

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»

Ордена Трудового Красного Знамени

Медицинский институт имени С. И. Георгиевского

На правах рукописи

ШАВРОВА НАДЕЖДА ИГОРЕВНА

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫХ  
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ ПОДХОДОВ  
ПРИ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Зяблицкая Евгения Юрьевна

доктор медицинских наук, доцент

Симферополь, 2026

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	16
1.1. Современные представления об этиологии и патогенезе развития различных форм гиперплазии эндометрия.....	16
1.2. Экспериментальное моделирование гиперплазии эндометрия, перспективы применения в научных разработках.....	26
1.3. Существующие методы диагностики гиперплазии эндометрия, их возможности и ограничения .....	31
1.4. Общепринятые подходы к лечению гиперплазии эндометрия и развитие новых направлений .....	35
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	40
2.1. Дизайн экспериментально-клинического исследования .....	40
2.2. Схема эксперимента и методика создания модели гиперплазии эндометрия на лабораторных грызунах.....	41
2.3. Программа диагностических исследований пациенток.....	44
2.4. Особенности использованных морфологических и лабораторных методов в эксперименте и в клинике .....	45
2.5. Методы математико-статистической обработки результатов.....	49
<b>ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ РАБОТЫ</b> .....	50
3.1. Морфологическая характеристика и иммунофенотипический профиль эндометрия на модели его гиперплазии без лечения .....	50
3.2. Морфологическая характеристика и иммунофенотипический профиль эндометрия на модели гиперплазии с применением трех групп препаратов: нестероидных противовоспалительных, иммуномодулирующих, антиэстрогенных .....	54
3.3. Совершенствование способа моделирования гиперплазии эндометрия у лабораторных животных .....	58

<b>ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ РАБОТЫ.....</b>	<b>63</b>
4.1. Морфологические критерии верификации неатипической железистой гиперплазии эндометрия .....	63
4.2. Полиморфизм проявлений неполной картины хронического эндометрита при железистой гиперплазии эндометрия .....	69
4.3. Диагностический алгоритм выявления и коррекции слабоактивного воспаления при неатипической железистой гиперплазии эндометрия .....	84
<b>ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>87</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>98</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>100</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>102</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>103</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>105</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Гиперпластические процессы эндометрия являются медицинской и социальной проблемой. Гиперплазию эндометрия (ГЭ) отмечают примерно у 5 % гинекологических больных. До 40 % женщин молодого возраста с ГЭ подвергаются хирургическому лечению, что может приводить к потере репродуктивной функции. Гиперплазия, развивающаяся и прогрессирующая, имеет тенденцию перехода в морфологическую атипическую форму, которая является предшественником аденокарциномы эндометрия (эндометриоидной карциномы, ЭК, рака эндометрия) [1, 2]. Аномальные маточные кровотечения (АМК) как признак манифестации патологии эндометрия, у женщин не репродуктивного возраста в 10-20 % случаев сопровождают либо атипическую форму ГЭ, либо рак; в связи с чем, требуют настороженности и немедленного морфологического исследования. Рак эндометрия является распространенным злокачественным новообразованием среди женщин различного возраста во всех странах мира и в Российской Федерации [3, 4]. Атипичную гиперплазию называют внутриэпителиальной неоплазией эндометрия или эндометриальной интраэпителиальной неоплазией (ЭИН), подчеркивая ее потенциальную злокачественную угрозу: в виде сопутствующего рака эндометрия или высокого риска ее прогрессирования в рак при отсутствии лечения. Методом выбора терапии при ЭИН является гистерэктомия, очевидно нежелательная, в том числе и для перспективы репродуктивной стратегии у молодых женщин [2]. В этом направлении клинической работы большой практический интерес представляет профилактика, своевременная диагностика и патогенетическая терапия ГЭ.

Матка как орган-мишень овариальных гормонов реагирует на естественные эстрогены и их биохимические аналоги изменением морфологии люминального и железистого эпителия, степень перестройки которого зависит и от эндогенных факторов: рецептивной способности эндометрия, онкогенных мутаций.

Факторами риска являются особенности образа жизни, отсроченная реализация репродуктивных планов и сокращение количества беременностей, завершившихся родами, при раннем начале и позднем окончании менструальной циклики, ановуляторные состояния, опухоли яичников, ятрогенные факторы (последствия гормонотерапии), социально обусловленные болезни, синдромы и состояния, связанные с ожирением, сахарным диабетом II типа, накопившаяся популяционная мутационная нагрузка [5-16]. Это обуславливает неуклонный рост частоты встречаемости этой патологии, не всегда поддающейся общепринятым подходам к терапии. Выбор между хирургическим и патогенетическим лечением очевиден для ГЭ: в случае отсутствия онкологического риска, особенно у молодых женщин важен персонализированный патофизиологически обоснованный консервативный подход для сохранения репродуктивной функции и устранения причин гиперплазии. В настоящее время хроническое воспаление считают связанным с ГЭ патологическим процессом, поэтому исследования сосредоточены на работах в этом направлении.

Актуальность поиска как ключевых точек инициации ГЭ, так и доступных методик их выявления для подбора персонализированной патогенетически обоснованной терапии, согласующейся с репродуктивными задачами пациентки, разработки алгоритма ее наблюдения, инициировали данное исследование.

**Степень разработанности научной темы исследования.** В настоящее время в сериях множества клинических обзоров подытожены сведения по ГЭ с точки зрения современных комплексных взглядов на этиологию, факторы риска, гистологическую классификацию и морфологические подтипы, риски злокачественного прогрессирования, подходы к профилактике и выбору хирургических и нехирургических методов лечения [4-12]. Наиболее актуальны патогенетические взгляды на механизмы развития ГЭ (особенно ее тяжелых форм) и роли генетической предрасположенности (например, при синдроме Линча). Актуальны вопросы в отношении использования иммуногистохимических (ИГХ) биомаркеров и внедрения геномного анализа рисков злокачественного прогрессирования, а, следовательно, стратификации

групп женщин с риском развития ЭК на основании молекулярно-генетической диагностики, определения способов лечения, поиска вариантов профилактики [5, 8, 13-27].

Исследования показывают, что в развитии простой ГЭ системная и локальная гиперэстрогемия играет ключевую роль, но в случае начинающейся трансформации клеток возрастает роль воспалительных процессов [28-32]. Развитие воспалительных изменений при ГЭ можно рассматривать как фактор промоции и прогрессирования патологии, а также атрибутивный фактор риска малигнизации. В исследованиях была установлена роль клеток CD 45<sup>+</sup>, неспецифических протеаз и воспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в воспалении, связанном с ГЭ. Сложно утверждать, что является пусковым фактором, а что следствием в связке «ГЭ  $\rightarrow$  воспаление / воспаление  $\rightarrow$  ГЭ», что можно было бы определить в исследованиях в эксперименте *in vivo*, например, получив данные об эффекте противовоспалительных препаратов, верифицированном на тканевом уровне при ГЭ.

Результаты патофизиологических исследований роли воспаления и не только доступность, но необходимость морфологической диагностики, позволили сформулировать рабочую гипотезу о возможности использования данного патофизиологического пути структурных изменений эндометрия (взаимосвязи ГЭ и воспаления) с целью создания нового подхода в диагностике и терапии, наиболее актуального для молодых женщин репродуктивного возраста. Важным социально-экономическим аспектом данного исследования является улучшение демографических показателей и снижение затрат на вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), повышение частоты случаев их успешной реализации, а также терапию их осложнений.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Диссертационное исследование финансировано государственным заданием № FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии», № 123030700011-4 от 07.03.2023, по соглашению Минобрнауки России и ФГАОУ ВО «КФУ им.

В. И. Вернадского» № 075-01400-23-00 от 29.12.22. Автор является исполнителем в должности младшего научного сотрудника Центральной научно-исследовательской лаборатории в период реализации проекта.

**Цель исследования** – разработать новые патогенетически обоснованные диагностические и лечебные подходы при ГЭ с учетом роли воспаления в этом процессе.

Для решения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Разработать экспериментальную модель ГЭ на самках лабораторных грызунов для исследования молекулярных маркеров (рецепторов гормонов, клеточного цикла, неоангиогенеза, воспаления и местного иммунитета) и тестирования эффектов лекарственных веществ различных групп (нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), иммуномодуляторы, антиэстрогенные фитопрепараты).

2. Выявить методом иммуногистохимии особенности экспрессии маркеров рецепторов овариальных гормонов (ER, PrR), клеточного цикла (Ki-67, bcl-2, CD 95), неоангиогенеза (VEGF) и воспаления (CD 138, CD 4, CD 8, CD 20) в ткани эндометрия интактных лабораторных полиэстричных грызунов, на модели ГЭ и при ее патогенетической коррекции веществами различных групп: мелоксикам, азоксимера бромид, экстракт крестоцветных индол-3-карбинол.

3. Изучить функциональные и морфологические изменения эндометрия при гиперпластических процессах у женщин репродуктивного возраста и в постменопаузе. Выявить особенности экспрессии маркеров овариальных гормонов (ER, PrR), воспаления, клеточного и гуморального иммунитета в ткани эндометрия (CD 138, CD 4, CD 8, CD 20, CD 56).

4. Разработать новые патогенетические подходы к совершенствованию диагностики и лечения на основе выявленных молекулярных маркеров и патофизиологических процессов.

5. Провести анализ эффективности разработанного диагностико-лечебного алгоритма для внедрения в практику.

**Научная новизна исследования.** Впервые разработана релевантная модель ГЭ, на которой проведено комплексное исследование процессов пролиферации, местного иммунитета, апоптоза, неоангиогенеза в гиперплазированном эндометрии белых крыс. Разработана оптимальная техника овариэктомии и удобная схема введения эстрогенов лабораторным животным. Данная модель ГЭ исследована с точки зрения изучения роли воспаления в процессе гиперплазии в условиях лечения при использовании трех групп патогенетически подобранных лекарственных препаратов (НПВС, иммуномодуляторы, антиэстрогенные фитопрепараты).

Впервые в эксперименте изучено влияние негормональной терапии на молекулярно-биологические механизмы пролиферации, апоптоза, неоангиогенеза и иммунных процессов гиперплазированного эндометрия: изучены маркеры рецепторов овариальных гормонов (ER, PrR), клеточного цикла (Ki-67, bcl-2, CD 95), неоангиогенеза (VEGF) и воспаления (CD 138, CD 4, CD 8, CD 20, CD 56). Впервые показана эффективность НПВС для коррекции ГЭ, изучен эффект иммуномодулирующих препаратов и фитогормонов для фармакологической коррекции гиперпластического процесса слизистой оболочки матки без атипии.

