

## МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.15

DOI 10.26456/vtchem2023.4.20

### ИССЛЕДОВАНИЯ АПОПТОЗА КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ ЭНДОМЕТРИЯ

Н.В. Боровкова<sup>1,2</sup>, М.М. Дамиров<sup>1</sup>, О.Н. Олейникова<sup>1</sup>,  
Г.П. Титова<sup>1</sup>, Ю.В. Андреев<sup>1</sup>, Г.А. Нефедова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи  
им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»,  
Москва

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного  
профессионального образования» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Москва

Представлены данные об изменении содержания апоптотических клеток эндометрия у пациенток с гиперплазией эндометрия (ГЭ) без атипии и с полипами эндометрия (ПЭ). Отмечено, что у пациенток с ГЭ без атипии отсутствовала, свойственная нормальному эндометрию, цикличность изменения содержания апоптотических клеток. При ПЭ циклический характер индукции программируемой смерти в клетках эндометрия сохранялся, но отмечалось снижение апоптоза в фазу поздней секреции. Выявлено значимое увеличение в плазме крови концентрации TRAIL у пациенток, как с ГЭ без атипии, так и с ПЭ. У пациенток с ПЭ также отмечено увеличение концентрации фактора некроза опухолей альфа в плазме крови.

**Ключевые слова:** гиперплазия эндометрия, полипы эндометрия, апоптоз клеток эндометрия, Fas, Fas лиганд, фактор некроза опухолей альфа, TRAIL.

В настоящее время гиперплазия эндометрия (ГЭ) представляет одну из наиболее актуальных проблем современной гинекологии. Неослабевающий интерес к данной проблеме обусловлен значительным возрастанием частоты данной патологии, которая диагностируется у 38-77% женщин репродуктивного и перименопаузального возрастов, а также возможностью ее озлокачествления [1,2].

Этиология и патогенез пролиферативных заболеваний матки остается в центре внимания ученых, однако ведущие факторы развития и прогрессирования этой патологии до настоящего времени не до конца ясны. Одним из перспективных направлений в изучении патогенеза этой патологии является исследование апоптоза и пролиферации клеток

эндометрия, так как может позволить решить новые стратегии в лечении больных с данной патологией.

**Цель** – провести сравнительный анализ содержания апоптотических клеток в крови и ткани эндометрии у больных с разными видами гиперпластических процессов эндометрия (ГЭ).

### **Материал и методы исследования**

В исследование включено 78 пациенток репродуктивного возраста, проходивших лечение в отделении гинекологии ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ в 2021-2023 годах. Возраст пациенток колебался от 20 до 49 лет (средний возраст  $42,8 \pm 4,27$  лет). Всем обследованным пациенткам было выполнено раздельное лечебно-диагностическое выскабливание цервикального канала и стенок полости матки под гистероскопическим контролем. В зависимости от результатов морфологического исследования больные были распределены на 3 группы. 1 группу составили 19 больных с ГЭ без атипии; 2 группу образовали 32 больные с полипом эндометрия (ПЭ); в состав 3 группы вошли 12 пациенток с сочетанным поражением ГЭ без атипии и ПЭ. В группу сравнения были включены 15 пациенток репродуктивного возраста без гинекологической патологии. Критериями исключения являлось наличие атипии эндометрия при гистологическом исследовании.

Оценку количества апоптотических клеток эндометрия проводили по разработанной методике. Забор биоматериала осуществляли у пациенток непосредственно перед проведением лечебно-диагностического выскабливания матки. Под общим обезболиванием в полость матки вводили мягкий ершик и делали несколько вращательных движений. Затем ершик с биоматериалом помещали в пластиковую пробирку с раствором Хенкса и немедленно доставляли в лабораторию, где ершик аккуратно отжимали и осаждали клетки путем центрифугирования в течение 5 минут при 400 g и  $+4^{\circ}\text{C}$ . После этого из пробирок отбирали надосадочную жидкость, а осадок ресуспендировали в 100 мкл аннексин-буфера, содержащего ионы кальция. Далее в пробирку вносили по 20 мкл Аннексин V-FITC и 7 AAD и инкубировали в течение 20 минут при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ . Учет результатов исследования проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

