

М.Оразов<sup>1</sup>  
О.Н.Сулаева<sup>2</sup>  
Е.Н.Носенко<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Донецкий национальный медицинский университет имени М.Горького

<sup>2</sup> Запорожский государственный медицинский университет

<sup>3</sup> Одесский национальный медицинский университет

**Ключевые слова:** аденомиоз, нервы, ангиогенез, ремоделирования.

Надійшла: 24.02.2015

Прийнята: 23.03.2015

УДК 618.14-006.36-073.432.1

## НЕЙРОСОСУДИСТЫЕ ОТНОШЕНИЯ В СТЕНКЕ МАТКИ ПРИ АДЕНОМИОЗЕ, ОСЛОЖНЕННОМ СИНДРОМОМ ТАЗОВОЙ БОЛИ

**Реферат.** В работе проведен морфологический и иммуногистохимический анализ нейрососудистых отношений в стенке матки при аденомиозе, осложненном синдромом тазовой боли. Материал получен после гистерэктомии от 16 пациенток репродуктивного возраста с диффузным аденомиозом 2-3 степени в фазе пролиферации. В группу сравнения вошел материал, полученный от пациенток аналогичного возраста с бессимптомной лейомиомой. При морфологическом исследовании стенки матки при аденомиозе установлено увеличение количества нервов вокруг крупных сосудов, в зонах ремоделирования миометрия и вблизи эктопического эндометрия ( $p < 0,001$ ). Рост нервов был ассоциирован с дистрофическими изменениями маточных сосудов, снижением их чувствительности к эстрогенам при стимуляции ангиогенеза на фоне повышенной экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия VEGF ( $p < 0,01$ ). Основными источниками VEGF были эпителий эктопического эндометрия и клетки в зонах воспалительного ремоделирования миометрия.

**Morphologia.** – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 52-57.

© М.Оразов, О.Н.Сулаева, Е.Н.Носенко, 2015

✉ oksanahistology@gmail.com

**Orazov M., Sulaeva O.N., Nosenko E.N. Neurovascular relationships in uterine wall in adenomyosis complicated with pelvic pain syndrome.**

**ABSTRACT. Background.** Pelvic pain is one of the most frequent complications of adenomyosis. **Objective.** To investigate the neurovascular relationships in uterine adenomyosis complicated with pelvic pain syndrome. **Methods.** Material was received after hysterectomy from 16 patients of reproductive age with diffuse adenomyosis of 2-3 degrees in the phase of proliferation. The group of comparison included the material obtained from patients with asymptomatic leiomyoma. Morphological and immunohistochemical methods were used. **Results.** An increase in nerve number and density was demonstrated in perivascular region around ectopic endometrium as well as in zones of myometrium remodeling in patients with adenomyosis ( $p < 0,001$ ). Nerve growth was associated with degenerative changes in the uterine vessels, lack of  $\alpha$ -SMA expression and reduction of estrogen receptors in arteries. These changes were accompanied with stimulation of angiogenesis and increased expression of vascular endothelial growth factor VEGF ( $p < 0,01$ ). The main sources of VEGF were ectopic endometrium epithelium and inflammatory cells in areas of myometrium remodeling. **Conclusion.** Remodeling of vascular bed and endometrium on the background of dystrophic changes of large vessels and increased VEGF expression could be one of the factors determining nerve growth in uterine adenomyosis.

**Key words:** adenomyosis, nerves, angiogenesis, remodeling.

### Citation:

Orazov M, Sulaeva ON, Nosenko EN. [Neurovascular relationships in uterine wall in adenomyosis complicated with pelvic pain syndrome]. Morphologia. 2015;9(1):52-57. Russian.