В эндометрии пациенток с ГЭ впервые изучена взаимосвязь молекулярно-биологических показателей и морфологического варианта ГЭ. В результате выполнения диссертации впервые разработаны новые и усовершенствованы существующие профилактические, диагностические и лечебные подходы с применением молекулярно-генетических морфологических методов с учетом представления о роли не только гормонального дисбаланса, но и воспаления в данном патофизиологическом состоянии.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработана технология, представляющая патогенетически обоснованный диагностический подход, позволяющий персонализированно выявить роль воспаления при ГЭ. Технология определяет перечень доступных ИГХ маркеров, протоколы их исследования и критерии оценки, а также алгоритм ведения пациенток с ГЭ с учетом роли воспалительного процесса в ее патогенезе.

Технология молекулярно-биологического ИГХ исследования в комплексной диагностике ГЭ определяет клинически значимые маркеры в оптимальном и достаточном количестве для подбора патогенетической лекарственной терапии.

Разработан алгоритм для персонифицированной молекулярной диагностики ГЭ и программ ее патогенетического лечения, профилактики прогрессии в ЭК, усовершенствована работа с такими пациентками. Введено понятие неполной иммуноморфологической картины хронического эндометрита и обоснована лечебная тактика для таких пациенток. Алгоритм патогенетически обоснованной диагностики и терапии ГЭ внедрен в диагностическую практику.

*Объект исследования* – патоморфологические изменения при гиперплазии эндометрия в эксперименте и в клинике.

*Предмет исследования* – строение и иммуноморфология желез и стромы, лимфоидного инфильтрата и рецепторного аппарата эндометрия человека и лабораторных белых крыс при неатипической железистой гиперплазии.

**Материал и методы исследования.** Работа экспериментально-клиническая.

*Экспериментальная работа* выполнена с использованием самок белых крыс линии Вистар при овариэктомии, последующем введении эстрогенов и морфологической верификации развития ГЭ с последующей ее коррекцией тремя группами препаратов, включая НПВС, согласно задачам исследования. Материалом являются гистологические препараты матки экспериментальных животных (n=45).

*Клинический раздел работы* выполнен в ретроспективном анализе клинических данных и гистологического архива биоматериала соскобов полости матки, полученных у женщин, обратившихся с АМК в университетскую клинику – Многопрофильную клиническую больницу Святителя Луки (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского». Клинику обслуживает отдел патоморфологии и молекулярной онкологии Центральной научно-исследовательской лаборатории в рутинной морфологической диагностике, где были выполнены морфологические и молекулярно-биологические исследования.

Все пациентки были информированы о дополнительных исследованиях и дали согласие на их выполнение. Материалом являются соскобы полости матки, полученные от пациенток в возрасте от 25 до 63 лет в ходе фракционного диагностического выскабливания под контролем гистероскопии (n=50). Критерии включения: АМК при регулярном менструальном цикле либо кровотечение в периоде постменопаузы; УЗИ признаки гиперпластического процесса в эндометрии в репродуктивном возрасте и в постменопаузе; информированное согласие пациентки. Критерии исключения: ЭИН (атипическая ГЭ), онкологические процессы любой локализации; гормональная терапия, в том числе комбинированных оральных контрацептивов (КОК), тамоксифена, внутриматочных средств; отказ об участии; данные об инфекционной патологии; клинические проявления системных аутоиммунных заболеваний; невозможность соблюдения протокола исследования.

Использованы такие методы:

1. Эксперимент моделирования ГЭ у половозрелых лабораторных крыс с овариэктомией, трансдермальным введением эстрогенов, контролем вагинальных мазков.

2. Общие клинические методы в рамках диагностической работы с пациентками: сбор анамнеза, осмотр, физикальные методы, УЗИ, ПЦР-диагностика инфекций.

3. Морфологические методы для верификации патологии эндометрия и патофизиологической оценки его изменений у животных и человека: общая гистологическая техника и ИГХ (с маркерами овариальных гормонов, клеточного цикла, ангиогенеза и воспаления), методы световой микроскопии, микросъемки и сканирования гистопрепаратов, морфометрия изображений.

4. Для обработки цифровых показателей – статистические методы.

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» в связи с исследованием материала человека и лабораторных животных, представлена выписка из протокола №10 заседания «Комитета по этике» от 26.10.2023

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Моделирование ГЭ путем трансдермального введения эстрогенов лабораторным крысам после овариэктомии сопровождается характерными морфологическими проявлениями ГЭ и может быть рекомендовано в качестве удобной экспериментальной модели для сравнительного исследования эффектов лекарственных средств.

2. В модели ГЭ выявлены закономерные взаимосвязанные гиперпластические и иммунные изменения эндометрия, представляющие интерес для исследования их как диагностических критериев и патогенетической коррекции. Иммунофенотипические изменения отличаются в отделах, предназначенных для вынашивания (рог матки) и изгнания плода (тело матки). Выявлены разнонаправленные нарушения клеточного цикла эпителиоцитов и топографии иммунокомпетентных клеток. НПВС (мелоксикам) нормализует большинство данных показателей (число иммунокомпетентных клеток, кинетику клеточных популяций), растительный антиэстрогенный препарат (индол-3-карбинол) оказывает эффект за счет роста чувствительности тканей к прогестерону, увеличивая экспрессию прогестероновых рецепторов, а иммуномодулятор (азоксимера бромид) менее эффективен.

3. Воспаление как фон для ГЭ имеет важное патогенетическое значение в ее развитии и должно быть учтено в клинической работе. У пациенток с неатипической железистой ГЭ необходимо исключение хронического эндометрита в качестве фонового патологического процесса.

4. Эндометрит может иметь неполную морфологическую картину (CD138<sup>+</sup>) и способствовать структурной перестройке стромального и железистого компонентов эндометрия, усугубляя ГЭ, что необходимо учесть при назначении терапии.

5. При этом характерен полиморфизм иммуноморфологических показателей изменения рецепторной активности эндометрия и состава лимфоидного инфильтрата, что требует дифференцированного подхода в лечении таких пациенток.

**Специальность, которой соответствует диссертационная работа.** Работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки), направлениям 2 и 11 паспорта: 2. Изучение механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний. 11. Разработка новых путей этиотропной и патогенетической терапии с учетом взаимодействия лечебных мероприятий с защитно-приспособительными реакциями организма.

**Степень достоверности полученных результатов.** Работа выполнена в виварии и отделе патоморфологии и молекулярной онкологии Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ), являющимися подразделениями Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского». Условия вивария обеспечили соблюдение требований к стандартизации морфологического эксперимента. Работа диссертанта в должности младшего научного сотрудника в лаборатории ЦНИЛ и в должности врача акушера-гинеколога обеспечила возможность формирования выборки группы с ГЭ и формирование биокolleкции морфологического материала соскобов полости матки. ЦНИЛ имеет лицензию Территориального органа Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения Республики Крым, г. Севастополя и Новых присоединенных территорий, № мЛ041-00110-91/00149974 на патоморфологические и молекулярно-генетические медицинские исследования (патологическая анатомия, лабораторная генетика). Лицензия подразумевает соблюдение требований к помещениям, оборудованию и его техническому состоянию, подтвержденному метрологической поверкой и аттестацией, к соблюдению стандартных операционных процедур на преаналитическом и аналитическом этапах, требований к используемым реагентам с соответствующими рекомендованными протоколами работ. Наличие сертифицированных специалистов для выполнения исследований на диагностическом потоке в клинике подтверждает высокое

качество и достоверность преаналитической части выполненных лабораторных методик.

О достоверности полученных в работе результатов и обоснованности заключений и выводов свидетельствует достаточный объём исследований в экспериментальной и клинической части, использование современных наиболее достоверных морфологических и молекулярных методов с математическим анализом полученных количественных показателей.

**Апробация результатов.** Результаты исследования по теме работы представлены и обсуждены автором диссертации на следующих восьми научных мероприятиях всероссийского уровня преимущественно для молодых ученых: Всероссийский научный форум студентов с международным участием «Студенческая наука – 2019» 11-12 апреля 2019 г., Санкт-Петербург; Научно-практическая конференция «Медицинская наука Крыма: от истоков к современности, 22 декабря 2022 г., Симферополь; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная проведению Международного года фундаментальных наук в интересах устойчивого развития, 26 апреля 2022 г., Симферополь; VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием VolgaMedScience, 17–18 марта 2022 г., Нижний Новгород; Всероссийская научно-практическая конференция, посвящённая 150-летию со дня рождения Н.А. Семашко "Теоретические и практические аспекты современной медицины", 18 апреля 2024 г., Симферополь; XXVII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей, 20 апреля 2024 г Санкт-Петербург; II Всероссийская конференция «Поэзия генома» 06-07 ноября 2024 г., Санкт-Петербург; XVI конференция патофизиологов Урала, 22 октября 2024 г, Екатеринбург.

**Внедрение результатов работы в практику.** Основные положения, вошедшие в диссертационное исследование, внедрены в: 1) практическую лечебную работу Многопрофильной клинической больницы Святителя Луки ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», г. Симферополь; 2) диагностическую

работу Отдела патоморфологии и молекулярной онкологии Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», г. Симферополь; 3) образовательные программы и используются в учебном процессе студентов, ординаторов, аспирантов Кафедры Патологической анатомии с секционным курсом Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», г. Симферополь; 4) образовательные программы и используются в учебном процессе студентов, ординаторов, аспирантов Кафедры общей и клинической патофизиологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», г. Симферополь.

**Публикации автора по теме диссертации.** По материалам диссертационного исследования опубликовано 14 научных работ, отражающих основные результаты, научные положения и выводы. Из них: 1 монография (автором подготовлен раздел по экспериментальной работе), 2 статьи в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах Web of Science, Scopus; еще 4 статьи в специализированных рецензируемых научных журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией (ВАК) Российской Федерации по специальности 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки), 1 статья в журнале ВАК не по специальности темы работы (3.1.4. Акушерство и гинекология), 6 работ в сборниках материалов научных конференций преимущественно молодых ученых (1 международная, 4 всероссийские и 1 региональная). Помимо этого, подана и зарегистрирована 1 заявка на изобретение Российской Федерации (№ 2026105289 от 27.02.2026 г.).

**Личный вклад автора в исследование.** Диссертантка самостоятельно предложила направление темы работы, совместно с руководителем разработала дизайн исследования, экспериментальную модель. Самостоятельно сделала поиск литературы, написала аналитический обзор. В экспериментальной части автор самостоятельно сформировала группы крыс, выполнила операцию овариэктомии

и провела эксперимент введения эстрогенов и коррекционной терапии при формировании ГЭ, оформила заявку на изобретение способа моделирования ГЭ. В клинической части работы автор самостоятельно сформировала выборку пациенток с ГЭ, выполнила сбор анамнеза, гинекологический осмотр, УЗИ, лечебно-диагностическое выскабливание, подбор терапии и контроль ее эффективности. При проведении морфологических и молекулярных исследований автор выполнила аналитическую часть работ – отбор материала и его описание, выбор фрагментов сканированных изображений и микросъемку, морфометрию, описание и биостатистический анализ. Автором подготовлены публикации и раздел монографии, написаны 2 главы результатов исследований диссертации (экспериментальных и клинических) и раздел анализа результатов; совместно с руководителем подготовлены заключение, выводы, практические рекомендации.