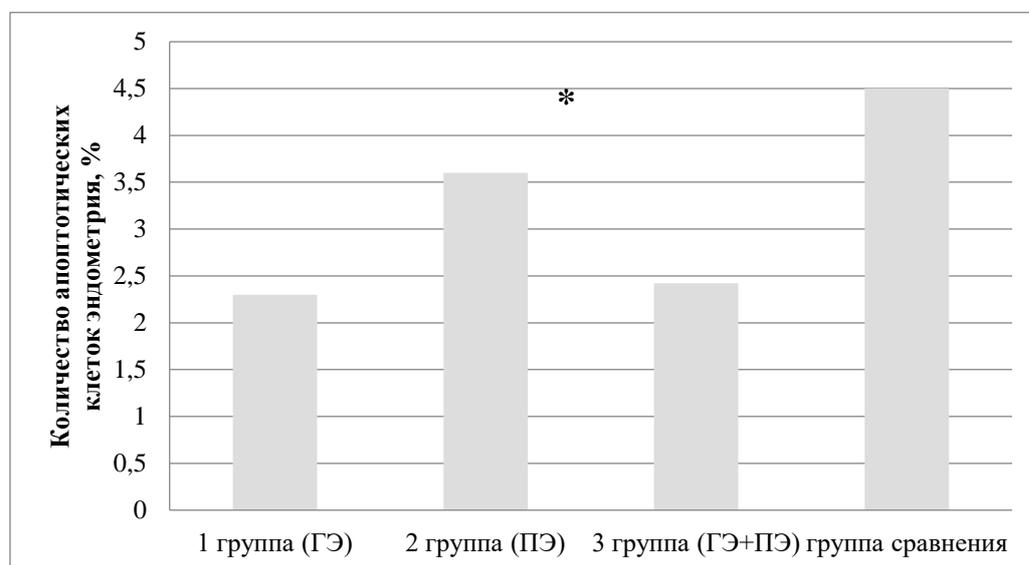
Для определения концентрации в плазме белков регуляторов апоптоза у пациенток во время операции из кубитальной вены забирали кровь в пробирку с ЭДТА. На платформе Luminex 200 (технология xMAP), используя набор EMD Millipore's MILLIPLEXmap Human Circulating Biomarker определяли концентрацию следующих молекул: находящиеся в растворе Fas рецептор (sFas) и Fas лиганд (sFasL), фактор некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ) и лиганд, индуцирующих апоптоз,

связанный с фактором некроза опухолей (TRAIL). Результаты полученных исследований выражали в пг/мл и нг/мл.

При статистической обработке данных пользовали методы вариационной статистики. Все данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартиля. Нормальность распределения рассчитывали с применением критерия Колмагорова-Смирнова. Поскольку большинство исследуемых показателей не имели нормального распределения, для сравнения данных применяли U-критерий Манна-Уитни. Критическое значение уровня значимости составило  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

При анализе клеточного материала, полученного из полости матки, отмечено, что медианные значения количества апоптотических клеток у пациенток сравниваемых групп были схожие (рис. 1). Достоверные различия между числом клеток эндометрия в процессе апоптоза, выявлены, только при сравнении показателей пациенток 1 и 2 групп – 2,3 (1,1; 3,2)% и 3,57(2,4; 4,7)%, соответственно.



\* –отличия между 1 и 2 группами статистически значимы ( $p=0,024$ , U критерий Манна-Уитни)

Рис. 1. Относительное количество апоптотических клеток эндометрия у пациенток сравниваемых групп

Обращала на себя внимание высокая вариативность полученных данных у пациенток группы сравнения, у которых количество апоптотических клеток регистрировали в пределах от 0,13% до 14,6%. Во

