

Алексеев А.А., Сулима А.Н., Давыдова А.А.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ФНО- $\alpha$  И ИЛ-1 В ТКАНЯХ СПАЕК МАЛОГО ТАЗА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

г. Симферополь, Республика Крым, Российская Федерация

**Резюме.** Интерлейкин-1 (ИЛ-1) и фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) являются ключевыми клеточными цитокинами, индуцирующими системную и местную воспалительную реакцию. В нашем исследовании проводилось определение экспрессии цитокинов ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  в ткани спаек, удаленных путем лапароскопического доступа у женщин репродуктивного возраста. Установлена умеренная степень экспрессии как ИЛ-1, так и ФНО- $\alpha$  в спайках, сформировавшихся на фоне наружного генитального эндометриоза. В то время как спайки воспалительного генеза и послеоперационные спайки характеризовались слабой экспрессией, а в ряде наблюдений и полным отсутствием окрашивания.

**Ключевые слова:** спайки, малый таз, морфология, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1

Перитонеальные спайки представляют собой фиброзные тяжи, соединяющие внутренние органы с брюшной стенкой и друг другом. Морфологически они представляют собой ткань вариабельного клеточного состава с васкуляризацией различной степени интенсивности, воспалительной инфильтрацией, как правило, очаговой, покрытую мезотелиальными клетками и часто включающую в свой состав миоциты и нервные волокна [1, 2, 3, 4]. Основной опасностью спаечного процесса являются осложнения, которые развиваются на их фоне. Однако, учитывая данные современных исследований, необходимо помнить и о том, что спайки представляют собой активно ремоделирующуюся ткань, которая посредством вырабатываемых провоспалительных цитокинов, может поддерживать в брюшной полости воспалительный процесс различной степени интенсивности [5, 6, 7, 8, 9]. Как известно, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 представляют собой одни из основных провоспалительных цитокинов, которые осуществляет свое воздействие на клетки и ткани как посредством паракринного, так и эндокринного механизма [5, 10, 11, 12, 13, 14]. Таким образом, весьма важно оценить степень экспрессии ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 в ткани спаек различного генеза. Основными причинами спайкообразования в малом тазу является оперативные вмешательства, воспалительные процессы и наружный генитальный эндометриоз. Несмотря на плейотропизм и неспецифичность действия цитокинов в условиях различной антигенной стимуляции, необходимо учитывать характер течения заболевания.

**Цель настоящего исследования** — изучение особенностей экспрессии и распределения ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 в тканях тазовых перитонеальных спаек различного происхождения у женщин репродуктивного возраста.

**Материалы и методы исследования**

Материалом для настоящего исследования послужили фрагменты операционного материала (спайки и их участки)  $n=100$ , полученные у женщин репродуктивного возраста при проведении оперативной лапароскопии. 38 спаек от пациенток, имеющих в анамнезе хронические воспалительные заболевания органов малого таза, 32 спайки от пациенток, имеющих эндометриозную болезнь (12 пациенток с эндометриозом яичников и 20 пациенток с наружным перитонеальным эндометриозом) и 30 пациенток, перенесших ранее операции на органах малого таза и брюшной полости. Показаниями для оперативного лечения явились: бесплодие, объемные образования в яичниках, хроническая тазовая боль или их сочетание.

Каждая пациентка получала подробную информацию об исследовании и предоставлял информированное согласие на участие в нем.

Спайки малого таза с целью исследования получали при проведении лапароскопии по следующей методике: спайку малого таза

захватывали мягким зажимом и натягивали; осуществляли bipolarную коагуляцию обоих полюсов ее сращения с органами малого таза; рассекали место коагуляции микроножницами и извлекали спайки через троакар; в случае необходимости осуществляли дополнительный гемостаз с использованием bipolarной коагуляции; далее промывали в физиологическом растворе (0,9% хлорида натрия) с последующей консервацией материала в 10% нейтральном растворе формалина (50 мл) в течение 24 часов.