Проводку, заливку блоков, изготовление и окраску срезов выполняли медицинские технологи лаборатории. Постановку ИГХ-реакции выполнила к.биол.н., биолог Макалиш Т.П. и оказала помощь в разработке критериев ее оценки. В исследовании патоморфологических изменений эндометрия женщин консультативную помощь оказала д.мед.н., врач-патологоанатом Голубинская Е.П. Указанные научные сотрудники ЦНИЛ являются соавторами публикаций, диссертант выражает им глубокую признательность за методическую помощь.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа имеет классическую структуру, содержит: введение, разделы обзор литературы, материал и методы исследования, две главы с результатами собственных исследований, главу обсуждение результатов и заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, содержащий 130 наименований работ. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами, 29 рисунками (из них 1 диаграмма, 4 иллюстрации блок-схемы и 24 микрофотографии).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные представления об этиологии и патогенезе развития различных форм гиперплазии эндометрия

*Гиперплазия эндометрия (ГЭ)* представляет собой патологическое изменение структуры и функции слизистой оболочки тела матки, обусловленное нарушением баланса между процессами пролиферации и апоптоза в эпителиальном и стромальном компонентах эндометрия. В структуре гинекологической патологии ГЭ составляет 10-50 % случаев, и заболеваемость неуклонно растет, по-видимому, преимущественно в связи с социально обусловленными особенностями патогенеза, зависимости от образа жизни и репродуктивной стратегии. Наиболее часто ГЭ выявляют у женщин в перименопаузальном периоде в возрасте 45-55 лет. ГЭ отличается склонностью к длительному рецидивирующему течению, на фоне которого могут возникать злокачественные поражения слизистой оболочки матки, особенно при отсутствии лечения. Доказано, что у больных на фоне ГЭ может возникать ЭК [6, 7, 11, 15, 33].

Изучение *молекулярных механизмов развития гиперпластических процессов* разных локализаций и последующей трансформации клеток является одной из самых динамично развивающихся областей молекулярной медицины. Традиционно считается, что ведущая роль в развитии ГЭ принадлежит несбалансированной эстрогенной стимуляции [34]. Клинически значимыми факторами риска развития патологических изменений в эндометрии являются заболевания репродуктивной системы, преимущественно сопровождающиеся ановуляцией, нарушением циклических процессов гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси с отражением в органах-мишенях при синдроме поликистоза яичников, в стадии менопаузального перехода, а также в связи с генетическими факторами – нарушениями в системе, подавляющей апоптоз. Сопутствующие

заболевания, приводящие к гиперпластическим процессам женских половых органов, такие как метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, ожирение, приводят к избыточному эндогенному синтезу и ароматизации эстрогенов в жировой ткани, повышению свободных эстрогенов в крови путем подавления глобулина, связывающего половые гормоны. Меньшая часть случаев в этиологии гиперэстрогении и сочетанных гиперпластических процессов эндометрия принадлежит эстроген-секретирующим опухолям яичников, например, гранулезоклеточным опухолям [35]. Нельзя исключить роль ятрогенной гиперэстрогении: описаны случаи тамоксифен-индуцированной ГЭ и рака эндометрия, избыточной стимуляции эндометрия длительным воздействием эстрогенов при несоответствии проводимой менопаузальной гормональной терапии клинической ситуации: применение монотерапии эстрогенами при интактной матке [36, 37]. Однако данные о развитии ГЭ на фоне отсутствия гормональных нарушений, свидетельствуют в пользу наличия иных механизмов формирования ГЭ, связанных с локальным нарушением регуляции клеточной пролиферации и изменениями тканевого обмена.

Показана и *роль воспалительных процессов* в возникновении дизрегуляции и гиперпластических процессов в эндометрии. Установлено, что при ГЭ имеются нарушения локального звена иммунитета (увеличение количества Т-лимфоцитов, клеток моноцитарно-макрофагального ряда, клеток, экспрессирующих молекулы адгезии), характерные для воспалительного процесса в слизистой оболочке матки. Можно предположить, что выявленные изменения могут сопровождаться повышением синтеза провоспалительных цитокинов:  $\gamma$ -интерферона, IL-1, IL-6, IL-8, колониестимулирующего (CSGF) и фибробластного (FGF) факторов роста, фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ), обладающих митогенными свойствами и способствующих активации клеточной пролиферации эндометрия. Установлена роль плазмочитарных клеток CD 138, данные исследования подтверждают возможную роль воспаления в патогенезе гиперпластической трансформации эндометрия [38]. Доказана роль провоспалительных цитокинов (IL -1 $\beta$ , IL -6) а также TNF- $\alpha$ , VEGF и в прогрессии ГЭ [30]. Основными проангиогенными

факторами, по уровню экспрессии которых можно судить о риске возникновения атипичской ГЭ и ЭК являются фактор роста сосудов (VEGF) и основной фактор роста фибробластов (англ.: basic fibroblast growth factor, bFGF) [39, 40].

Воспаление играет роль преимущественно в прогрессии ГЭ. Повышенная лейкоцитарная инфильтрация – это патологическое состояние, которое является одним из важных характерных признаков ГЭ у человека [28-32]. Ранее в исследовании на архивном гистологическом материале от 20 женщин с диагнозом гиперплазия эндометрия (с атипией и без) были исследованы особенности стромального компонента и микроокружения эндометрия, в том числе и с точки зрения роли воспалительного процесса в развитии гиперплазии. Работы показали рост экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD 45<sup>+</sup>, то есть рост активности и выраженности воспаления в зависимости от характера гиперпластического процесса. Во всех образцах исследуемой ткани с ГЭ есть клетки с экспрессией CD 45<sup>+</sup>, число их растет при переходе от простой формы ГЭ к комплексной. Среди других факторов, отражающих степень выраженности и характер воспалительных изменений в эндометрии, можно выделить наличие различных субпопуляций лимфоцитов, снижение интенсивности апоптоза эпителиальных клеток в железах эндометрия (в отличие от стромы) и активация фактора роста сосудов. При этом, важно отметить механизм воспаления именно как сосудисто-стромальной, мезенхимальной реакции с вовлечением клеток соединительной ткани, в том числе различных клеток воспаления [41]. В результате проведенного исследования показано превалирование неспецифической воспалительной реакции (CD 45), наиболее выраженной при атипичской гиперплазии, на фоне отсутствия явных изменений в популяции натуральных киллеров (CD 56), фагоцитарной активности тканевых макрофагов (CD 68) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD 8). Усиление неспецифического воспаления подтверждалось активацией провоспалительных цитокинов в маточных смывах и усилением протеолитической активности (трипсино- и эластазоподобной активности) на фоне снижения ингибиторного потенциала (антитриптической активности и, особенно, кислотостабильных ингибиторов). Рост воспалительной реакции в

эндометрии при атипической гиперплазии сопровождался понижением экспрессии CD 95, что свидетельствует о параллельном снижении готовности клеток эндометрия к апоптозу. Выдвинуто предположение, что рост неспецифического воспаления и снижение готовности к апоптозу могут быть факторами, способствующими формированию карциномы [29].

Известно, что паренхиматозный компонент эндометрия представлен так называемой маточной железой, состоящей из эпителия и просвета железы, именно *эпителиально-стромальные взаимоотношения* в слизистой оболочке матки определяют нормальное функционирование эндометрия. От них зависит метаболизм и иннервация эндометрия, его способность к физиологической репарации в форме реституции, образование рецепторного аппарата эпителия желез. Поэтому очевидно, что любые изменения в этих структурно-функциональных взаимоотношениях могут привести к различным отклонениям от нормы, в том числе к ГЭ. Эти изменения в одних случаях могут не нести в себе потенциал опухолевой трансформации, а в других прогрессирование патологических изменений является основой злокачественного роста. Баланс данных процессов чрезвычайно важен для реализации генеральной задачи – имплантации и плацентации. У человека в силу социальных причин и редкости полных репродуктивных саморегулирующихся естественных циклов дисбаланс встречается чаще. Вместе с тем, тонкие механизмы нарушения этих процессов до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

Существуют некоторые трудности *диагностики и стадирования ГЭ*, которые связаны с наличием нескольких классификаций описываемой патологии. Гистологическую классификацию опухолей женской половой системы (ВОЗ, 1975) заменила 2-я редакция указанной классификации (ВОЗ, 1994). Позже классификация подразумевала 4 варианта ГЭ: гиперплазию эндометрия без атипии и с атипией (в каждом варианте выделяют простую и сложную гиперплазию) с переходом позже на бинарный подход классификации. Попытки внедрить молекулярно-биологическую классификацию ЭИН не способствовали улучшению взаимодействия между клиницистами, в связи с невысокой

доступностью диагностических критериев для широкого применения. В 2014 году ВОЗ введена новая классификация ГЭ, в которой ГЭ с атипией (синоним ЭИН) рассматривается как предраковое состояние эндометрия и зачастую требует радикальных клинических решений [42, 43].

*Ключевая роль в патогенезе развития ГЭ принадлежит нарушениям апоптоза.* В нормальном овариально-маточном цикле в фазе поздней секреции и десквамации существует баланс между регуляторными генами апоптоза: проапоптотическими генами FAS/FASL и системой, подавляющей апоптоз – bcl-2. Избыточная экспрессия генов, подавляющих апоптоз, приводит к сохранению популяции клеток, подвергающихся длительной эстрогенной стимуляции и воздействию других этиологических факторов. Уровень проапоптотических генов повышается при терапии прогестинами, что, по-прежнему, является основным принципом патогенетической терапии [44]. В настоящее время важное значение в патогенезе ГЭ исследователи придают регуляторам пролиферации и апоптоза, в частности, гену-супрессору роста опухоли — PTEN, т.к. известно, что белковый продукт гена PTEN участвует в регуляции клеточного цикла и апоптоза. Инактивация этой функции может вести к неконтрольному клеточному росту и возникновению опухоли [45]. Однако мнения исследователей о взаимосвязи между изменением активности гена PTEN при ГЭ и активностью важных белков, регулирующих пролиферацию, в частности Ki-67 носят противоречивый характер [46].

