

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 61.618

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-157-161

## ЗНАЧЕНИЕ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ЭКСПРЕССИИ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА-1 ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ ТЕЧЕНИИ ЭНДОМЕТРИОЗА ЯИЧНИКОВ

*Николь Николаевна Петровская<sup>1✉</sup>, Виктория Анатольевна Печеникова<sup>2</sup>*

<sup>1,2</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>1</sup>*dr.ramzaeva@mail.ru* ✉

<sup>2</sup>*p-vikka@mail.ru*

**Резюме.** Введение. Повышенный уровень трансформирующего фактора роста-β1 (TGF-β1) может быть причиной нарушения иммунного ответа у женщин с эндометриозом из-за его способности снижать активность НК-клеток, что способствует выживанию эктопических клеток эндометрия в брюшной полости и играет ключевую роль в прогрессировании заболевания.

**Материалы и методы.** Изучено 196 наблюдений эндометриом, выполнено иммунологическое исследование периферической крови с определением CD3-CD16/56<sup>+</sup> (натуральных киллеров) и ИГХ-исследование экспрессии TGF-β1 в капсуле эндометриоидной кисты и в сохраненной цитогенной строме.

**Результаты.** ИГХ-исследовании показало, что площадь экспрессии TGF-β1 была значимо большей в операционном материале при рецидивирующем течении эндометриоза, иммунологическое исследование выявило достоверное снижение НК-клеток при повторном возникновении эндометриом.

**Выводы.** Дальнейшее изучение взаимосвязи TGF-β1 и НК-клеток может иметь значение в качестве прогностических маркеров рецидивирующего течения эндометриоза.

**Ключевые слова:** эндометриоидная киста яичника, рецидив, эндометриома, трансформирующий фактор роста-β1, НК-клетки

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

## THE VALUE OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS AND EXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 IN RECURRENT OVARIAN ENDOMETRIOSIS

*Nicole N. Petrovskaya<sup>1✉</sup>, Victoria A. Pechenikova<sup>2</sup>*

<sup>1,2</sup>I.I. Mechnikov Northwestern State Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>1</sup>*dr.ramzaeva@mail.ru* ✉

<sup>2</sup>*p-vikka@mail.ru*

**Resume.** Affiliation. Federal state budgetary educational institution of higher education «North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov» under the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg

**Introduction.** Elevated level of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) can be the cause of impaired immune response among women with endometriosis due to its ability to reduce the activity of NK-cells, which contributes to the survival of ectopic endometrial cells in the abdominal cavity and plays a key role in the progression of the disease.

**Materials and methods.** 196 endometrioma observations were studied, an immunological study of peripheral blood was performed with the determination of CD3-CD16/56<sup>+</sup> (natural killers) and an IHC study of the expression of TGF-β1 in the capsule of an endometrioid cyst and in a preserved cytogenic stroma.

© Петровская Н.Н., Печеникова В.А., 2022

*Results.* The IHC study showed that the expression area of TGF- $\beta$ 1 was significantly larger in the surgical material in the recurrent course of endometriosis; an immunological study revealed a significant decrease in NK cells during the endometrioma recurrence.

*Conclusion:* Further study of the relationship between TGF- $\beta$ 1 and NK cells may be important as prognostic markers of recurrent endometriosis.

**Keywords:** ovarian endometrioid cyst, relapse, endometrioma, transforming growth factor- $\beta$ 1, NK-cells

В последние годы большинство исследователей важную роль в этиопатогенезе эндометриоза отводят трансформирующему фактору роста- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) – воспалительному фактору роста, который регулирует клеточную адгезию, миграцию, дифференцировку, апоптоз, инвазию и ангиогенез. Pizzo и соавт. (2002), Young и соавт. (2014) показали, что уровень этого маркера значительно повышается в перитонеальной жидкости, сыворотке крови, эктопическом эндометрии у пациенток с эндометриозом по сравнению с контрольной группой здоровых женщин репродуктивного возраста [1, 2, 3].

Повышенный уровень TGF- $\beta$ 1 может быть причиной нарушения иммунного ответа у женщин с эндометриозом из-за его способности снижать активность NK-клеток, что способствует выживанию эктопических клеток эндометрия в брюшной полости и играет ключевую роль в прогрессировании заболевания [4, 5]. NK-клетки представляют собой гетерогенную популяцию и характеризуются естественной цитолитической активностью, способностью продуцировать цитокины и хемокины. В силу этого они относятся к первой линии защиты, участвуя в противовирусном и противоопухолевом контроле [6].