Во время проведения морфологического исследования спайки подвергали проводке по стандартной методике с использованием парафиновой заливки и окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) проводилось по стандартной методике с использованием парафиновых блоков, реактивов компании Dako и моноклональных антител к ФНО- $\alpha$  (Anti-TNF alpha antibody (ab6671)) и ИЛ-1 (Anti-IL-1alpha antibody [as5] (ab17281)) компании Abcam с автоматической системой окрашивания Dako Cytomation. Фотографирование осуществляли цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z установленной на микроскопе OLYMPUS CX 41 с фотокамерой DCM 130.

Для оценки результатов иммуногистохимического исследования проводили подсчет количества позитивно-окрашенных клеток в 10 полях зрения на 400-кратном увеличении микроскопа, с учетом интенсивности окрашивания клеток.

Интенсивность ИГХ реакции к интерлейкинам оценивали в цитоплазме и мембранных структурах клеток по методу гистологического счета H-score по формуле —  $S = 1a + 2b + 3c$ , где

a — % слабой экспрессии относительно всех клеток в данном поле зрения,

b — % умеренной экспрессии относительно всех клеток в данном поле зрения,

c — % выраженной экспрессии относительно всех клеток в данном поле зрения.

Степень выраженности экспрессии интерлейкинов расценивали: 0–10 баллов — отсутствие, 11–100 баллов — слабая, 101–200 баллов — умеренная, 201–300 баллов — выраженная.

**Результаты и их обсуждение**

Иммуногистохимическое исследование ткани спаек, полученных у женщин, перенесших оперативное вмешательство на органах малого таза, с соблюдением всех правил асептики и антисептики, у которых послеоперационный период протекал без патологии, экспрессия ФНО- $\alpha$  была чрезвычайно низкой и составляла  $19 \pm 0,3$  балла, в ряде наблюдений обнаруживались лишь единичные позитивно-окрашенные макрофаги (рис. 1).

ИЛ-1 в этом материале также характеризовался чрезвычайно низким уровнем экспрессии и составляла  $13 \pm 0,4$  балла, в некоторых наблюдениях экспрессия этого маркера вообще отсутствовала.

При иммуногистохимическом исследовании спаек у женщин, имевших в анамнезе воспалительные заболевания органов малого таза, отмечалась слабовыраженная ФНО- $\alpha$ , составлявшая  $35 \pm 0,2$  балла. Позитивное окрашивание выявлялось, прежде всего, в цитоплазме мезотелиоцитов, покрывающих спайку, реже в лимфоидно-макрофагальных скоплениях. ИЛ-1 также выявлялся в скудных количествах, преимущественно в цитоплазме мезотелиальных клеток, составлял  $17 \pm 0,1$  балла (рис. 2).

Иммуногистохимическое исследование материала спаек полученного у пациенток с наружным генитальным эндометриозом, оперированных в первую фазу цикла, характеризовалось умеренной экспрессией ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 в мезотелиальных клетках (рис. 3), лимфоцитарно-макрофагальных агрегатах и очагах эндоме-

триоза. Экспрессия ФНО- $\alpha$  составляла  $151 \pm 0,5$  балла и ИЛ-1 –  $148 \pm 0,2$  балла (рис. 4).

Учитывая тот факт, что ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 являются короткоживущими цитокинами, не имеющими, в отличие от ИЛ-6, склонности к депонированию в тканях, нами был установлен чрезвычайно низкий уровень экспрессии их в тканях спаек послеоперационного и воспалительного генеза. Отсутствие окрашивания может быть связано также с крайне низкой концентрацией этих цитокинов, не определяющейся иммуногистохимическим методом.

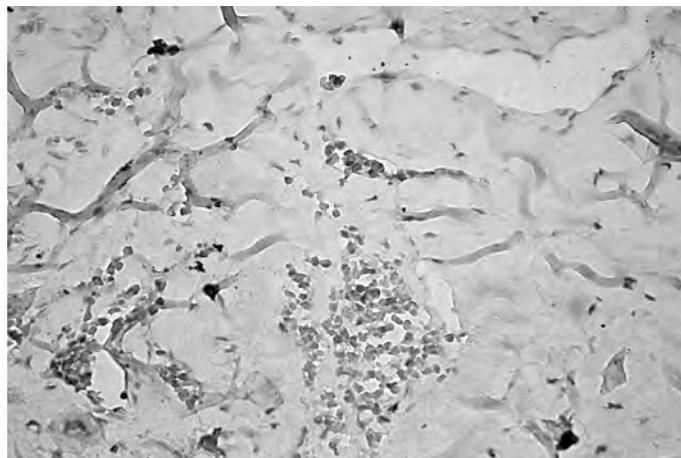


Рис. 1. Единичные позитивно окрашенные клетки в ткани послеоперационной спайки. Игх. Ув. 400.