Вопрос о *риске развития злокачественной трансформации ГЭ* остается открытым. До настоящего времени достоверно неизвестен этиопатогенез гиперпластических процессов и рака эндометрия, имеются лишь факторы риска, в присутствии которых, вероятность возникновения данной патологии значительно возрастает. В проспективном когортном исследовании отмечается, что инсулинорезистентность / метаболический синдром, увеличение уровня стероидных гормонов и хроническое воспаление являются тремя компонентами риска, связанными с постменопаузальным раком эндометрия [46]. Исследования научной группы из Китая [47] также подтвердили роль инсулинорезистентности и

воспаления в развитии ГЭ и ее онкотрансформации. Более того, выявлено, что гены, отвечающие за иммунный ответ и метаболизм, могут изменять экспрессию при длительных воздействиях эстрадиола и / или насыщенной жирами диеты, что может быть потенциальной мишенью для новой терапии ГЭ. Эти данные были подтверждены не только в экспериментах на мышах, но также на клеточных культурах эндометрия мышей и человека. Рецептор эстрогена-альфа (ER $\alpha$ ) играет важную роль в клеточной пролиферации эндометрия. ER $\alpha$  регулирует пролиферацию в своих органах-мишенях, таких как матка, путем привлечения коактиваторов и корепрессоров. По данным исследования коллег из Индии [48] белок WDR13 может действовать как важный корепрессор в эстрадиол-зависимой и независимой транскрипционной активности ER $\alpha$ , и его отсутствие в ткани матки может приводить к повышенной экспрессии пролиферативных генов. Исследования показали, что при нокаутировании гена, кодирующего белок WDR13, наблюдается характерная для ГЭ морфологическая картина: повышенная экспрессия ER $\alpha$  при гиперплазии затем постепенно снижается по мере прогрессирования заболевания, повышается экспрессия гена PI3K.

По данным многих авторов атипичная ГЭ, характеризуется цитологической атипией: увеличенные, округлые и неправильные контуры ядер, заметные увеличенные ядрышки с грубым и везикулярным хроматином, увеличенное ядерно-цитоплазматическое соотношение и эозинофилия цитоплазмы, стратифицированные эпителиальные клетки с потерей полярности по отношению к базальной мембране.

*Рак эндометрия, называемый также ЭК* – это одно из самых распространенных злокачественных заболеваний у женщин в системе органов репродукции, за исключением рака молочной железы [3, 4]. Основные причины его, как и ГЭ – это эстрогенная стимуляция экзогенным или собственным гормоном при отсутствии (дефиците) прогестерона. В последнее время большое значение придают и инсулинорезистентности, не только для ГЭ, о чем ранее упоминалось, но и для развития рака. Она стимулирует биосинтез 17- $\beta$  эстрадиола и активирует рецепторы эстрогена, в том числе на уровне эпигенетической

модуляции, что повышает чувствительность к эстрогену со стороны эндометрия. Хроническое воспаление, индуцированное инсулинорезистентностью, на уровне цитокинов и иммунных клеток стромы также потенцирует подобные изменения в содержании и восприятии эпителиальными клетками эндометрия эстрогенов [49].

По данным литературы безальтернативная моностимуляция эстрогеном (без прогестеронового прикрытия) и инсулинорезистентность являются существенными рисковыми факторами при раке эндометрия. В сочетании эстрогенная стимуляция и инсулинорезистентность могут нарушать гомеостаз эндометрия и способствовать развитию ГЭ. На модели *in vivo*, у мышей в статусе длительной стимуляции эстрогенами и инсулинорезистентности изучены взаимодействие между этими двумя факторами и их вклад в поражение эндометрия путем исследования профиля транскриптома эндометрия и связанных с ним изменений молекулярных сигналов. Для этого мыши C57BL/6 после овариэктомии получали подкожную имплантацию гранул 17- $\beta$  эстрадиола и / или диету с высоким содержанием жиров в течение 12 недель. Гистоморфологически обнаружили, что все группы показали заметно увеличенную матку и увеличенное количество желез эндометрия. Анализ, по мнению авторов, показал, что гены, стимулируемые эстрадиолом или избыточным питанием, в основном отвечают за иммунный и воспалительный ответ. Продемонстрированы пути передачи сигналов лейкоцитарной экстравазации. Кроме того, показано, что гены, реципрокно модулируемые эстрадиолом и избыточным питанием, усиливают активность друг друга. Такое комплексное исследование демонстрирует потенциальные диагностические, профилактические и терапевтические возможности при раке эндометрия. Эти результаты подтверждены и на культурах клеток (на линиях эндометрия мышей и рака эндометрия человека) [50]. Особенно усиление транскрипции, представляет собой потенциальную терапевтическую мишень для ЭК. Требуется дальнейшее исследование этой возможности.

Во время старения неконтролируемая пролиферация эпителиальных клеток в матке приводит к ГЭ и / или развитию рака по пути передачи сигналов mTOR, который является одним из основных регуляторов старения, а экспериментальное

подавление этого пути увеличивает продолжительность жизни. Генетические изменения в этом пути через мутации и / или амплификации часто встречаются при раке эндометрия. Однако точный вклад передачи сигналов mTOR и старения матки в патологии эндометрия в настоящее время неясен. В этом исследовании изучали роль передачи сигналов mTOR в старении матки и ее значение в развитии ГЭ. Гиперпластический эндометрий как у женщин в постменопаузе, так и у старых мышей проявляет повышенную активность mTOR. Анализ матки мышей, гетерозиготных по PTEN и мышей со сверхэкспрессией PTEN, дополнительно подтвердил, что чрезмерная активация передачи сигналов mTOR приводит к ГЭ. Фармакологическое ингибирование передачи сигналов mTOR с использованием лечения рапамицином подавляло ГЭ у старых мышей. Кроме того, лечение ингибиторами mTOR уменьшало размер колоний и пролиферацию PTEN-отрицательной клеточной линии рака эндометрия в 3D-культуре [44].

*Патофизиологические данные являются базой для разработки терапии ГЭ.* Так, представления о ГЭ как гиперэстроген-зависимом состоянии дали возможность создания эффективной терапии ГЭ препаратами с прогестагенными свойствами. Широкое применение прогестагенов основано на выраженном антипролиферативном эффекте на эндометрий, который реализуется посредством механизмов, схожих с влиянием прогестерона на эстроген-опосредованную клеточную пролиферацию. Но, эффект терапии прогестагенами, как и другими препаратами, часто носит частичный или временный характер, что приводит к рецидивированию или прогрессированию ГЭ. Опыт практической работы свидетельствует о том, что назначение различных схем применения прогестагенов достаточно эмпирично. Это диктует необходимость дальнейших исследований по изучению молекулярных аспектов клеточной пролиферации и апоптоза в гиперплазированной ткани эндометрия, влияния на них различных видов гормональной терапии для оптимизации схем применения препаратов. Это стимулирует развитие новых патогенетических направлений терапии. Например, мелатонин может изменить патофизиологический процесс и прогноз при ГЭ в лучшую сторону. В модельном эксперименте с или без воздействия эстрогена у

обработанных мелатонином и физиологически высвобожденных мелатонином крыс наблюдалось значительное восстановление гипертрофии / гиперплазии матки [48]. В эксперименте на крысах линии Вистар (Wistar) после двусторонней овариэктомии и моделировании ГЭ при введении мелатонина и нахождении животных в темной среде продемонстрировано значительное уменьшение высоты эпителиальных клеток. В группах с или без воздействия эстрогенов при пероральном введении мелатонина и физиологическом его высвобождении у крыс наблюдали значительное восстановление нормальной структуры эпителия матки. Мелатонин может оказывать защитное действие на ГЭ [48]. Особенность этого исследования заключается в том, что изучены закономерности на животных, ведущих ночной образ жизни, и сложно экстраполировать данные на человека. Экстраполяция экспериментальных данных является ограничением и требует клинических исследований, ограниченных в свою очередь, этическими и организационными позициями [52]. Линия мышей, которая имитирует большинство факторов риска развития ГЭ, была бы идеальной моделью для изучения поэтапного прогрессирования ГЭ и разработки подходящих стратегий лечения [53].

Многочисленные направления исследования посвящены фитонутриентам – веществам растительного происхождения, обладающим способностью блокировать пролиферативную активность на уровне мембран, цитоплазмы и ядра клеток-мишеней, модулируя, таким образом, сигнальные каскады как на белковом, так и транскрипционном уровнях. На современном этапе среди фитонутриентов наибольший интерес представляют эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG), представитель катехинов зеленого чая, и индол-3-карбинол (I3C), содержащийся в овощах семейства крестоцветных [54]. Согласно данным исследований, комбинация EGCG и I3C способна оказывать воздействие на различные сигнальные пути пролиферативных каскадов, обеспечивая разностороннее влияние на ключевые молекулярные механизмы развития гиперпластических процессов. Среди естественных растительных ферментов интересны также вещества, способствующие метаболизировать избыточные

эстрогены в организме. В настоящее время также интенсивно изучаются механизмы терапевтических эффектов препаратов иммуноглобулинов, проводятся исследования, результаты которых позволяют расширить область применения этих препаратов, определить наиболее информативные иммунологические показатели как системного, так и местного иммунитета. Принимая во внимание недостаточную эффективность гормонального лечения гиперплазии эндометрия у отдельных больных, а также противопоказания к применению и выраженные побочные эффекты гормонотерапии, интересным и перспективным является поиск препаратов, оказывающих целенаправленное воздействие на молекулярные механизмы развития данной патологии и, в то же время, лишенных отрицательных аспектов, присущих традиционному гормональному лечению.

Итак, ГЭ является результатом нарушения равновесия между процессами пролиферации и апоптоза, которые регулируются клеточными и внеклеточными компонентами на молекулярном уровне. Высокая частота встречаемости ГЭ, отсутствие точных представлений о персонифицированном этиопатогенезе и ключевых причин трансформации клеток диктуют потребность совершенствования методов диагностики ГЭ и раннего выявления перехода атипичной гиперплазии в рак. Комплексное исследование различных аспектов ГЭ, включающее традиционные гистологические и иммуноморфологические методики, а также применение морфометрических и статистических методов, предоставит возможность лучше понять процессы развития ГЭ.

В распоряжении клиницистов и фундаментальных исследователей имеются клинические, эндоскопические, морфологические, гормональные, иммунобиохимические и молекулярные методы исследования. Несмотря на это на сегодняшний день нет однозначного диагностического критерия, позволяющего точно предсказать вероятность малигнизации заболевания и своевременно начать адекватную терапию. Понимание ключевых молекулярных механизмов, вовлеченных в патогенез пролиферативных заболеваний, в дальнейшем может способствовать формированию базовых критериев для создания лекарственных

препаратов, оказывающих целенаправленное воздействие на патологически измененные клетки-мишени.

В связи с этим представляется целесообразным разработать релевантную модель ГЭ на лабораторных животных, изучить на ней различные молекулярно-генетические механизмы развития гиперпластических процессов эндометрия в эксперименте (включая воспаление) и оценить эффективность применения противовоспалительной терапии с использованием морфологических, ИГХ и молекулярно-генетических методов исследования.