2 группе больных концентрация клеток в апоптозе также широко варьировала от 0,78 % до 11,9%. В то время как в 1 и 3 группах количество апоптотических клеток было в пределах от 0,12% до 4,85% и от 1,12% до 5,6% соответственно. Известно, что в неизмененном эндометрии индукция апоптоза клеток зависит от фазы менструального цикла и регулируется изменением гормональных параметров [3, 4, 5, 6]. При дальнейшем анализе во 2 группе и в группе сравнения были проанализированные данные, полученные у пациенток в фазе пролиферации (подгруппа 1) и в фазе поздней секреции (подгруппа 2). Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание апоптотических клеток эндометрия у пациенток сравниваемых групп

Группы		Количество апоптотических клеток в соскобе эндометрия	Значимость различий
1 группа (ГЭ)		2,3 (1,1; 3,3)	$p_3=0,201$ $p_4=0,001$
2 группа (ПЭ)	Фаза пролиферации (подгруппа 1)	1,7 (1,2; 2,8)	$p=0,003$ $p_1=0,274$ $p_2=0,024$
	Фаза поздней секреции (подгруппа 2)	4,1 (2,9; 5,9)	
3 группа (ГЭ+ПЭ)		2,4 (1,5; 3,4)	$p_3=0,072$ $p_4=0,010$
Группа сравнения	Фаза пролиферации (подгруппа 1)	1,3 (0,4; 2,4)	$p=0,002$
	Фаза поздней секреции (подгруппа 2)	6,5 (4,8; 8,8)	

$p$  - значимость различий у пациенток в фазу пролиферации и фазу поздней секреции

$p_1$  - значимость отличий у пациенток группы сравнения и 2 группы в фазу пролиферации

$p_2$  - значимость отличий у пациенток группы сравнения и 2 группы в фазу поздней секреции

$p_3$  - значимость отличий у пациенток 1 и 3 групп с фазой пролиферации группы сравнения

$p_4$  - значимость различий у пациенток 1 и 3 групп с фазой поздней секреции группы сравнения

Установлено, что количество апоптотических клеток в фазе поздней секреции было значимо выше, чем в фазе пролиферации, как у пациенток из 2 группы, так и у женщин из группы сравнения. Следует отметить, что в фазу поздней секреции количество клеток эндометрия в процессе апоптотической гибели у пациенток из 2 группы было достоверно ниже ( $p=0,024$ ) и составило 4,1 (2,9; 5,9)%, против 6,5 (4,8; 8,8,)% у пациенток группы сравнения. У пациенток из 1 и 3 наблюдаемых групп цикличность изменения содержания апоптотических клеток эндометрия выявить не удалось. При этом содержание в эндометрии клеток в апоптозе у пациенток этих групп было достоверно ниже, чем в фазу поздней секреции у женщин группы сравнения.

Таким образом, использование данной методики исследования апоптотической гибели клеток эндометрия, подтвердило результаты, полученные с помощью применения других методик, представленных в литературе [3, 7, 8]. Так, в норме снижение концентрации эстрогенов и прогестерона в конце менструального цикла приводит к массовому апоптозу клеток эндометрия [8, 9] в конце секреторной фазы. Тогда как фаза пролиферации характеризуется наименьшим содержанием апоптотических клеток, когда под действием эстрогенов отмечается повышение пролиферативной активности в эндометрии [8, 9]. Развитие ГЭ сопровождается потерей цикличности изменений и снижением количества апоптотических клеток эндометрия, что было отмечено у пациенток из 1 и 3 групп. У больных из 2 группы, несмотря на то, что цикличность изменений сохраняется, количество апоптотических клеток эндометрия в фазу поздней секреции было значимо ниже, чем в группе сравнения. По всей видимому, формирование ПЭ связано с начальным этапом дисрегуляции процессов инициации апоптотической гибели клеток эндометрия [8, 10].

Для более полного понимания механизмов нарушения регуляции апоптотической гибели клеток эндометрия был проведен анализ содержания в плазме крови белков регуляторов внешнего пути апоптоза. Результаты определения концентрации sFas, sFasL, TNF- $\alpha$  и TRAIL представлены в табл. 2.