### Введение

Тазовая боль является одним из серьезнейших осложнений аденомиоза, существенно снижая качество жизни пациенток. Как известно, развитие боли включает центральные и периферические механизмы. Тот факт, что хирургическое лечение (гистерэктомия) купирует болевой синдром у женщин с эндометриозом, отражает роль периферического звена в развитии болевого синдрома [1]. Данный факт предусматривает роль маточных нервов в развитии гипералгезии, что стимулирует к их детальному изучению. Существующие на сегодня концепции предпола-

гают роль компрессии нервов очагами аденомиоза [2]. Однако ряд исследователей не выявил корреляций между выраженностью тазовой боли и количеством нервов вокруг эктопического эндометрия [3]. Доказано также, что наличие глубоких очагов аденомиоза и развитие боли было ассоциировано с повышением экспрессии фактора роста нервов NGF [4]. При этом NGF отводят роль не только в стимуляции роста, но и в повышении чувствительности нервных терминалей, что собственно и может вести к усилению ощущения боли [4]. С другой стороны, нельзя оставить без внимания тот факт, что ключевым проводником

роста нервов являются сосуды. Их наличие и рост считаются также эссенциальными факторами в прогрессии эндометриоза [5]. При этом вопрос о взаимоотношениях маточных сосудов и нервов при аденомиозе остается открытым.

**Цель** работы – оценить нейрососудистые отношения в стенке матки при аденомиозе.

#### **Материалы и методы**

Для морфологического исследования использовали фрагменты стенки матки, полученные после гистерэктомии у 16 пациенток с диффузным аденомиозом 2-3 степени в фазе пролиферации, сопровождающимся выраженным болевым синдромом. В качестве контроля использовали материал, полученный от 5 пациенток с бессимптомной лейомиомой. После гистерэктомии участки стенки матки, включающие эндометрий и миометрий, фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине (pH 7,4) в течение 24 часов. После дегидратации материал заливали в высоко очищенный парафин с полимерными добавками (Richard-Allan Scientific, США) при температуре не выше 60°C. Срезы толщиной 5±1 мкм получали на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса срезов STS (Carl Zeiss, Германия). По 2 среза с каждого блока помещали на адгезивное предметное стекло Super Frost Plus (Menzel, Германия). Общую морфологическую оценку срезов проводили при окраске гематоксилином и эозинном. Для оценки характера межклеточных cooperаций различные линии клеток визуализировали иммуногистохимически.

Оценку иннервационного аппарата матки проводили с использованием моноклональных антител (МАТ) к белкам нейрофиламентов. Для изучения глубины инвазии эктопического эндометрия и оценки состояния гладкой мышечной ткани миометрия и сосудов использовали МАТ к  $\alpha$ -актину гладких миоцитов ( $\alpha$ -SMA; Clone  $\alpha$ sm-1; DAKO). Кроме того, оценивали также экспрессию в клетках эндометрия и миометрия рецепторов к эстрогенам (ER) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Для «демаскировки» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR при 450W 3 раза по 3,5 мин. После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) наносили первичные антитела (RTU). Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (DAKO). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетической среде Permanent Mounting Medium

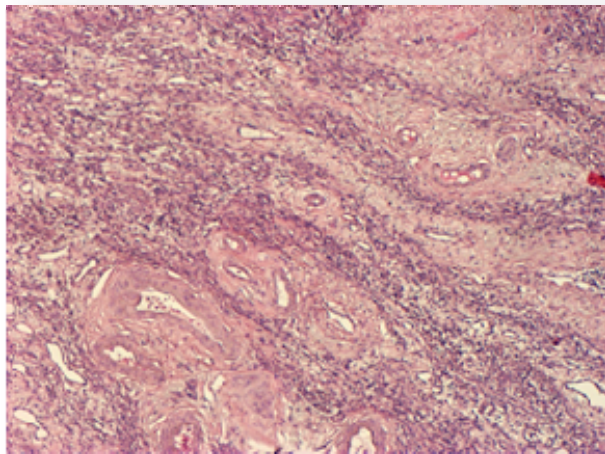
(DAKO). С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный морфометрический анализ, который проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1. Снимки выполнены на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония). Оценку результатов иммуногистохимического изучения экспрессии ER и VEGF проводили с использованием Q-N шкалы [6]. Для оценки количества нервных волокон использовали квадратно-узловую тест-систему. Среднее количество нервов, ассоциированных с очагами аденомиоза, оценивали следующим образом. Общее количество нервов в поле зрения при увеличении  $\times 200$  делили на количество квадратов, попадающих на участки расположения эктопического эндометрия. Аналогичным способом оценивали плотность нервных волокон в миометрии пациенток с аденомиозом и лейомиомой. Результаты представляли в виде среднего арифметического ( $\pm$ SD) количество нервов на миллиметр площади среза в эутопическом и эктопическом эндометрии, а также в миометрии. Процедуру подсчета выполняли дважды при участии двух независимых экспертов (двойное слепое исследование), неосведомленных о диагнозе и клинических характеристиках пациенток. Уровень конкордантности морфометрических результатов, полученных от независимых экспертов, составлял более 95%. Полученные данные обрабатывали в пакете MedCalc.