## **1.2. Экспериментальное моделирование гиперплазии эндометрия, перспективы применения в научных разработках**

*Моделирование ГЭ в эксперименте на лабораторных животных является важным этапом доклинического исследования диагностических и терапевтических работ.* Поскольку ГЭ и ЭК занимают ведущие позиции среди гинекологической патологии женщин зрелого и старшего возраста в России и в мире, данные исследования актуальны и многочисленны [55, 56]. На наш взгляд и по мнению экспертов, это связано с вынужденным ограничением женской фертильной функции, экзогенным поступлением синтетических, животных и фитоэстрогенов на фоне неспецифического полиэтиологического провоспалительного дисбаланса, избыточного веса, нездоровых алиментарных привычек, усугубляющих гиперэстрогению эндогенным поступлением продуктов ароматизации жиров и воспалительных цитокинов. Особенно это актуально при ановуляции, в стадии менопаузального перехода и в связи с нарушениями систем генов и кодируемых ими белков внутриклеточных регуляторных каскадов [43]. Не смотря на то, что это преимущественно социально обусловленные факторы, их модель на животных возможна, поскольку основным патогенетическим механизмом является гиперэстрогения.

К сопутствующим нарушениям можно отнести хроническое неспецифическое воспаление с повышением экспрессии общего лейкоцитарного антигена (CD 45) [57], что является дополнительным фактором альтерации [58, 59]. Апоптоз как защитный механизм предотвращения развития клетки с ошибкой репликации и репарации ДНК и контролирующей пролиферацию эндометрия при этом ингибирован [60, 61]. Клетки базального слоя эндометрия получают стимулы к пролиферации гиперпродукцией эстрогенов и индукцией ангиогенеза [62-67]. А персистенция гиперэстрогении на фоне недостаточности прогестерона за счет дефекта лютеиновой фазы овариально-менструального цикла является ключевым фактором в развитии ГЭ и ЭК [68-72].

Эти литературные данные мы использовали для подбора молекулярных маркеров и постановки иммуногистохимической реакции (ИГХ) в тканях экспериментальных животных и биообразцов эндометрия человека с ГЭ, а также при подборе средств патогенетической терапии в эксперименте.

Диагноз ГЭ верифицируют морфологически при наличии разрастания эндометриальных желез, что приводит к росту железисто-стромальных соотношений, высоты эпителиоцитов в железах [73, 74]. Прогнозирование течения ГЭ производят на основании выраженности клинических проявлений, степени морфологических изменений, наличия ядерной атипии [75, 76]. Эти данные мы также использовали в эксперименте для оценки адекватности модели.

Описанные различными авторами общие патологические закономерности ГЭ и ее злокачественной трансформации требуют дальнейшего изучения в эксперименте. Все они созвучны теории Д. Ханахана и Р. Вайнберга Hallmarks of Cancer, выделяющей в обзоре 2022 года 14 маркеров трансформации клеток и их популяций [77]. Для ГЭ характерны: постоянная пролиферация и активные сигнальные каскады, поддерживающие ее; уход от супрессоров пролиферации внутри клетки, среди соседних клеток и их микроокружения; эпигенетическое перепрограммирование; потеря надзора иммунной системы; воспаление; изменение микробиоты. При дальнейшем прогрессировании усиленный

ангиогенез; синэсцентные (стареющие) клетки; геномная нестабильность и мутации; нарушенный метаболизм и фенотипическая пластичность [77].

Такой комплексный анализ демонстрирует потенциальные диагностические, профилактические и терапевтические возможности при раке эндометрия. Экспериментальные оценки процесса канцерогенеза эндометрия ограничены по многим клиническим, техническим и этическим причинам и спрос на модели, которые могут имитировать ГЭ у человека и, следовательно, могут быть использованы для изучения лекарств для ее лечения постоянно растет [52].

*Для доклинических исследований необходимо использование доступных, стандартизованных моделей* патологических процессов на животных. Множество изобретений нацелено на решение данной задачи.

Известен способ моделирования ГЭ у лабораторных крыс, осуществляемый путем внутрибрюшинного введения эстрадиола в дозе 2 мг/кг [78].

Известен способ моделирования ГЭ у лабораторных мышей, включающий проведение подкожных инъекций эстрадиола в течение 21 дня [79].

Недостатками большинства известных способов является то, что при моделировании ГЭ у животных продолжается выработка прогестеронов, подавляющих действие эстрогенов, в том числе и экзогенных, о чем свидетельствуют их присутствие в периферической крови, а также активные желтые тела в яичниках экспериментальных животных. Чрезвычайно важным является введение эстрогенов именно после овариэктомии, что исключает компенсаторный антиэстрогенный эффект эндогенного прогестерона.

Известен способ моделирования ГЭ у лабораторных животных, в котором для предотвращения выработки собственных гормонов была проведена двусторонняя овариэктомия доступом через переднюю брюшную стенку, через неделю после возобновления кормления мышей они получали обычную пищу или обогащенную жирами диету, а также одну внутрибрюшинную инъекцию  $\beta$ -эстрадиола, растворённого в кунжутном масле, в дозировке 50 мкг/кг/день [80].

Однако при этом высок риск развития перитонита и гибели животных до окончания эксперимента, а также развитие хронического воспаления, что может

повлиять на результаты исследований. Мы считаем поясничный доступ техники операции более удачным. Инъекционные способы введения эстрогенов также нельзя считать оптимальными, с учетом накопления достаточно большого количества сведений о негативном влиянии стресса и боли на репродуктивную систему. Для «чистоты» эксперимента важно минимизировать эти факторы.

Поэтому для экспериментальной работы нами был запланирован способ моделирования ГЭ у лабораторных животных, включающий проведение билатеральной овариэктомии крысам-самкам с применением анестезии поясничным доступом в диэструсе, и далее ежедневное введение эстрогенов через кожу в виде аппликации геля, содержащего эстрадиол, на кожу живота крыс. В нашей модели сохранялся риск развития спаек, а длительность процесса развития ГЭ при введении эстрогенов на протяжении 4 недель определяла и продолжительность эксперимента. Эти факторы носили не существенный характер, но все же после завершения работ и исследования ГЭ, позже этот способ был нами доработан и подана заявка на патент. А усовершенствованный способ, выгодно отличающийся от всех доступных в современной литературе, предложен для перспектив будущего использования исследователями. Способ описан более подробно в главе 3.

Итак, при моделировании ГЭ у крыс проблемой является повышенная травматичность лабораторных животных и недостаточная их выживаемость, что является важным фактором для дальнейшей оценки эффективности методик коррекции ГЭ на экспериментальной модели, а также длительные сроки развития модели ГЭ. Важным результатом является создание модели ГЭ в рогах матки самок белых крыс с минимальной травматичностью и обеспечением высокой выживаемости, сокращением времени достижения состояния гиперэстрогении, что позволяет изучать механизмы формирования ГЭ и эффективно проверять различные схемы терапии.

Как и ожидалось, чем глубже идет изучение эндометрия как сложной гистофизиологической системы, тем очевиднее становится сложность понимания подходов к ее лечению. Есть исследования и на других моделях: изучение

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, трехмерных имитаторов тканей и микрожидкостных культуральных платформ. Эти нетрадиционные подходы откроют новые перспективы и позволят оценить сложность эндометрия как патофизиологической системы тонкой регуляции [81].

Новые достижения в области технологий изменили способ проведения исследований, открыв безграничные возможности для изучения биологии эндометрия и связанных с ним заболеваний. Способность генерировать стволовые клетки из соматических клеток, сохраняя при этом их генетический состав, дает ключ к пониманию биологии клеток в рамках ГЭ. Гормональный ответ эндометрия человека может быть лучше изучен с помощью трехмерных имитаторов, которые очень похожи на естественную ткань. Такими органоидами можно манипулировать и воздействовать на них с помощью экспериментальных стимулов для изучения прямого влияния факторов риска ЭК и других заболеваний. Увеличение сложности органоидов за счет включения других типов клеток, включая кровеносные сосуды и иммунные клетки, было бы захватывающим направлением для достижения и обеспечило бы идеальную модель. Микрожидкостные платформы позволяют клеткам или тканям имитировать физиологию в отношении условий для долгосрочной жизнеспособности и взаимодействия с другими тканями, что увеличивает сложность экспериментальной системы. Ряд микрофлюидных систем продолжает разрабатываться, каждая со своими уникальными характеристиками и конструкциями, диверсифицируя типы исследований, которые могут быть выполнены [81]. Однако чрезмерно высокая стоимость таких технологий часто не оправдана для решения конкретных практических задач, которые можно выполнить более простым, но не менее достоверным способом.

Распространенность ГЭ, доступность диагностики, профилактики и патогенетической коррекции, а также риск развития ЭК на фоне гиперплазии, как и возможность моделирования ГЭ на полиэстричных грызунах, побудили нас провести данное экспериментальное исследование для решения задач практической медицины, прежде всего амбулаторного этапа помощи.

### **1.3. Существующие методы диагностики гиперплазии эндометрия, их возможности и ограничения**

Гиперпластический процесс эндометрия можно заподозрить на основании клинической симптоматики, включая аномальные маточные кровотечения, обильные менструальные кровотечения, межменструальные кровянистые выделения, данных физикального обследования, анамнеза. Среди инструментальных методов наиболее информативным является лучевой – УЗИ органов малого таза, которое является неинвазивным, доступным методом. Окончательным методом верификации диагноза является гистероскопия с патогистологическим исследованием эндометрия [34].

Наибольшее клиническое значение в первичной диагностике ГЭ имеет УЗИ органов малого таза, проводимое в первую фазу менструального цикла или при наличии маточного кровотечения независимо от дня менструального цикла. По некоторым данным, эффективность трансвагинальной эхографии в диагностике патологии эндометрия, эндометриоза матки, субмукозной миомы матки составляет 80,8 % [82]. При наличии технической возможности следует использовать трансвагинальное УЗИ конвексным полостным датчиком, преимущества которого заключаются в повышении разрешения и улучшении визуализации, уменьшения вероятности помех за счет артефактов, создаваемых эхоплотностью и толщиной передней брюшной стенки, петлями кишечника, положением матки.

Согласно рекомендациям IETA (International Endometrial Tumor Analysis) установлены параметры, определения патологических изменений полости матки и их описании при УЗИ [83]. Необходимо описать следующие параметры:

- 1) однородность структуры эндометрия, гомогенность или гетерогенность (при наличии образований);
- 2) толщину необходимо измерять перпендикулярно срединной линии, а при наличии жидкости суммировать толщину каждого слоя отдельно;

3) эхогенность измеряют относительно эхогенности миометрия - гиперэхогенный, изоэхогенный, гипоехогенный;

4) срединную линию – линейным можно считать эндометрий, имеющий однородную и непрерывную линию смыкания его листков, нелинейность проявляется прерывистостью, зазубринами, линия смыкания может не визуализироваться;

5) наличие жидкости;

6) границу с миометрием;

7) кровоток.