В результате проведенного исследования было отмечено, что концентрация растворимой молекулы Fas в плазме крови пациенток исследуемых групп существенно не различалась. На поверхности клетки рецептор Fas является проводником сигнала к запуску апоптотической гибели. Иницирующим соответствующий сигнал агентом служит FasL, которым может быть фиксирован на клеточной поверхности или находится в растворенной форме. В свою очередь, присутствующий в растворе Fas (sFas) играет роль ловушки, связывая соответствующий лиганд, и препятствуя запуску апоптоза клеток. Содержание sFasL, проапоптотического фактора у женщин основных групп варьировал в широком диапазоне значений. Поэтому, несмотря на высокие медианные

значения этого показателя у пациенток из 2 и 3 групп, статистически значимых отличий от данных у группы сравнения выявить не удалось. Полученные результаты согласуются с данными научной литературы, где также было отмечено отсутствие значимых отличий в концентрации sFasL в сыворотки крови пациенток с ГЭ [11]. Следует отметить, что цитируемыми выше авторами было показано достоверное снижение sFasL в аспирате из полости матки у женщин ГЭ без атипии и, напротив, повышение его уровня у пациенток с ПЭ. Таким образом, путь индукции апоптоза клеток эндометрия, опосредованного системой Fas/FasL, может быть вовлечен в развитие ГЭ, однако детализация этого процесса требует дальнейшего изучения.

Таблица 2

Концентрация белков регуляторов апоптоза в плазме крови у больных с разными формами ГПЭ

Показатели	1 группа n=13	2 группа n=25	3 группа n=12	Группа сравнения n=10
sFas, нг/мл	1,74 (1,34; 1,90) p=0,483	1,76 (1,27; 1,97) p=0,439 p <sub>1</sub> =0,832	1,67 (1,38; 2,01) p=0,314 p <sub>1</sub> =0,810 p <sub>2</sub> =0,936	1,55 (1,23; 1,76)
sFasL, пг/мл	17,3 (12,6; 56,8) p=0,208	21,7 (11,5; 43,6) p=0,240 p <sub>1</sub> =0,761	25,0 (8,5; 47,8) p=0,123 p <sub>1</sub> =0,894 p <sub>2</sub> =0,860	15,7 (11,5; 22,5)
TNF $\alpha$ , пг/мл	14,4 (11,1; 27,6) p=0,057	14,1 (10,3; 19,4) <b>p=0,045</b> p <sub>1</sub> =0,976	17,2 (9,4; 24,5) p=0,123 p <sub>1</sub> =0,852 p <sub>2</sub> =0,761	10,2 (5,2; 13,3)
TRAIL, пг/мл	<b>206,3</b> <b>(165,8;</b> <b>220,5)</b> <b>p=0,004</b>	<b>185,0</b> <b>(137,2;</b> <b>216,2)</b> <b>p=0,025</b> p <sub>1</sub> =0,447	<b>228,5</b> <b>(188,2;</b> <b>263,6)</b> <b>p=0,004</b> p <sub>1</sub> =0,225 <b>p<sub>2</sub>=0,045</b>	150,4 (139,9; 158,1)

p – значимость различий показателей у пациенток основных групп с группой сравнения (критерий U Манна-Уиттнни)

p<sub>1</sub> – значимость различий показателей у пациенток 2 и 3 групп по сравнению с 1 группой

p<sub>2</sub> – значимость различий показателей у пациенток 3 группы по сравнению со 2 группой

Фактор некроза опухолей альфа также может приводить к инициации апоптоза клеток при связывании с рецептором первого типа (TNFR1), присутствующим на большинстве клеток организма. Кроме того, он является провоспалительным цитокином, вырабатываемым макрофагами в ответ на действующий патоген, приводящий к развитию ГЭ. Установленные более высокие концентрации TNF- $\alpha$  у пациенток с ПЭ, по сравнению с группой сравнения, может быть обусловлено наличием воспалительного генеза, нередко лежащего в основе развития данной патологии.

Концентрация еще одного индуктора внешнего пути апоптотической гибели клеток, лиганда, связанного с фактором некроза опухоли (TRAIL) была достоверно повышена у пациенток из трех исследуемых групп. При этом наиболее высокие значения TRAIL отмечали у больных при развитии сочетанной патологии. Это согласуется с данными литературы [12]. Вместе с тем, у пациенток с Э концентрация TRAIL в плазме крови была достоверно ниже, по сравнению с данными у больных с сочетанной формой поражения, наблюдаемые в 3 группе.