#### **Результаты и их обсуждение**

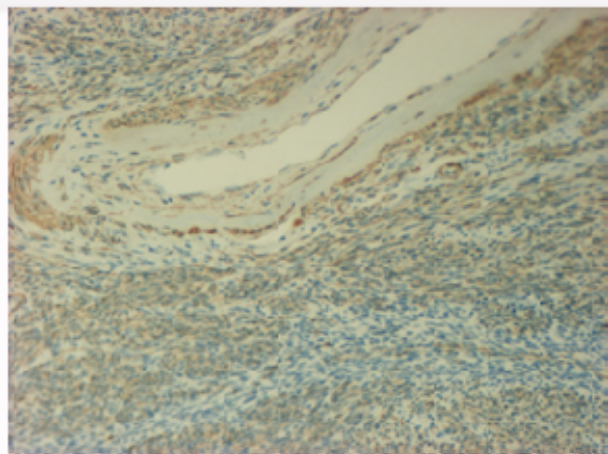
Изучение иннервационного аппарата матки при аденомиозе с помощью МАТ к белкам нейрофиламентов позволило выделить лишь единичные тонкие нервные волокна в области границы между эутопическим эндометрием и миометрием. Отдельные тонкие волокна визуализировались также вокруг очагов эктопического эндометрия, преимущественно вокруг конусов роста маточных желез. Более многочисленными оказались нервные волокна в миометрии – преимущественно вокруг крупных сосудов мезометрии (рис. 1). При этом артерии матки имели признаки дистрофии и гиалиноза, в средней оболочке отмечалась утрата экспрессии альфа-актина гладких миоцитов. Выявленные дистрофические изменения в стенке сосудов могут быть признаком нарушения нейрогуморальной регуляции и нарушения кровоснабжения матки, создающие условия для гипоксии/ишемии. Косвенным подтверждением этого была выраженная периваскулярная реакция стромы и явления неангиогенеза, сопровождающиеся активным ремоделированием миометрия. Данный феномен проявлялся диссоциацией гладких миоцитов миометрия на мелкие пучки, разделенные прослойками соединительной ткани, инфильтрированными лейко-

цитами. Интересно, что зоны ремоделирования миометрия сопровождалась активным ростом сосудов и нервов, и пронизывали всю толщу

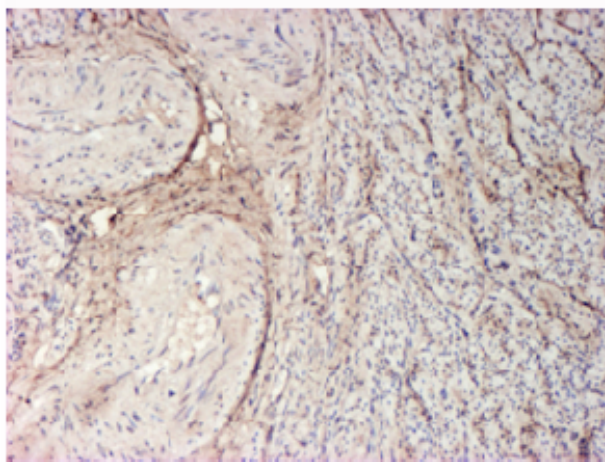
миометрия, формируя обширную нейроваскулярную сеть (рис. 1).