До настоящего времени вопрос о взаимоотношении TGF- $\beta$ 1 и NK-клеток остается малоизученным, особенно при рецидивирующем течении заболевания и представляет научный интерес.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить экспрессию TGF- $\beta$ 1 и значение NK-клеток периферической крови при рецидивирующем течении эндометриоза яичников.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование вошло 196 пациенток, которым были выполнены органосохраняющие операции лапароскопическим доступом по поводу эндометриоидных кист яичников в период с 2012 по 2018 г. Ретроспективно, в зависимости от отдаленных результатов хирургического лечения было выделено две группы: в основную вошли 45 женщин с рецидивирующим течением заболевания, средний возраст ( $32,2 \pm 6,1$ ) года, в группу сравнения вошла 151 пациентка без рецидива, средний возраст ( $31,4 \pm 7,3$ ) года.

Критерии включения в исследование – репродуктивный возраст пациенток, рецидивирующие и впервые выявленные эндометриоидные кисты яичников, подтвержденные результатами гистологического исследования операционного материала. Критериями не включения в исследование были прием гормональных препаратов на момент оперативного вмешательства или в течение шести месяцев до него, наличие сопутствующей гинекологической патологии (миома матки более 3 см в диаметре, аденомиоз, опухоли яичников, воспалительные заболевания придатков матки, гиперпластические процессы эндометрия), хронические аутоиммунные заболевания, хронические вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, системные заболевания соединительной ткани.

Иммунологическое исследование периферической крови проводили 47 пациенткам [по 15 пациенток из группы с рецидивом заболевания (первая и вторая операции) и 17 – без рецидива] методом иммунофенотипирования мембранных антигенов с использованием двухплатформенной технологии на лазерном проточном цитометре Cytomics FC 500 и гематологическом анализаторе DXH-800 фирмы Beckman Coulter, США с использованием моноклональных антител CD3-CD16/56<sup>+</sup> (натуральных киллеров). Оценивали их процентное соотношение и подсчитывали абсолютное число в единице объема.

Для ИГХ-исследования операционного материала из фиксированных в нейтральном формалине и залитых в парафин кусочков ткани изготавливались тонкие срезы толщиной 4–5 мкм на микротоме Leica RM 2235 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Германия), помещали на стекла, покрытые поли-L-лизинном. Выявление тканевых антигенов проводили авидин-биотиновым методом, в котором бионитилированные антитела реагируют с соответствующими молекулами пероксидазно-конъюгированного стрептавидина. В качестве первичных иммунных сывороток использовали моноклональные мышиные антитела к TGF- $\beta$ 1 sc-130348 (Santa Cruz, США). Экспрессию TGF- $\beta$ 1 определяли по интенсивности коричневой окраски в цитоплазме гладкомышечного и сосудистого компонентов тканей. Оценку интенсивности реакции проводили по трехбалльной системе: 0 – негативная, 1 – слабая, 2 – промежуточная, 3 – сильная. Результаты исследования

определяли в 5 полях зрения с определением среднего значения площади экспрессии в процентах с расчетом ошибки среднего. Для ИГХ-исследования было отобрано 45 наблюдений – по 15 пациенток из группы с рецидивом заболевания (первая и вторая операции) и 15 – без рецидива. Результаты экспрессии TGF- $\beta$ 1 оценивали отдельно в капсуле эндометриоидной кисты и в эндометриальной цитогенной строме.

Морфометрический анализ проводили с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse E400, компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Видеотест – Морфология 5.0» Анализ осуществляли при увеличении  $\times 100$ . Микрофотографирование препаратов проводили при помощи цифровой фотокамеры Nikon.

Для статистической обработки данных использовали дисперсионный непараметрический анализ по Краскелу – Уоллису. Достигнутый уровень значимости

$p < 0,05$  свидетельствовал о наличии статистически значимых различий между средними 3 групп; что позволяло выполнить их попарные сравнения с помощью критерия Манна – Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частота рецидива эндометриоидных кист яичников составила 22,96 %, у 48,87 % пациенток он возник спустя 3–4 года после первой операции.

Иммунологическое исследование периферической крови выявило, что рецидив эндометриоидной кисты яичников отличался от безрецидивного течения заболевания и случаев впервые выявленной эндометриомы с последующим рецидивом достоверным снижением процента NK-клеток (CD3-CD16/56<sup>+</sup>) периферической крови (табл. 1).