Ультразвуковое сканирование в В-режиме позволяет оценить толщину эндометрия, измерить передне-задний размер двух листков эндометрия (М-Эхо), однородность структуры эндометрия, миометрия, четкость их границы. Ультразвуковая картина часто обладает достаточным полиморфизмом и зависит от локализации, объема, типа патологии. Установлено, что гиперпластические процессы эндометрия сопровождаются неоваскуляризацией. При использовании режима цветного доплеровского картирования проводят оценку внутриматочного и внутриопухолевого кровотока, кровеносных сосудов, их размер, разветвленность, интенсивность кровотока. В новообразованных сосудах визуализируется постоянный диастолический компонент, высокий индекс резистентности кровотока, а снижение индекса резистентности менее 0,4 свидетельствует о малигнизации процесса [84]. Одним из диагностических критериев полипов эндометрия является наличие питающего сосуда, исходящего из миометрия, так называемой «сосудистой ножки».

Общепринято считать толщину эндометрия в соответствии с фазой менструального цикла, где в раннюю фолликулярную фазу она составляет 4-6 мм, в середине – 8-10 мм, в секреторную фазу – до 15 мм. Несоответствие толщины м-эхо фазе менструального цикла в репродуктивном возрасте более 7-8 мм на 5-7 дни менструального цикла позволяет заподозрить ГЭ, при этом четких эхографических критериев не установлено [85]. В постменопаузальном периоде нормой следует считать толщину эндометрия не более 5 мм при длительности

менопаузы до 5 лет, и 4 мм при продолжительности менопаузы более 5 лет, а увеличение толщины эндометрия более 5 мм прямо коррелирует с возрастанием риска рака эндометрия с 0,07% до 7,3% соответственно [86, 87]. Оценивая М-эхо следует обратить внимание на однородность описываемой структуры, наличие эхопозитивных включений позволяет заподозрить полипы эндометрия еще в серошкальном режиме, однако не позволяет провести точную диагностику. Гидросонография позволяет увеличить чувствительность ультразвуковой диагностики патологии эндометрия путем улучшения визуализации очаговых изменений. Метод основан на улучшении визуализации патологического процесса полости матки путем создания эхонегативного фона при введении в полость матки 5-10 мл стерильного изотонического раствора, что позволяет провести дифференциальную диагностику некоторых патологических процессов полости матки.

При подозрении на ГЭ по УЗИ «золотым стандартом» является патологоанатомическое исследование операционного материала эндометрия.

Гистероскопия является методом прямой визуализации полости матки и позволяет визуально оценить эндометрий и провести прицельную биопсию измененных участков. Наличие участков диффузного утолщения эндометрия с повышенной васкуляризацией также позволяет заподозрить гиперплазию эндометрия, провести фракционное лечебно-диагностическое выскабливание и оценить качество манипуляции путем повторной визуализации [88] При гистероскопии возможна также визуализация субмукозных миоматозных узлов, полипов эндометрия и их удаление. Проводить гистероскопию для изучения и биопсии патологических процессов эндометрия следует в фолликулярную фазу цикла, а оптимальным временем для оценки секреторной трансформации эндометрия является лютеиновая фаза.

Сложности в проведении гистероскопии заключаются в использовании дорогостоящего оборудования, необходимости применения анестезии, за исключением офисной гистероскопии, проведении предоперационной подготовки. Имеются данные о возможности диссеминации атипических клеток

при проведении гистероскопии, за счёт поступления жидкости в брюшную полость через маточные трубы, однако ее роль в течении заболевания достоверно не установлена [89].

При отсутствии возможностей для гистероскопии, рекомендовано проведение фракционного лечебно-диагностического выскабливания полости матки с последующим патогистологическим исследованием (ПГИ).

Более щадящей диагностической методикой получения материала для ПГИ является аспирационная биопсия эндометрия, которая не уступает по точности фракционному диагностическому выскабливанию. Преимущества метода заключаются в безопасности, минимальной травматизации без дилатации цервикального канала, безболезненности, отсутствии предоперационной подготовки и госпитализации, снижении риска воспалительных осложнений.

Однако при диагностике очаговых изменений эндометрия, в том числе и очаговой гиперплазии с атипией и рака эндометрия, большую информативность имеет кюретаж эндометрия под гистероскопическим контролем [90].

В настоящее время идет интенсивный поиск молекулярно-генетических предикторов формирования ГЭ и ее прогрессии в ЭК. Группа исследователей США провела оценку 61 молекулярно-генетического маркера, прогностически значимыми оказались следующие три: потеря экспрессии PTEN, мутации гена репарации MSH1, соотношение ингибитора и индуктора апоптоза bcl-2/BAX [91].

Вообще, можно отметить, что *в клинических разработках патологии эндометрия велика роль фундаментальных исследований*, дающих направления для молекулярно-генетических и патоморфологических классификаций, основанных на них диагностических критериев и технологий. При этом классические клинические методы (например, эхография), применяемые более часто в рутинной работе врача-гинеколога незыблемо базируются на них. Однако морфология (а в скором времени и молекулярная диагностика при введении в клинические рекомендации новых классификаций ГЭ) является в клинической практике базой верификации диагноза. В этом очевидна неразрывная связь фундаментальных разработок и деятельности врача. Исследователи формулируют

рабочие гипотезы, проверяя их, создают теории, разрабатывают или совершенствуют на их основе диагностические технологии, апробируют в эксперименте патогенетически обоснованную терапию и внедряют ее в клинику, создавая инновационный паттерн трансляционной медицины в определенной области, который в последующем становится золотым стандартом работы.

#### **1.4. Общепринятые подходы к лечению гиперплазии эндометрия и развитие новых направлений**

Учитывая, что ГЭ имеет достаточно переменное течение, может спонтанно регрессировать или, напротив, прогрессировать в атипическую ГЭ / ЭИН – методы терапии ее разнообразны и включают консервативные методы и хирургическое лечение.

Так как в настоящее время нет способов прогнозирования течения ГЭ после хирургического лечения (лечебно-диагностическое выскабливание). Если не было выполнено радикальное вмешательство (гистерэктомия), рекомендована длительная гормональная терапия с патоморфологическим контролем излеченности [34, 92]. Выбор метода терапии определяется, прежде всего, результатами патоморфологического исследования, возрастом женщины, наличием сопутствующей патологии и в зависимости от репродуктивных планов пациентки. Выжидательная тактика в лечении ГЭ в настоящее время не применяется, поскольку, ожидая спонтанную регрессию процесса, пациентка подвергается неоправданному риску [93].

Первичным методом в лечении гиперпластических процессов эндометрия является *хирургический – фракционное лечебно-диагностическое выскабливание* полости матки под контролем гистероскопии. Однако метод не должен использоваться в качестве монотерапии, т.к. эффективность его достигает около 60 %, что обосновывает необходимость гормонального лечения [94-96].

Вопрос касательно хирургического удаления эндометрия (абляции эндометрия) является спорным и в настоящее время не рекомендуют использовать этот метод в связи с его травматичностью, невозможностью полностью исключить рецидив процесса, а также затруднениями в динамическом наблюдении за такими пациентками ввиду появления внутриматочных синехий. Консервативные методы лечения направлены на поддержание состояния эндометрия, нормализацию менструального цикла, профилактику обильных менструальных, межменструальных кровотечений и, как следствие анемизации пациентки. С учетом патогенетического влияния фоновых состояний, описанных выше, подход к терапии ГЭ должен быть комплексным и включать мероприятия по модификации образа жизни, диетотерапии, лечению ожирения, коррекции метаболического синдрома, синдрома поликистоза яичников, устранению инсулинорезистентности [97, 98].

Среди *препаратов терапии ГЭ* используют прогестагены, агонисты гонадотропин релизинг-гормона, антигонадотропины, КОК. Прогестагены занимают ведущее место в лечении ГЭ и в качестве противорецидивной терапии. Препараты данной группы оказывают стойкий антипролиферативный эффект на эндометрий, позволяя широко применять данную группу в профилактике ГЭ [34].

Синтетические прогестины оказывают выраженное антиэстрогенное и антипрогестероновое действие, истощая рецепторный аппарат эндометрия и являются альтернативой радикальному хирургическому лечению при ГЭ, особенно при нереализованной репродуктивной функции [99]. В настоящее время доступны несколько лекарственных форм: микронизированный прогестерон и синтетические препараты прогестерона с высокой биодоступностью и селективностью [100-103].

Ведущим препаратом, рекомендованным к применению в качестве терапии первой линии, является внутриматочная терапевтическая система (ВМС) с левоноргестрелом, эффективность которой в противорецидивном лечении достигает 100 % [104-107]. Левоноргестрел, выделяющийся ежедневно из резервуара, попадает в полость матки, распространяется в локальной сосудистой

сети и вызывает атрофические изменения в эндометрии, позволяя добиться желаемого терапевтического при минимальном системном воздействии и практически исключая системные побочные эффекты [108].

При применении ВМС, содержащей левоноргестрел, могут возникать побочные эффекты, снижающие приверженность к терапии у пациенток: ациклические кровянистые выделения, возникновение функциональных кист яичников, повышенный риск воспалительных заболеваний органов малого таза, экспульсия ВМС.

Пероральные формы гестагенов в непрерывном или циклическом режиме могут применяться в качестве второй линии терапии, при невозможности использования внутриматочной системы с левоноргестрелом, при этом эффективность непрерывного режима значительно выше циклического [109-111].

Среди этой группы препаратов доступны микронизированный прогестерон и дидрогестерон. Микронизированный прогестерон является натуральным препаратом, свойства которого улучшены за счет биодоступности, которая достигается благодаря микронизации частиц, увеличению площади стероида. По строению препарат имеет сходство с формулой эндогенного прогестерона. Возможность применения препарата интравагинально позволяет избежать эффекта первичного прохождения через печень, что особенно актуально у пациенток с экстрагенитальной патологией и позволяет применять препарат более длительно [112-114].

Медроксипрогестерона ацетат более 50 лет используется в лечении гиперпластических процессов с практически 100% эффективностью при непрерывном режиме приема. Ранее он применялся в инъекционной форме 150 мг 1 раз в 3 месяца. Однако в настоящее время он не всегда доступен [115, 116].

*Агонисты гонадотропин релизинг-гормона (ГнРГ)* блокируют деятельность гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси, воздействуют на рецепторную активность эндометрия, подавляя в нем пролиферацию. Агонисты ГнРГ позволяют достичь стойкого эффекта в лечении ГЭ (до 24 месяцев после окончания курса), однако являются дорогостоящими препаратами с выраженными

побочными эффектами, включая симптомы эстрогенного дефицита, вазомоторные нарушения, потерю минеральной плотности костной ткани с развитием остеопороза. Длительность курса не может превышать 3-6 месяцев и диктует необходимость применения так называемой *add-back* терапии (возвратная терапия, терапия прикрытия) после применения нескольких курсов лечения [117].

Агонисты ГнРГ в настоящее время рекомендованы к применению в лечении ГЭ в сочетании с миомой матки или эндометриозом.

В литературе имеются сведения о применении *ингибиторов ароматазы* в терапии ГЭ, однако эти препараты в настоящее время не используют при лечении, так как не обладают селективностью по отношению к эндометрию и их эффективность сопоставима с другими препаратами, а выраженность побочных эффектов практически сопоставима с АГнРГ [118, 119].