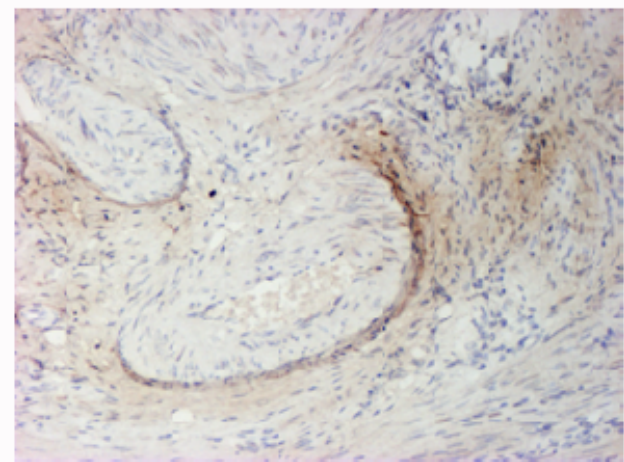
**А**



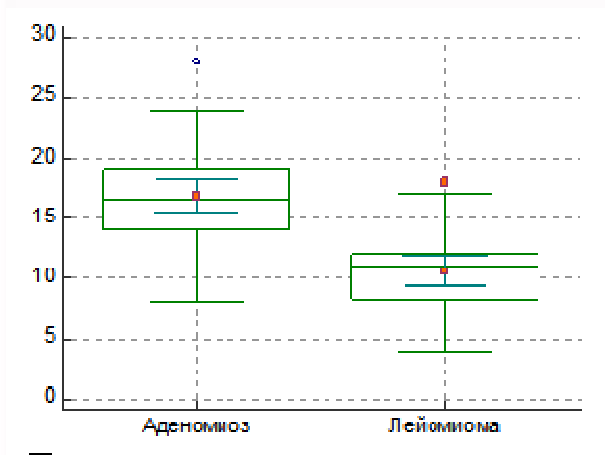
**Б**



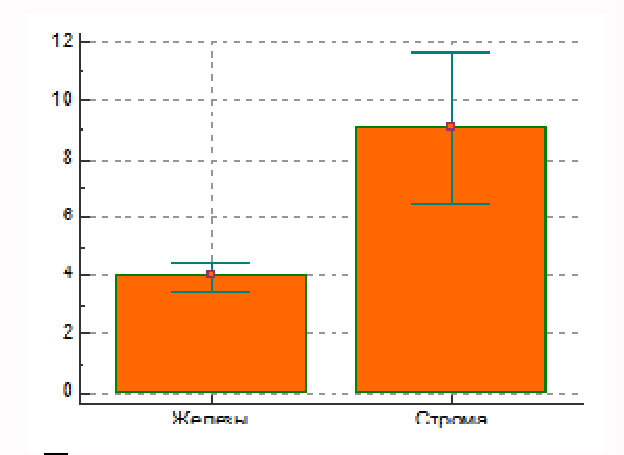
**В**



**Г**



**Д**



**Е**

Рис. 1. Нейрососудистые отношения в стенке матки. А – дистрофические изменения и гиалиноз маточных сосудов при аденомиозе (окраска гематоксилином и еозином, ув.200), Б – утрата экспрессии  $\alpha$ -SMA в стенке маточных артерий. В - Увеличение количества периваскулярных и интерстициальных нервных волокон у пациентки с аденомиозом, Г – периваскулярные нервы в миометрии при лейомиоме (ИГХ, МАТ к нейрофиламентам), Д – количество нервных волокон при аденомиозе и лейомиоме. Е – количество нервов вокруг эктопического эндометрия (железы) и вокруг сосудов (stroma) миометрия при аденомиозе.

