nerve fibers in the pathogenesis of pain during endometrial biopsy at office hysteroscopy. *Reprod Sci*. 2015; 22(1):124-131. <https://doi.org/10.1177/1933719114534536>
22. Ellett L, Readman E, Newman M, McIlwaine K, Villegas R, Jagasia N, Maher P. Are endometrial nerve fibres unique to endometriosis? A prospective case-control study of endometrial biopsy as a diagnostic test for endometriosis in women with pelvic pain. *Hum Reprod*. 2015;30(12):2808-2815. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev259>
23. Ganea D, Hooper KM, Kong W. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(2):442-452. <https://doi.org/10.1111/apha.12427>
24. Garcia-Manero M, Alcazar JL, Toledo G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ovarian endometriosis: correlation between VEGF serum levels, VEGF cellular expression, and pelvic pain. *Fertil Steril*. 2007;88(2):513-515. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.117>
25. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2010;362(25):2389-2398. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1000274>
26. Greaves E, Collins F, Esnal-Zufiaurre A, Giakoumelou S, Horne AW, Saunders PT. Estrogen receptor (ER) agonists differentially regulate neuroangiogenesis in peritoneal endometriosis with the repellent factor SLIT3. *Endocrinology*. 2014;155(10):4015-4026. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1086>
27. Greene AD, Lang SA, Kendzierski JA, Sroga-Rios JM, Herzog TJ, Burns KA. Endometriosis: where are we and where are we going? *Reproduction*. 2016;152(3):R63-R78. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0052>
28. Hu DE, Hiley CR, Fan TP. Comparative studies of the angiogenic activity of vasoactive intestinal peptide, endothelins-1 and -3 and angiotensin II in a rat sponge model. *Br J Pharmacol*. 1996;117(3): 545-551. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15225.x>
29. Johnson JB, Marsden L, Samadder NJ. A rare cause of diarrhea: pancreatic VIPoma. *Endoscopy*. 2013;45:E311-E312. <https://doi.org/10.1055/c-0033-1344411>
30. Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K. Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1998;4(5):719-723. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.5.719>
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001;25(4):402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

32. Maharajaa SPK, Black KI, Manconi F, Ng CHM, Hey-Cunningham A, Fraser IS, Berbic M. An investigation of the relationship between pelvic pain and density of nerve fibers in peritoneal lesions of endometriosis. *Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders*. 2014;6(2):84-91. <https://doi.org/10.5301/je.5000185>
33. Martinez C, Ortiz AM, Juarranz Y, Lamana A, Seoane IV, Leceta J, Garcia-Vicuna R, Gomariz RP, Gonzalez-Alvaro I. Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One*. 2014;9(1):1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085248>
34. Miller EJ, Fraser IS. The importance of pelvic nerve fibers in endometriosis. *Womens Health (Lond)*. 2015;11(5):611-618. <https://doi.org/10.2217/whe.15.47>
35. Moberg C, Bourlev V, Ilyasova N, Olovsson M. Endometrial expression of LIF and its receptor and peritoneal fluid levels of IL-1 $\alpha$  and IL-6 in women with endometriosis are associated with the probability of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292(2):429-437. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3626-0>
36. Morotti M, Vincent K, Brawn J, Zondervan KT, Becker CM. Peripheral changes in endometriosis-associated pain. *Hum Reprod Update*. 2014;20(5):717-736. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu021>
37. Newman TA, Bailey JL, Stocker LJ, Woo YL, Macklon NS, Cheong YC. Expression of neuronal markers in the endometrium of women with and those without endometriosis. *Hum Reprod*. 2013;28(9):2502-2510. <https://doi.org/10.1093/humrep/det274>
38. Nisenblat V, Bossuyt PM, Shaikh R, Farquhar C, Jordan V, Schefers CS, Mol BW, Johnson N, Hull ML. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;1(5):CD012179. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012179>
39. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, Jenkinson C, Kennedy SH, Zondervan KT; World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*. 2011;96(2):366-373. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.090>
40. Overton C, Fernandez-Shaw S, Hicks B, Barlow D, Starkey P. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. *Hum Reprod*. 1996;11(2):380-386. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/11.2.380>
41. Rakhila H, Al-Akoum M, Doillon C, Lacroix-Pépin N, Leboeuf M, Lemyre M, Akoum A, Pouliot M. Augmented angiogenic factors expression via FP signaling pathways in peritoneal endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(12):4752-4763. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1569>
42. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67:817-821. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81391-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81391-X)
43. Maheshwari RR, Desai M, Rao VP, Palanki RR, Namburi RP, Reddy KT, Reddy AP. Indian Ischemic stroke as a presenting feature of VIPoma due to MEN1 syndrome. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013;17(S1):215-218. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.119576>
44. Svensson CI. Interleukin-6: a local pain trigger? *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):145. <https://doi.org/10.1186/ar3138>
45. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod*. 2006;21(11):3001-3007. <https://doi.org/10.1093/humrep/del260>
46. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2008;90(5):1589-1598. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.074>
47. Velasco I, Acien P, Campos A, Acien MI, Ruiz-Macia E. Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *J Reprod Immunol*. 2010;84(2):199-205. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.11.004>
48. Wallengren J. Vasoactive peptides in the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1997;2(1):49-55. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.1997.11>
49. Wang G, Tokushige N, Russell P, Dubinovsky S, Markham R, Fraser IS. Hyperinnervation in intestinal deep infiltrating endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16(6):713-719. <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2009.07.012>
50. Wang G, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(4):827-834. <https://doi.org/10.1093/humrep/den464>
51. Yang J, Shi QD, Song TB, Feng GF, Zang WJ, Zong CH, Chang L. Vasoactive intestinal peptide increases VEGF expression to promote proliferation of brain vascular endothelial cells via the cAMP/PKA pathway after ischemic insult in vitro. *Peptides*. 2013;42:105-111. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.01.007>
52. Young VJ, Brown JK, Saunders PT, Horne AW. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(5):558-569. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt024>
53. Zhou YQ, Liu Z, Liu ZH, Chen SP, Li M, Shahveranov A, Ye DW, Tian YK. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):141. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0607-6>

Поступила 05.06.17