Применение *комбинированных оральных контрацептивов* снижает риск развития рака эндометрия на 50 % [120] и может рассматриваться в качестве противорецидивного лечения ГЭ без атипии у пациенток с необходимостью надежной контрацепции в долгосрочной перспективе. В литературе имеются сведения, свидетельствующие о возрастании эффективности контроля гиперпластических процессов с помощью пролонгированного режима приема КОК [121] Именно гестагенный компонент КОК позволяет снизить риск рецидива ГЭ. Соответственно, назначение КОК вместо общепринятых гестагенов должно иметь веское обоснование [122].

Хроническое воспаление – один из факторов, предрасполагающий к прогрессированию гиперпластических процессов эндометрия. Соответственно перспективным является противовоспалительная терапия различными препаратами, включая НПВС, т.к. фоновым заболеванием для ГЭ, вызывающим дисрегуляцию процессов пролиферации и апоптоза, является хронический эндометрит [123]. Что было описано нами выше при анализе исследовательских работ. Это направление является чрезвычайно важным в реализации и успешности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и других ВРТ. Часто по опыту работы практикующих врачей-репродуктологов потенциально возможное,

но латентное хроническое воспаление, не выявляемое общепринятыми морфологическими методами и не отвечающее стандартным критериям (наличие лейкоцитарной инфильтрации эндометрия, в том числе клетками CD138<sup>+</sup> при ИГХ диагностике), может играть важную роль при неудачах ЭКО. По единичным наблюдениям, назначение НПВС по случаю сопутствующей патологии после неудачных циклов ЭКО обеспечивает успешность имплантации у пациенток с отсутствием морфологической верификации хронического эндометрита по стандартным протоколам. Это порождает исследовательский интерес по проверке данной гипотезы, особенно, учитывая ценность разработок для ведения женщин репродуктивного возраста, экономической и социально-демографической значимости.

Таким образом, консервативная терапия ГЭ практически полностью базируется на патогенетическом подходе, имеет большие перспективы и потребности персонализации, использования новых фундаментальных разработок, с учетом эффективности, доступности и удобства применения, а также стоимости этой диагностики и лечения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Дизайн экспериментально-клинического исследования

Работа является экспериментально-клинической.

В эксперименте на самках белых крыс линии Вистар выполнено моделирование ГЭ путем двусторонней овариэктомии и трансдермального введения эстрогенов на протяжении 4 недель, по прошествии которых выполнена клиническая верификация ГЭ у животных и получено ее морфологическое подтверждение. Крысы с удаленными яичниками были разделены на группы сравнения: одну без лечения и три экспериментальные группы с тремя подходами к патогенетической терапии разными типами препаратов (НПВС, иммуномодулятор, фитопрепарат с антиэстрогенной активностью), которые вводили курсом перед выведением животных из эксперимента. Также была сформирована группа с ложной овариэктомией без модели ГЭ. После завершения терапии и эксперимента проводили морфологическое и ИГХ исследование матки.

В экспериментальной части нам впоследствии удалось усовершенствовать технику операции билатеральной овариэктомии, предложить способ еще менее травматичный и с более кратким периодом введения эстрогенов, позволяющим добиться ГЭ на протяжении 2 недель, что легло в основу поданной заявки на изобретение, а материал использован для исследовательских целей других научных разработок.

Клиническая работа выполнена в ретроспективном анализе клинических данных и гистологического архива биоматериала соскобов полости матки, полученных у женщин, обратившихся с АМК в университетскую клинику. Материалом для исследования стали соскобы полости матки, полученные от пациенток в ходе фракционного диагностического выскабливания под контролем гистероскопии. В зависимости от результата ИГХ реакции с маркером CD 138 (плазматические клетки) пациенток с ГЭ разделили на группы с наличием и

отсутствием хронического эндометрита и в дальнейшем провели дополнительные ИГХ исследования с другими маркерами воспаления и трансформации ткани.

Для исследований использованы общие клинические методы в рамках диагностической работы с пациентками и гистологические методики с ИГХ.

После анализа и сравнения полученных результатов в клинической части работы и опираясь на экспериментальные данные, были сформулированы новые подходы к диагностике и лечению неатипической формы ГЭ, наиболее ценные для женщин репродуктивного возраста, сформулированные в виде алгоритма с подробным описанием применяемых технологий.

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Молекулярная биология» в Центральной научно-исследовательской лаборатории и виварии Медицинского института ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», подтвердившего приемлемость исследований с биоэтических позиций. Авторы подтверждают, что содержание и использование животных соответствовало национальным законам, рекомендациям совета по исследованиям и правилам, принятым в учреждении. Работа с пациентками проведена с учетом биоэтических требований и с их информированного добровольного согласия, оформленного согласно актуальным требованиям. Представлена выписка из протокола № 10 заседания «Комитета по этике» от 26.10.2023 по данной теме.

## **2.2. Схема эксперимента и методика создания модели гиперплазии эндометрия на лабораторных грызунах**

*Эксперимент* проведен на 45 половозрелых самках белых крыс линии Вистар возрастом 5-6 месяцев, ранее выносивших и выкормивших приплод. Самки этого вида млекопитающих являются циклирующими полиэстричными с длительностью эстрального цикла 4 суток, они достигают половой зрелости в возрасте 2,5-3 месяца при достижении веса 120-150 грамм и более. Взяты животные весом 170-190 грамм, которых содержали в стандартных условиях. Они

предварительно в течение трех недель находились в изоляции от самцов, чтобы исключить беременность. У животных на основании цитологического контроля вагинальных мазков в динамике подтвердили половую циклику и выполнили ее синхронизацию, разместив их в клетки по группам в схожих фазах. Стадию проэструс определяли по наличию в мазке эпителиальных клеток с ядром, единичных чешуек и отсутствию лейкоцитов. В стадию эструс погибшие клетки в виде безъядерных чешуек заполняли все поле зрения. В стадию метэструс в мазке появлялись нейтрофильные гранулоциты и иногда единичные клетки с ядрами. В диэструс нейтрофилы преобладали. При взятии мазков в полдень у каждой особи стадии сменялись ежедневно, полный цикл составлял в среднем 4 дня (редко 5 дней). Крысы в клетках циклировали практически синхронно, что является биологической особенностью этого вида животных.

После адаптации с контролем цикла по оценке вагинальных мазков, с целью гормональной стандартизации и исключения воздействия эндогенных гормонов в лютеиновую фазу у 40 крыс проводили *билатеральную овариэктомию* с применением анестезии (изофлурановый наркоз) поясничным доступом. Контрольную группу составили 5 самок крыс после ложной овариэктомии (разрез без удаления яичника), находившихся в соответствующей фазе нормального эстрального цикла. Эта группа была группой сравнения для сопоставления гистологических изменений крыс с моделью ГЭ с нормальными физиологическими параметрами эндометрия циклирующих животных.

*Техника операции* была разработана автором диссертации, имеющим опыт хирургической клинической и экспериментальной работы. После усыпления крысу помещали в положение лежа на животе на подогреваемый коврик. Спинка была выбрита, а кожа очищена. Разрез выполняли на 1 см по срединной линии спины, раздвигая ткани, извлекали яичники с каждой из сторон из одного разреза. После хирургического вмешательства рану ушивали послойным швом. Операции на всех животных выполнены автором.

*Модель гиперэстрогении* создали у крыс с удаленными яичниками путем ежедневного введения эстрогенов через кожу живота курсом длительностью 4

недели в виде аппликации эстрадиол геля 0,1% (1 мг/мл) из расчета 1 мг на 1 кг веса. Гель наносили лопаточкой на кожу живота площадью 4 см<sup>2</sup> и втирали пальцем в виниловой перчатке. Введение эстрогенов начинали сразу после овариэктомии. Животные не слизывали гель, он впитывался под кожу. Исходя из расчета, наносили около 0,2 мг эстрадиола, что является дозой, эффективной для создания модели гиперэстрогении (впоследствии верифицированной морфологически ГЭ). Этот способ введения безболезненный и удобен для эксперимента. Расчет дозы проводили по рекомендациям дозировки препарата для человека, не найдя в литературе данных об опыте его применения в эксперименте на грызунах.

Через 4 недели от начала аппликаций геля был отмечен комплекс прямых морфологических и физиологических эффектов гиперэстрогении. У экспериментальных крыс на основании цитологии вагинальных мазков со второй недели введения эстрадиола выявлена персистенция эструса (на протяжении более 7-10 дней в мазке были только безъядерные чешуйки). При операции и выведении из эксперимента визуально толщина рогов матки в несколько раз превосходила контрольные показатели, а на тканевом уровне это было проявлено морфометрическими признаками увеличения соотношения площади желез к строме. На наш взгляд, эти данные подтверждают эффективность модели и являются более значимыми по сравнению с определением уровня гормонов в крови.

Перед началом моделирования ГЭ крыс рандомно и поровну *разделили на 4 группы* по 10 животных в каждой, в одной из которых не выполняли лечебных мероприятий, а в трех дифференцированно проводили патогенетическую коррекцию ГЭ тремя способами: 1) нестероидным противовоспалительным препаратом избирательным ингибитором циклооксигеназы 2 (внутримышечное введение раствора мелоксикама 0,02 мг 1 раз в сутки на протяжении 7 дней); 2) иммуномодулятором азоксимера бромидом (полиоксидоний в таблетках по 0,08 мг энтерально через зонд 2 раза в сутки на протяжении 14 дней); 3) растительной биологически активной добавкой с антиэстрогенной и антиоксидантной

активностью (индол форте в капсулах энтерально через зонд 1 раз в сутки на протяжении 14 дней). Препараты также дозировали путем пересчета дозы, рекомендованной для человека на массу тела крысы. Таким образом, сформированы 5 групп: контрольные крысы в фазе эструс (n=5), контроль ГЭ без терапевтической коррекции (n=10), три группы с коррекцией мелоксикамом (n=10), полиоксидонием (n=10), индолом (n=10). Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом спустя 4 недели (4 недели вводили эстрогены, из которых 2 последние недели вводили также индол или полиоксидоний, а мелоксикам – последние 7 дней дифференцированно в каждой группе) и проводили морфологическое исследование матки.

В последующем еще на 20 особях белых крыс возраста 3-4 месяца (10 с ложной овариэктомией и 10 с полной моделью ГЭ) техника операции и схема введения ГЭ были усовершенствованы и результаты представлены в виде заявки на патент, в диссертации эти результаты описаны в главе 3.

### **2.3. Программа диагностических исследований пациенток**

Материалом для исследования стали соскобы полости матки, полученные от пациенток в возрасте от 25 до 63 лет в ходе фракционного диагностического выскабливания под контролем гистероскопии (n=50).