Густое сплетение тонких нервных волокон было обнаружено также в субсерозном слое миометрия. При этом суммарное количество нервных волокон в слоях миометрия статистически значимо ( $p < 0,001$ ) превышало аналогичный показатель в группе сравнения. В отличие от больных основной группы, у пациенток с бессимптомной лейомиомой было выявлено превалирование нервных волокон преимущественно вокруг крупных сосудов миометрия при отсутствии широкого разветвленной интрамуральной сети волокон.

Увеличение количества нервов при аденомиозе, ассоциированном с синдромом тазовой боли, является вполне закономерным. Показано увеличение количества многочисленных сенсорных A $\delta$  и C-волокон, холинергических и ад-

рэнергических нервов, экспрессирующих NGF, Trk-A и p75, у пациенток с аденомиозом [5, 7]. Однако при этом в изучении механизмов боли при эндометриозе традиционно рассматривают нервные волокна, ассоциированные с очагами эктопического эндометрия [1]. Тогда как, по нашему мнению, акцент стоит перенести на иннервационный аппарат миометрия. Учитывая тот факт, что количество нервов в периваскулярном компартменте миометрия было существенно выше, чем вокруг очагов аденомиоза, логично предположить, что причиной формирования синдрома тазовой боли у пациенток с аденомиозом является не столько сдавление нервов в зоне эктопического эндометрия, сколько ремоделирование самого миометрия, сопровождающееся изменением нейрососудистых отношений.