Таким образом, в крови у больных с ГЭ без атипии и с ПЭ отмечается увеличение содержание в крови факторов, действующих на рецепторы внешнего пути запуска апоптоза. При этом уровень апоптотических клеток в эндометрии у больных из этих групп, напротив, снижается, что свидетельствует о нарушении индукции апоптоза опосредованного внешним воздействием через соответствующие рецепторы. Одним из вероятных механизмов нарушения передачи сигнала апоптоза могут быть изменения экспрессии рецепторов TRAIL на поверхности клеток эндометрия. Как правило, клетки экспрессируют несколько типов рецепторов для TRAIL. Одни из них (DR4 и DR5) имеют цитоплазматический домен, через которые опосредовано проведение активационного сигнала, а также активация иницирующей каспазы 8 и каскада реакций клеточной гибели [13].

В то же время присутствие рецепторов ловушек (DcR1 и DcR2) не имеющих цитоплазматической части, не позволяет инициировать процесс программируемой клеточной смерти. Следует отметить, что было отмечено уменьшение экспрессии DR4 и DR5 рецепторов и увеличение рецепторов ловушек на клетках эндометрия у больных с эндометриальной аденокарциномой и при диагностике ГЭ с атипией [14]. Возможно, изменения экспрессии рецепторов TRAIL могут присутствовать уже и при начальном развитии ГЭ.

### Заключение

В основе патогенетических механизмов развития ГЭ лежит нарушение клеточного гомеостаза, обусловленное дисрегуляцией процессов апоптоза и пролиферации клеток. Так, у пациенток значительно увеличивается концентрация индуцирующего апоптоз фактора, связанного с фактором некроза опухолей (TRAIL), при этом количество апоптотических клеток в эндометрии, напротив снижается. Причиной такого обратного эффекта может быть нарушение экспрессии рецепторов TRAIL на клетках эндометрия, что требует дальнейшего изучения. Достоверного изменения концентрации другого активатора внешнего пути апоптоза – семейства фактора некроза опухолей, растворимого Fas лиганда не выявлено.

### Список литературы

1. Акушерство и гинекология: клинические рекомендации / под ред. Г.М. Савельевой, В.Н. Серова, Г.Т. Сухих. -4-е изд., перераб. и доп. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019.- 1008 с.
2. Гинекология: национальное руководство / под ред. В.И. Кулакова, И.Б. Манухина, Г.М. Савельевой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.- 1088 с.
3. Манько, В.М. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы / В.М. Манько, Д.А. Девришов. – Москва: Агровет, 2011. – 752 с.
4. Changes in expression of some apoptotic markers in different types of human endometrium / D. Driák, M. Dvorská, I. Švandov [et al.] // Folia Biologica (Czech Republic).- 2011.- Vol. 57, N. 3.- P. 104-111.
5. Comparative effects of SPRM asoprisnil (J867) on proliferation, apoptosis, and the expression of growth factors in cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells / N. Ohara, A. Morikawa, W. Chen [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2007.- Vol. 14, N. 8. – Suppl. - P. 20-27.
6. Mayer, B. Mitochondrial Regulation of Apoptosis / B. Mayer, R. Oberbauer // *News Physiol. Sci.*- 2003.-Vol. 18.- P. 89-94.
7. Эндометрий. Атлас / Г. Х. Толибова, Т. Г. Траль, И. Ю. Коган, А. А. Олина. – Москва: Медиабюро StatusPraesens, 2022. - 184 с.
8. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation / H.O.D. Critchley, J.A. Maybin, G.M. Armstrong, A.R.W. Williams // *Physiol. Rev.*- 2020.-Vol 100.-P. 1149 –1179.
9. Apoptosis-related proteins and steroid hormone receptors in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium / Ö. Bozdoğan, P. Atasoy, S. Erekul [et al.] // *Int. J. Gynecol Pathol.*- 2002.- Vol. 21, N. 4.- P.375-382.
10. Крыжановский Г.Н. Дисрегуляционная патология.– М.: Медицина, 2002. – 630 с.
11. Лысенко О.В. Секреция цитокинов и sFas-лиганда при гиперпластических процессах и полипах эндометрия в пременопаузальном возрасте: новый подход к противорецидивной терапии // «Репродуктивное здоровье. Восточная Европа» № 4 (34) 2014. – С. 14-22