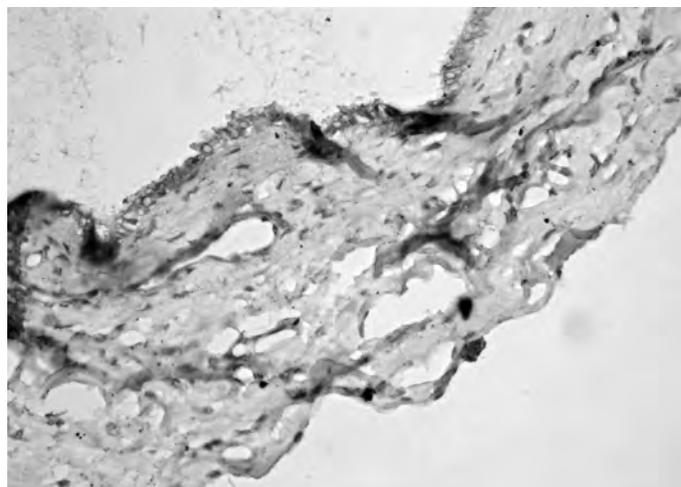


Рис.2. Слабо выраженная экспрессия ИЛ-1 в мезотелиальных клетках спайки воспалительного генеза. ИГХ. Ув. 400.

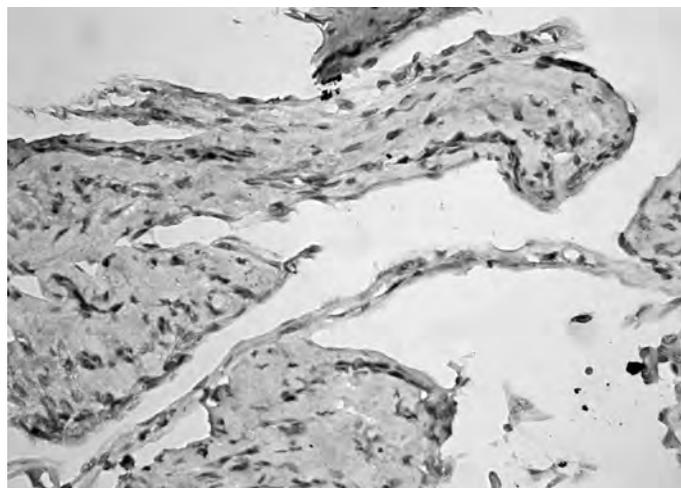


Рис.3. Умеренно выраженная экспрессия ИЛ-1 в мезотелиальных клетках спайки при наружном генитальном эндометриозе. ИГХ. Ув.400.

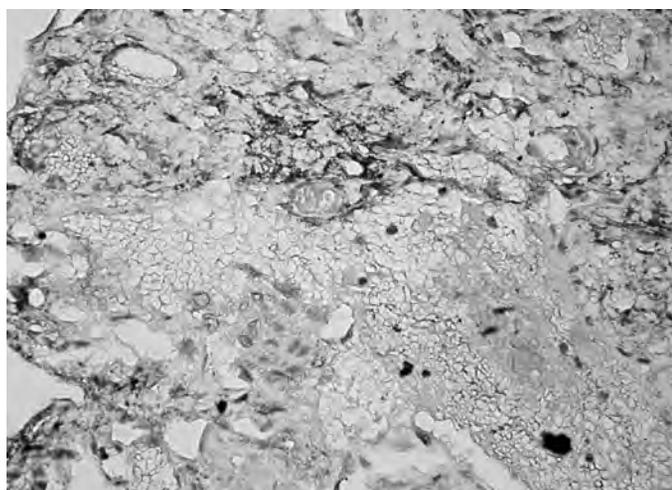


Рис.4. Умеренно выраженная экспрессия ФНО- $\alpha$  в цитоплазме фибробластов, эндотелиальных клеток и мезотелиоцитов при наружном генитальном эндометриозе. ИГХ. Ув.400.