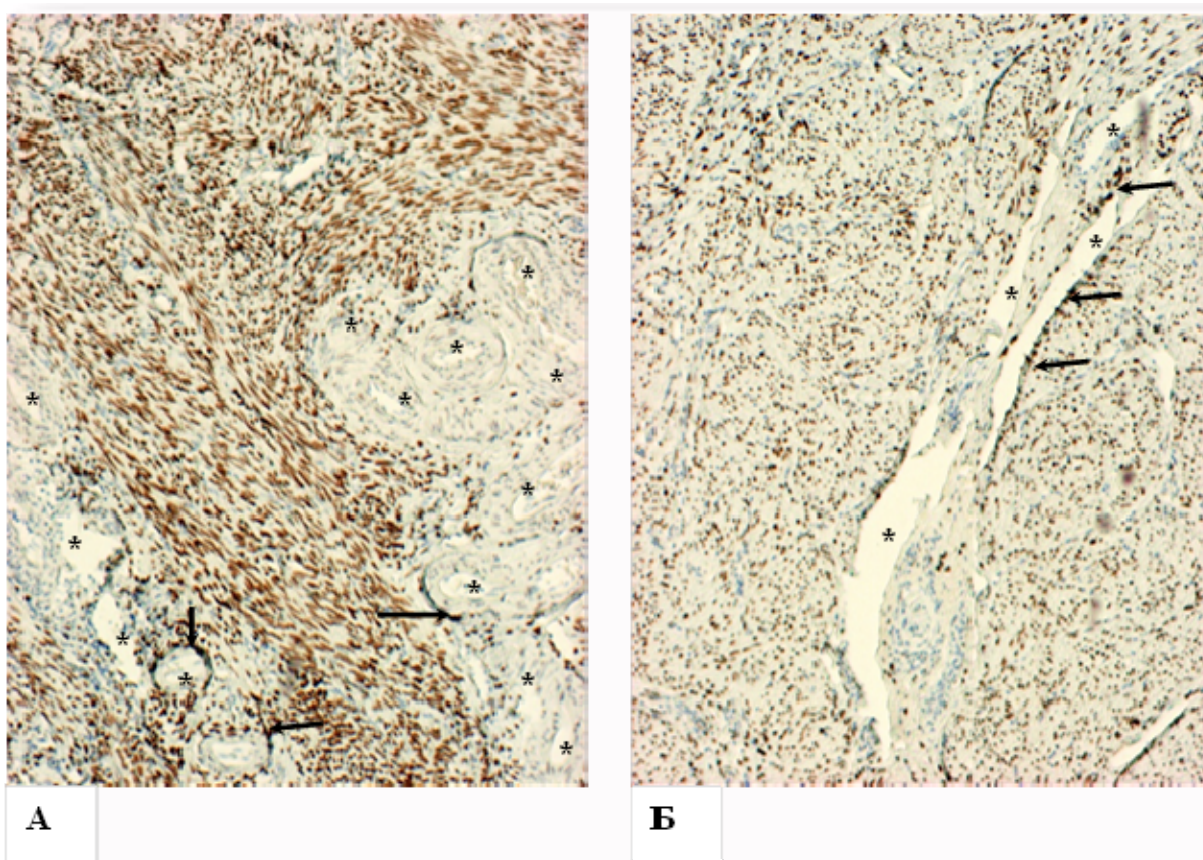


Рис. 2. Отсутствие экспрессии ER в стенке маточных сосудов (звездочки). В отдельных клетках сосудов и стромы - высокая экспрессия ER (стрелки). Примечание. Иммуногистохимическое исследование с использованием МАТ к ER. А – сосудистый слой эндометрия, снижена экспрессия ER в стенке сосудов, отдельные иммунопозитивные клетки в адвентиции крупных сосудов (стрелки), Б – ER-позитивные клетки в стенке мелких сосудов миометрия,  $\times 200$ .

Факт стимуляции ангиогенеза при аденомиозе – вполне закономерный. Как известно, инвазия, выживание и рост эктопического эндометрия определяется параметрами трофики, условием обеспечения которой является стимуляция ангиогенеза [5, 8]. Действительно, как было показано выше, в эндометрии и миометрии на фоне инфильтрации стромы зарегистрировано

увеличение количества сосудов. Учитывая, эстроген-зависимый характер заболевания, логично было выяснить, связан ли процесс ангиогенеза с уровнем чувствительности к эстрогенам. О роли эстрогенов в развитии синдрома тазовой боли у пациенток с аденомиозом свидетельствует уже тот факт, что гормональная терапия ведет к снижению болевых ощущений и ограничивает ин-

тенсивный рост нервов [6, 9]. Однако, оценка экспрессии ER в миометрии пациенток с аденомиозом выявила весьма неожиданные результаты. На фоне повышенного уровня эстрадиола в крови и высокой экспрессии ER в эпителии эутопического и эктопического эндометрия, обнаружено снижение или полное отсутствие экспрессии ER в стенке крупных артерий и в сосудах микроциркуляторного русла миометрия (рис. 2).

Учитывая тесную ассоциацию нервов с сосудами и зафиксированный факт увеличения количества сосудов в миометрии, важно было

также проанализировать источники продукции ключевого стимулятора ангиогенеза – фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [5, 10]. Характерно, что экспрессия VEGF у пациенток аденомиозом статистически значимо превышала аналогичные показатели у больных с лейомиомой, как в клетках эутопического эндометрия ( $p < 0,01$ ) и гладких миоцитах миометрия ( $p < 0,05$ ), так и в строме ( $p < 0,001$ ). Наиболее выраженной экспрессия VEGF была зарегистрирована в покровном эпителии и железах эндометрия. Высокой оказалась цитоплазматическая экспрессия VEGF и в эпителии очагов аденомиоза (рис. 3).