12. Membrane expression of trail receptors DcR1 and DcR2 in the normal endometrium, endometrial atypical hyperplasia and endometrioid endometrial cancer / L. Gottwald, G. Pasz-Walczak, J. Piekarski [et al.] // J. Obstet. Gynaecol.- 2014 May; 34(4):346-9. doi: 10.3109/01443615.2014.889667.
13. Membrane expression of TRAIL receptors DR4, DR5, DcR1 and DcR2 in the normal endometrium, atypical endometrial hyperplasia and endometrioid adenocarcinoma: a tissue microarray study / L. Gottwald, J. Piekarski, R. Kubiak [et al.] // Arch. Gynecol. Obstet.- 2013 Oct; 288(4):889-99. doi: 10.1007/s00404-013-2840-x
14. Membrane expression of the death ligand trail receptors DR4 and DR5 in the normal endometrium, endometrial atypical hyperplasia and endometrioid endometrial cancer / L. Gottwald, J. Szwaliski, J. Piekarski [et al.] // J. Obstet. Gynaecol.- 2013.- Vol.33, N.5.- P.512-518. doi: 10.3109/01443615.2013.790886.

*Об авторах:*

БОРОВКОВА Наталья Валерьевна – доктор медицинских наук, заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», доцент кафедры клинической и лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, e-mail: Borovkovanv@sklif.mos.ru;

ДАМИРОВ Михаил Михайлович – профессор, доктор медицинских наук, заведующий научным отделением острых гинекологических заболеваний ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», e-mail: damirov@inbox.ru

ОЛЕЙНИКОВА Ольга Николаевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения острых гинекологических заболеваний ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», e-mail: onoleynikova@list.ru

ТИТОВА Галина Павловна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий научным отделением патологической анатомии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», TitovaVV@sklif.mos.ru

АНДРЕЕВ Юлий Вадимович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», e-mail: AndreevUV@sklif.mos.ru

НЕФЕДОВА Галина Александровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения патологической анатомии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», e-mail: NefedovaGA@sklif.mos.ru

## **STUDIES OF ENDOMETRIAL CELL APOPTOSIS IN PATIENTS WITH HYPERPLASTIC PROCESSES OF THE ENDOMETRIUM**

**N.V. Borovkova<sup>1,2</sup>, M.M. Damirov<sup>1</sup>, O.N. Oleinikova<sup>1</sup>, G.P. Titova<sup>1</sup>, Yu.V. Andreev<sup>1</sup>, G.A. Nefedova<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>State Budgetary Healthcare Institution of Moscow "N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine of the Moscow Department of Healthcare", Moscow*

*<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education "Russian Medical Academy of Continuing Professional Education" of the Ministry of Health of the Russian Federation Federation, Moscow*

Data on changes in the content of endometrial apoptotic cells in patients with endometrial hyperplasia (GE) without atypia and with endometrial polyps (PE) are presented. It was noted that patients with GE without atypia had no cyclical changes characteristic of normal endometrium. In PE, the cyclic nature of induction of programmed death in endometrial cells persisted, but there was a decrease in apoptosis in the late secretion phase. A significant increase in the blood plasma concentration of TRAIL was revealed in patients with both GE without atypia and PE. Patients with PE also showed an increase in the concentration of tumor necrosis factor alpha in blood plasma.

**Keywords:** *endometrial hyperplasia, endometrial polyps, endometrial cell apoptosis, Fas, Fas ligand, tumor necrosis factor alpha, TRAIL.*

Дата поступления в редакцию: 04.09.2023.

Дата принятия в печать: 20.09.2023.