#### Выводы

1. В тканях спаек послеоперационного и воспалительного генеза определялся низкий уровень экспрессии ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1.
2. Наибольшая степень экспрессии маркеров ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  обнаруживалась в ткани спаек пациенток с наружным генитальным эндометриозом.
3. При наружном генитальном эндометриозе ткань спаек сама по себе является местом индукции воспалительного процесса в малом тазу, что следует учитывать при составлении программ комплексного лечения пациенток с эндометриозом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Duron J. J. Postoperative intraperitoneal adhesion pathophysiology / J. J. Duron // *Colorectal Dis.* – 2007. – Vol. 9. – Suppl. 2. – P. 14-24.
2. Morphology, quality, and composition in mature human peritoneal adhesions / M. Binnebösel [et al.] // *Langenbeck's Archives of Surgery.* - 2007. - Vol. 10. - P. 10-17.
3. Oboh A. Pelvic adhesion formation at second-look surgery after laparoscopic partial and total peritoneal excision for women with endometriosis / A. Oboh, A. Trehan // *Gynecol. Surg.* - 2007. – Vol. 4. – P. 261–265.
4. Pathogenesis of intra-abdominal and pelvic adhesion development / A. N. Imudia [et al.] // *Semin. Reprod. Med.* – 2008. - Vol. 26, № 4. - P. 289-297.
5. Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional resections / J. Ordemann, C. Jacobi, W. Schwenk [et al.] // *Surg. Endosc.* – 2001. – Vol. 15, № 6. – P. 600-608.
6. Immunologic changes during minimally invasive surgery / C. A. Jacobi, F. Wenger, I. Opitz [et al.] // *Dig. Surg.* – 2002. – Vol. 19, № 6. – P. 459-463.
7. Immunological consequences of laparoscopic surgery, speculations on the cause and clinical implications / C. Sietses, R. H. Beelen, S. Meijer [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* – 1999. – Vol. 384, № 3. – P. 250-258.
8. Inflammatory cytokines differentially up-regulate human endometrial haptoglobin production in women with endometriosis / K. L. Sharpe-Timms, H. Nabli, R. L. Zimmer [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, № 5. – P. 1241–1250.
9. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration / Barcz El., Milewski L., Dziunycz P. [et al.] // *Fertil. Steril.* - 2012. – Vol. 97, № 6. – P. 1380-1386.
10. IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions / Cheong Y. C., Shelton J. B., Laird S. M. [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 1. – P. 69-75.
11. Kuhry E. Effect of laparoscopy on the immune system / E. Kuhry, J. Jeekel, H. J. Bonjer // *Semin. Laparosc. Surg.* – 2004. – Vol.

- 11, № 1. – P. 37-44.  
 12. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery / W. Brokelman, M. Lensvelt, I. Borel [et al.] // Surg. Endosc. Jan. – 2011. – Vol. 25, №S 1. – P. 1–9.  
 13. Peritoneal fluid cytokine and eicosanoid levels and their relation to the incidence of peritoneal adhesion // Chegini N., Rong H., Bennett B. [et al.] // J. Soc. Gynecol. Investig. – 1999. – Vol. 6, № 3. – P. 153-157.  
 14. Yao V. Peritoneal mesothelial cells produce inflammatory related cytokines / V. Yao, C. Platell, J. C. Hall // ANZ J. Surg. – 2004. – Vol. 74, № 11. – P. 997-1002.

Авторская справка

Алексеев Александр Анатольевич  
 ФПО Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»  
 ассистент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии  
 Российская Федерация, 295034, Республика Крым, г. Симферополь, бульвар Ленина 5/7.  
 perelamosan@rambler.ru

Сулима Анна Николаевна  
 ФПО Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»  
 д.м.н., доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии  
 g\_sulima@yandex.ua

Давыдова Александра Александровна  
 Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»  
 к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом  
 akzak@mail.ru

*Alekseev A.A., Sulima A.N., Davydova A.A.*  
**FEATURES OF TNF-A AND IL-1 EXPRESSION  
 IN ADHESIONS' TISSUES OF PELVIC  
 ORGANS AT WOMEN  
 OF REPRODUCTIVE AGE**

Medical Academy named after S.I. Georgievskiy  
 "V.I. Vernadskiy Crimean Federal University"  
 Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Abstract.** Interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) are major cellular cytokines inducing systemic and local inflammatory reactions. In our study, we measured the expression of cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  in the tissue of adhesions removed by laparoscopic access at reproductive age women. The moderate expression of both IL-1 and TNF- $\alpha$  in the adhesions that developed in case of external endometriosis was established. The inflammatory genesis and postsurgical adhesions were characterized by weak expression and in other observations were the complete absence of staining.