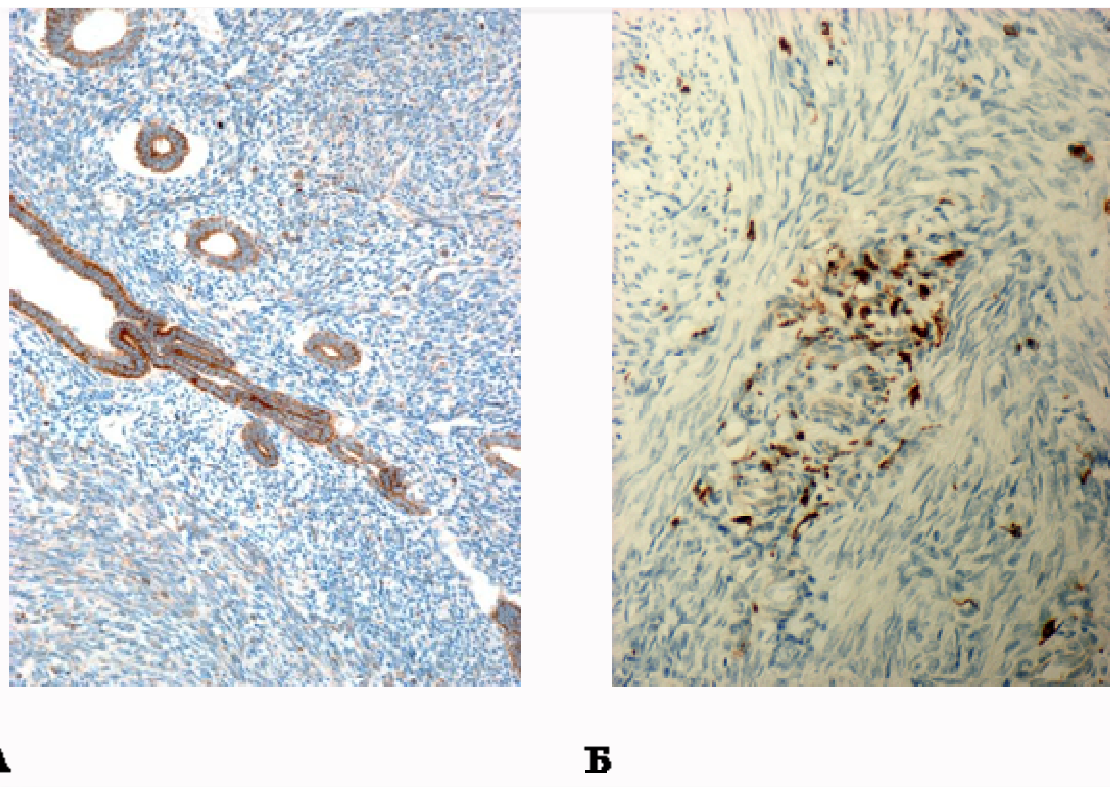


Рис. 3. Экспрессия VEGF в очагах аденомиоза (А) и периваскулярно в зонах ремоделирования миометрия (Б). Иммуногистохимическое исследование с использованием МКАТ к VEGF,  $\times 200$  (А),  $\times 400$  (Б).

Довольно обширной оказалась экспрессия VEGF в миометрии пациенток с аденомиозом, хотя большинство гладких миоцитов имели слабую или умеренную цитоплазматическую реакцию на VEGF. Интересно, что в мезометрии экспрессия VEGF была обнаружена в стенке сосудов, где продуцентами данного фактора роста чаще всего являлись гладкие миоциты и клетки адвентиции сосудов. В участках ремоделирования миометрия VEGF-позитивные клетки обнаруживались в зонах периваскулярных инфильтратов, вероятно, отражая участие иммунокомпетентных клеток в стимуляции ангиогенеза и ремоделировании иннервационного аппарата матки. Умеренная экспрессия VEGF определялась также в эндотелии тонкостенных венозных сосу-

дов миометрия в участках его ремоделирования. Это, по сути, предполагает включение не только паракринных, но и аутокринных механизмов стимуляции неоангиогенеза, неотъемлемым условием которого считается активация HIF-1 $\alpha$  [10]. Причиной повышения экспрессии последнего могут быть описанные выше дистрофические и склеротические изменения в стенке крупных артерий миометрия, предопределяющие хроническую ишемизацию стенки матки.

#### Заключение

Таким образом, оценка нейрососудистых отношений показала, что наиболее многочисленными оказались нервы, ассоциированные с крупными сосудами и зонами ремоделирования миометрия. Одним из факторов, детерминирующих

рост нервов, может быть перестройка сосудисто-го русла и миометрия в целом, на фоне дистрофических изменений крупных сосудов и усиленной экспрессии VEGF. Экспрессия VEGF была сопряжена с эктопическим ростом эндометрия и воспалительным ремоделированием миометрия.