Таблица 1

Результаты иммунологического анализа периферической крови  
у пациенток с эндометриозом яичников

Показатель	Группа 1 Рецидивирующее течение (n = 30)		Группа 2 Без рецидива (n = 17) Me [Q1; Q3]	p
	1-я операция (n = 15) Me [Q1; Q3]	2-я операция (n = 15) Me [Q1; Q3]		
CD3-CD16/56 <sup>+</sup> , % (норма 8,0–18,0)	15,74 [14,02; 18,44]	<b>7,96 [7,08; 13,60]</b>	15,16 [9,48; 17,88]	< 0,001
CD3-CD16/56 <sup>+</sup> , кл/мкл (норма 123,0–369,0)	294,42 [247,00; 313,48]	299,20 [251,28; 304,44]	243,60 [169,50; 372,48]	0,034

При ИГХ-исследовании положительная экспрессия TGF- $\beta$ 1 была обнаружена в капсуле эндометриоидных кист всех групп исследования. Площадь его экспрессии была значимо большей в операционном материале как первой 22,8 [21,6; 24,8], так и второй операции 31,2 [30,5; 32,2] при рецидивирующем течении

эндометриоза, по сравнению со случаями без рецидива 12,7 [11,2; 13,9] ( $p < 0,001$ ) (табл. 2). Кроме того, только в наблюдениях повторного хирургического лечения эндометриоидной кисты положительная экспрессия TGF- $\beta$ 1 была обнаружена в эндометриальной цитогенной строме – 18,7 [18,0; 19,7] %, рис.

Таблица 2

Площадь экспрессии трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1  
при эндометриоидных кистах яичников

Область исследования	Группа 1 Рецидивирующее течение (n = 30)		Группа 2 Без рецидива (n = 15) Me [Q1; Q3]
	1-я операция (n = 15) Me [Q1; Q3]	2-я операция (n = 15) Me [Q1; Q3]	
Капсула кисты	22,8 [21,6; 24,8]*	31,2 [30,5; 32,2]*	12,7 [11,2; 13,9]
Цитогенная строма	–	18,7 [18,0; 19,7]	–

\*Соответствует статистически значимому различию показателей ( $p < 0,05$ ) при сравнении показателей в группе 1 и 2.

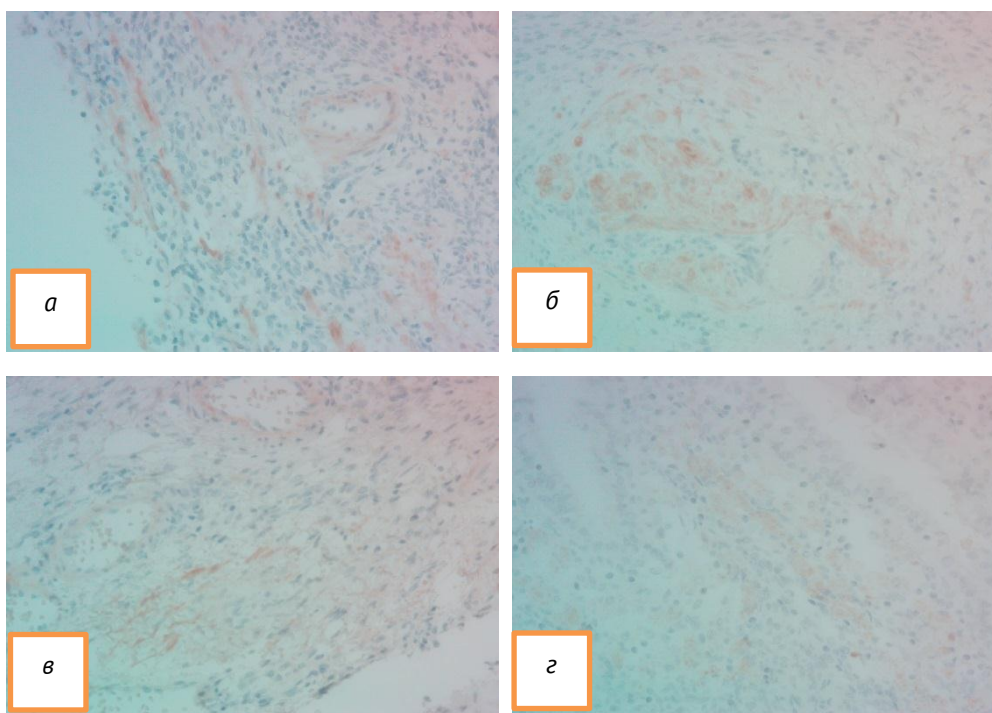


Рис. Экспрессия TGF- $\beta$ 1 при эндометриозе яичников:

а – капсула кисты, рецидив, первая операция; б – капсула кисты, рецидив, вторая операция;  
в – капсула кисты, без рецидива; з – цитогенная строма, рецидив, вторая операция. ИГХ,  $\times 100$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для рецидива эндометриоидных кист яичников характерно снижение процента НК-клеток в периферической крови и повышение площади экспрессии TGF- $\beta$ 1 в капсуле кисты. Участие этого ростового фактора в патогенезе и прогрессировании эндометриоза подтверждается также его экспрессией в цитогенной строме эндометриомы при рецидиве заболевания. Полученные результаты нашего исследования сопоставимы с данными мировой литературы, указывают на значение иммунных нарушений в патогенезе эндометриоза и взаимосвязи экспрессии TGF- $\beta$ 1 и процента НК-клеток периферической крови. Дальнейшее изучение роли иммунных нарушений при эндометриозе открывает перспектива для поиска новых неинвазивных способов его ранней диагностики, прогнозирования рецидивирующего течения и выбора методов эффективной терапии.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis / A. Pizzo, F.M. Salmeri, F.V. Ardita [et al.] // *Gynecol Obstet Invest.* 2002. Vol. 54. P. 82–87.
2. Transforming growth factor- $\beta$  induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis / V.J. Young, J.K. Brown, J. Maybin [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* 2014. Vol. 99. P. 3450–3459.

3. The peritoneum is both a source and target of TGF- $\beta$  in women with endometriosis / V.J. Young, J.K. Brown, P.T. Saunders [et al.] // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. e106773.

4. Флорова М.С. Роль ростовых факторов в патогенезе эндометриоза // *Журнал акушерства и женских болезней.* 2019. № 3 (68). С. 71–80.

5. Mizumoto Y. Changes in NK activities and TGF-beta concentration in the peritoneal cavity in endometriosis and their interaction related with infertility // *J Reprod Immunol.* 1997. No. 32 (3). P. 286–287. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(97\)82484-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(97)82484-9).

6. Попова О.С. Клетки иммунной системы как биомаркеры в диагностике эндометриоза // *Проблемы репродукции.* 2019. № 2 (25). С. 8–15. <https://doi.org/10.17116/repro2019250218>.

## REFERENCES

1. Pizzo A., Salmeri F.M., Ardita F.V., Sofo V., Tripepi M., Marsico S. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;54:82–87.
2. Young V.J., Brown J.K., Maybin J., Saunders P.T., Duncan W.C., Horne A.W. Transforming growth factor- $\beta$  induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:3450–3459.
3. Young V.J., Brown J.K., Saunders P.T., Duncan W.C., Horne A.W. The peritoneum is both a source and target of TGF- $\beta$  in women with endometriosis. *PLoS One.* 2014;9:e106773.

4. Florova M.S. The role of growth factors in the pathogenesis of endometriosis. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2019; 3(68):71–80. (In Russ.).

5. Mizumoto Y. Changes in NK activities and TGF-beta concentration in the peritoneal cavity in endometriosis and their interaction related with infertility. *J Reprod*

*Immunol*. 1997;32(3):286–287. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(97\)82484-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(97)82484-9).

6. Popova O.S. Cells of the immune system as biomarkers in the diagnosis of endometriosis. *Problemy reproduktivnoy = Problems of reproduction*. 2019; 2(25):8–15. <https://doi.org/10.17116/repro2019250218>. (In Russ.).

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

#### **Информация об авторах**

**Н.Н. Петровская** – врач – акушер-гинеколог отделения гинекологии, Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6849-5335>

**В.А. Печеникова** – доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии, Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5322-708X>

Статья поступила в редакцию 25.09.2022; одобрена после рецензирования 12.11.2022; принята к публикации 06.12.2022.

**The authors declare no conflicts of interests.**

#### **Information about the authors**

**N.N. Pertovskaia** – obstetrician-gynecologist of the Department of Gynecology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6849-5335>

**V.A. Pechenikova** – MD, PhD, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5322-708X>

The article was submitted 25.09.2022; approved after reviewing 12.11.2022; accepted for publication 06.12.2022.