**Keywords:** adhesions, pelvis minor, morphology, TNF- $\alpha$ , IL-1

REFERENCES

1. Duron J.J. Postoperative intraperitoneal adhesion pathophysiology. J.J. Duron. Colorectal Dis. – 2007. – Vol. 9. – Suppl. 2. – P. 14-24.
2. Morphology, quality, and composition in mature human peritoneal adhesions.  
 M. Binnebösel [et al.]. Langenbeck's Archives of Surgery. - 2007. - Vol. 10. - P. 10-17.
3. Oboh A. Pelvic adhesion formation at second-look surgery after laparoscopic partial and total peritoneal excision for women with endometriosis. A. Oboh, A. Trehan. Gynecol. Surg. - 2007. – Vol. 4. – P. 261–265.
4. Pathogenesis of intra-abdominal and pelvic adhesion development. A. N. Imudia [et al.]. Semin. Reprod. Med. – 2008. - Vol. 26, № 4. - P. 289-297.
5. Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional resections. J. Ordemann, C. Jacobi, W. Schwenk [et

al.]. Surg. Endosc. – 2001. – Vol. 15, № 6. – P. 600-608.

6. Immunologic changes during minimally invasive surgery. C. A. Jacobi, F. Wenger, I. Opitz [et al.]. Dig. Surg. – 2002. – Vol. 19, № 6. – P. 459-463.

7. Immunological consequences of laparoscopic surgery, speculations on the cause and clinical implications. C. Sietses, R. H. Beelen, S. Meijer [et al.]. Langenbecks Arch. Surg. – 1999. – Vol. 384, № 3. – P. 250-258.

8. Inflammatory cytokines differentially up-regulate human endometrial haptoglobin production in women with endometriosis. K. L. Sharpe-Timms, H. Nabli, R. L. Zimmer [et al.]. Hum. Reprod.– 2010. – Vol. 25, № 5. – P. 1241–1250.

9. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. Barcz El., Milewski Ł., Dziunycz P. [et al.]. Fertil. Steril.- 2012. – Vol. 97, № 6. – P. 1380-1386.

10. IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. Cheong Y. C., Shelton J. B., Laird S. M. [et al.]. Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, № 1. – P. 69-75.

11. Kuhry E. Effect of laparoscopy on the immune system. E. Kuhry, J. Jeekel, H. J. Bonjer. Semin. Laparosc. Surg. – 2004. – Vol. 11, № 1. – P. 37-44.

12. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. W. Brokelman, M. Lensvelt, I. Borel [et al.]. Surg. Endosc. Jan. – 2011. – Vol. 25, №S 1. – P. 1–9.

13. Peritoneal fluid cytokine and eicosanoid levels and their relation to the incidence of peritoneal adhesion. Chegini N., Rong H., Bennett B. [et al.]. J. Soc. Gynecol. Investig. – 1999. – Vol. 6, № 3. – P. 153-157.

14. Yao V. Peritoneal mesothelial cells produce inflammatory related cytokines. V. Yao, C. Platell, J. C. Hall. ANZ J. Surg. – 2004. – Vol. 74, № 11. – P. 997-1002.

Authors:

Alekseev Aleksandr A.  
 Medical Academy named after S. I. Georgievskiy "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"  
 Assistant of Professor, the Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
 Russian Federation, 295006, the Republic of Crimea, Simferopol, Lenin avenue 5/7  
 perelamosan@rambler.ru

Sulima Anna N.  
 Medical Academy named after S.I. Georgievskiy "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"  
 Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, the Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
 g\_sulima@yandex.ua

Davydova Aleksandra A.  
 Medical Academy named after S.I. Georgievskiy "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"  
 Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, the Department of Pathological Anatomy with Sectional Course,  
 akzak@mail.ru