#### Перспективы дальнейших разработок

### Литературные источники References

1. Taylor RN, Hummelshoj L, Stratton P, Vercellini P. Pain and endometriosis: Etiology, impact, and therapeutics. Middle East Fertil Soc J. 2012 Dec 1;17(4):221-25. PMID: 23730148; PMCID: PMC3665417.

2. Tulandi T, Felemban A, Chen MF. Nerve fibers and histopathology of endometriosis-harboring peritoneum. J Am Assoc Gynecol Laparosc. 2001 Feb;8(1):95-8. PMID: 11172122.

3. Atwal G, du Plessis D, Armstrong G, Slade R, Quinn M. Uterine innervation after hysterectomy for chronic pelvic pain with, and without, endometriosis. Am J Obstet Gynecol. 2005 Nov;193(5):1650-5. PMID: 16260205.

4. Anaf V, Simon P, El Nakadi I, Fayt I, Simonart T, Buxant F, Noel JC. Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. Hum Reprod. 2002 Jul;17(7):1895-900. PMID: 12093857.

5. Laschke MW, Giebels C, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. Hum Reprod Update. 2011 Sep-Oct;17(5):628-36. doi: 10.1093/humupd/dmr023. PMID: 21586449.

6. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in

Изучение механизмов, определяющих стимуляцию ангиогенеза и роста нервов, а также выяснение роли иммунокомпетентных клеток в процессах ремоделирования стенки матки при аденомиозе, позволит оптимизировать лечебную тактику при данной патологии.

endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. Hum Reprod. 2010 Mar;25(3):642-53. doi: 10.1093/humrep/dep437. PMID: 20008888.

7. Li Y, Zhang S, Xu L. [Expression of nerve growth factor produced by ectopic endometrium from patients with adenomyosis and its relationship with pain scales and innervation]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2014 Feb;49(2):120-4. Chinese. PMID: 24739644.

8. Zhang XM, Huang XF, Xu H, Quinn M. Endometriosis: a consequence of varying injuries to pelvic autonomic nerves. Fertil Steril. 2012 Dec;98(6):e29. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.10.002. PMID: 23084268.

9. Huang TS, Chen YJ, Chou TY, Chen CY, Li HY, Huang BS, Tsai HW, Lan HY, Chang CH, Twu NF, Yen MS, Wang PH, Chao KC, Lee CC, Yang MH. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. J Cell Mol Med. 2014 Jul;18(7):1358-71. doi: 10.1111/jcmm.12300. PMID: 24758741; PMCID: PMC4124020.

10. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. Nat Rev Endocrinol. 2014 May;10(5):261-75. doi: 10.1038/nrendo.2013.255. PMID: 24366116.

#### Оразов М., Сулаєва О.Н., Носенко Є.Н. Нейросудинні відношення в стінці матки при аденоміозі, ускладненому синдромом тазової болі.

**Резюме.** В роботі проведено морфологічний та імуногістохімічний аналіз нейросудинних відносин у стінці матки за умов аденоміозу, ускладненого синдромом тазового болю. Матеріал отримано після гістеректомії від 16 пацієнок фертильного віку з дифузійним аденоміозом 2-3 ступеня у фазі проліферації. До групи порівняння увійшов матеріал, отриманий від пацієнок аналогічного віку з безсимптомною лейоміомою. За умов аденоміозу встановлено зростання кількості нервів навколо великих судин, у зонах ремоделювання міометрію та навколо ділянок ектопічного ендометрію ( $p < 0,001$ ). Ріст нервів був асоційований з дистрофічними змінами маткових судин, зниженням їх чутливості до естрогенів при стимуляції ангиогенезу на тлі підвищеної експресії фактору росту судинного ендотелію ( $p < 0,01$ ). Основними джерелами VEGF були епітелій ектопічного ендометрію, та клітини із зон запального ремоделювання міометрію.

**Ключові слова:** аденоміоз, нерви, ангиогенез, ремоделювання.