Критерии включения: АМК при регулярном менструальном цикле либо кровотечение в периоде постменопаузы; УЗИ признаки гиперпластического процесса в эндометрии (толщина эндометрия не менее 5-7 мм в 1 фазу менструального цикла (5-7 день) в репродуктивном возрасте пациенток, не менее 3-4 мм в постменопаузе; информированное согласие пациентки.

Критерии исключения: ЭИН (атипическая ГЭ), онкологические процессы любой локализации; гормональная терапия, в том числе использование комбинированных оральных контрацептивов (КОК), тамоксифена, внутриматочных средств; отказ от участия в исследовании; данные об

инфекционной патологии половых путей; клинические проявления системных аутоиммунных заболеваний; невозможность соблюдения протокола исследования.

Использованы общие клинические методы в рамках диагностической работы с пациентками: сбор анамнеза, осмотр, физикальные методы, УЗИ, ПЦР-диагностика инфекций. Применены, как и в эксперименте, морфологические методы верификации патологии эндометрия и патофизиологической оценки его изменений: общая гистологическая техника и ИГХ, методы световой микроскопии, микросъемки и сканирования гистопрепаратов, морфометрия изображений.

В этой части работы после верификации диагноза ГЭ изучены морфологические и молекулярно-биологические изменения при ГЭ, выявлены особенности экспрессии маркеров воспаления.

Пациентки были систематизированы на две группы в зависимости от результата постановки ИГХ с маркером CD 138 (плазматические клетки): CD 138<sup>+</sup> неатипическая железистая ГЭ с наличием хронического эндометрита (n=19) и CD 138<sup>-</sup> неатипическая железистая ГЭ с отсутствием хронического эндометрита (n=31).

#### **2.4. Особенности использованных морфологических и лабораторных методов в эксперименте и в клинике**

*В эксперименте* средние сегменты рогов и тело матки крысы после извлечения были подготовлены для *гистопатологической оценки*. Для этого выполняли фиксацию в 10% забуференном формалине в течение 24 часов, затем проводку и заключение в парафин. Пропитку тканей парафином осуществляли в гистопроцессоре Logos Millestone (Италия). Изготавливали парафиновые мультиблоки, позволяющие монтировать на стекло фрагменты тканей крыс различных групп согласно схеме расположения. Стандартизация обеспечена

равной глубиной заливки, погружением идентичных участков и анализом контрольных образцов. Готовили срезы толщиной 4 мкм по стандартному способу. Окрашивание выполняли обзорным методом – гематоксилином и эозином для общей оценки патологического прогресса и верификации гиперплазии. Для количественного подтверждения гипотезы моделируемой ГЭ выбирали рандомные поля зрения на предметном стекле и подсчитывали высоту эндометрия и эпителиальных клеток в железах, соотношение площади желез и стромы, их дилатацию и клеточную инфильтрацию. Измерения проводили при 40-кратном увеличении.

ИГХ выполняли согласно рекомендованным протоколам. Преаналитический этап проводили в соответствии с требованиями молекулярной иммунодиагностики [124]. Парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм помещали на высокоадгезивные стекла X-TRA M/Slides (Leica). Постановку реакции ИГХ осуществляли в полуавтоматическом иммуногистостейнере Bond-MAX (Leica, Австралия) по протоколу, предустановленному производителем прибора с использованием режимов демаскировки и инкубации, рекомендованными производителями антител. Протокол включал депарафинизацию, блокировку эндогенной пероксидазы, высокотемпературную демаскировку, инкубацию с первичным антителом, детекцию продуктов реакции с помощью системы Bond Polymer Refine Detection (Leica, Великобритания). Депарафинизацию срезов осуществляли в растворе для депарафинизации на основе цитратного буфера Bond Dewax Solution (Leica, Великобритания) 10 мин при температуре 80°C. Высокотемпературную демаскировку антигенов делали с помощью раствора на основе EDTA буфера, pH 8,9 BondEpitopeRetrieval 2 (Leica, Великобритания) либо цитратного буфера pH 5,9-6,1 BondEpitopeRetrieval 1 (Leica, Великобритания) в течение 20 минут при температуре 96°C. Следующим этапом была инкубация с первичными антителами в рекомендованном производителем разведении в течение 30 минут при комнатной температуре. Разведение осуществляли с помощью раствора для разведения антител на основе трис-буфера Bond Primary Antibody Diluent (Leica, Великобритания). Далее выполняли блокировку

эндогенной пероксидазы (5 минут при комнатной температуре) а также визуализацию (инкубация с вторичными антителами 8 минут при комнатной температуре, инкубация с полимером в течение 8 минут и инкубация с хромогеном 10 минут, контрастирование ядер гематоксилином 5 минут) с помощью набора реагентов для детекции на основе полимера Bond Polymer Refine Detection [DS9800] (в состав набора входят пероксидазный блок, вторичные кроличьи антимышьи антитела (класс IgG), антикроличьи антитела (класс IgG) меченые полимером, диаминобензидин, раствор гематоксилина). После каждого этапа производили промывку препарата с помощью отмывочного раствора на основе Трис-буфера, pH 7,7, BondWashSolution 10X Concentrate (Leica, Великобритания) в разведении 1:10.

Методом ИГХ определяли экспрессию рецепторов к прогестерону и эстрогену с маркерами ER (клон 6F11 в разведении 1:100, Leica, Германия) PrR (клон 16 в разведении 1:100, Leica, Германия), пролиферативную активность клеток эндометрия – маркером G-фазы митоза Ki-67 (клон MM1 в разведении 1:50, Leica, Германия), состояние систем апоптоза с антителами к FAS-рецептору (CD 95, клон EPR5700 в разведении 1:200, Abcam, США) и антиапоптотическому белку bcl-2 (клон BCL-2/100/D5 в разведении 1:200, Leica, Германия), активность ангиогенеза с маркером VEGF (клон RB-9031-P1 в разведении 1:200 Thermo Scientific, США), а воспаления – с лимфоцитарными маркерами CD 4 (клон 4B12, RTU, Leica, Великобритания), CD 8 (клон 4B11 RTU, Leica, Великобритания), CD 138 (клон MI15, RTU, Leica, Великобритания), CD 20 (клон L26 в разведении 1:100, Leica, Великобритания). Данные интегрированы в таблице 1.

Оценивали интенсивность реакции при 20-кратном увеличении в 10 полях зрения отдельно в строме эндометрия и в железистых клетках в теле матки и роге. Для bcl-2, CD 95, VEGF, Ki-67 в баллах по шкале: 0 – отсутствие, 1+ 0-25% клеток имеют позитивное окрашивание, 2+ – это 25-75% и 3+ – более 75%. Для оценки экспрессии маркеров ER и PrR у крыс применяли аналогичную шкалу, а в клинической части исследования использовали шкалу Allred Score [125, 126]. Для CD 4, CD 8, CD 20, CD 138 подсчитывали количество позитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup>

среза. Оценивали экспрессию белков дифференцировано в доминантном правом роге матки (аналог тела матки человека – место плацентации и вынашивания потомства у многоплодных животных) и теле матки (аналог шейки матки человека – часть, предназначенная для проникновения спермы и изгнания плодов, активнее контактирующая с внешней средой).

Таблица 1. Особенности протоколов реакции иммуногистохимии с маркерами

Маркер (клон)	Каталожный номер	Производитель	Разведение	Демаскировка (минут)	Инкубация
ER (6F11)	ER-6F11-L-F	Leica	1:100	20 с буфером pH 6,0	30 минут при комнатной температуре
PrR (312)	PGR-312-L-CE	Leica	1:100	20 с буфером pH 6,0	
Ki-67 (MM1)	KI67-MM1-L-CE	Leica	1:50	20 с буфером pH 6,0	
CD 95 (EPR5700)	ab133619	Abcam	1:200	20 с буфером pH 6,0	
bcl-2 (D5)	BCL-2-L-CE	Leica	1:200	20 с буфером pH 6,0	
VEGF(RB-9031-P1)	MA5-38668	Thermo	1:100	20 с буфером pH 9,0	
CD 4 (4B12)	PA0427	Leica	RTU	20 с буфером pH 9,0	
CD 8 (4B11)	PA0183	Leica	RTU	20 с буфером pH 9,0	
CD 20 (L26)	CD20-L26-L-CE	Leica	1:200	20 с буфером pH 6,0	
CD 138 (MI15)	PA0088	Leica	RTU	30 с буфером pH 6,0	
CD 56(CD564)	CD56-504-L-CE	Leica	RTU	20 с буфером pH 6,0	

*Примечание:* RTU (англ.: ready to use), готовое к использованию антитело, не требующее разведения.

*В клинической части работы* для подтверждения гипотезы роли воспаления в патогенезе ГЭ нами было проведено ИГХ исследование, направленное на:

1. Подтверждение/исключение хронического эндометрита – ИГХ реакция с маркером плазмоцитов CD 138;
2. Оценку локального клеточного и гуморального иммунитета в эндометрии – ИГХ с маркерами CD 4 – Т-лимфоциты хелперы, CD 8 – цитотоксические лимфоциты, CD 56 – НК-клетки, CD 20 – В-лимфоциты;
3. Оценку рецепторного статуса эндометрия к эстрогенам и прогестерону ER и PrR для уточнения степени функциональной активности.

Для первичного разделения на группы ГЭ с CD 138<sup>+</sup> и CD 138<sup>-</sup> статусом эндометрия поставлена ИГХ с мышиним моноклональным антителом CD 138 (Syndecan 1) клон MI15 BOND RTU (демаскировка при pH буфера 6,0 в течение 20 минут, инкубация 30 минут). Для ИГХ с другими антителами использовали протоколы, указанные в таблице 1.

## **2.5. Методы математико-статистической обработки результатов**

Статистическую обработку данных экспериментальных и клинических морфологических исследований выполнили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 Stat Soft. Импульзовали метод Шапиро-Уилка для оценки нормальности распределения признака выборки. Для определения различий между группами сравнения применяли непараметрический метод по U-критерию Манна-Уитни или t-критерию Стьюдента (при нормальном распределении). Для корректировки уровня значимости при множественных сравнениях была введена поправка Бонферрони. Поскольку распределение признаков в группе чаще отличалось от нормального, данные статистики представлены в виде медианы и первого и последнего квартилей Me [Q1; Q3]. В случае нормального распределения значения признака данные представляли как среднее значение и среднеквадратическое отклонение ( $M \pm Sd$ ).

Для изучения связей между иммуноморфологическими данными экспрессии рецепторов, пролиферативной активности эпителиальных клеток и содержания иммунных и воспалительных клеточных популяций использовали корреляционный анализ по методу Спирмана.

Достоверными считали отличия при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ .

### ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ РАБОТЫ

#### 3.1. Морфологическая характеристика и иммунофенотипический профиль эндометрия на модели его гиперплазии без лечения

В группе животных с моделью ГЭ выявлен прирост железистого компонента, что существенно изменило железисто-стромальное отношение в сравнении с контрольной группой (рис. 1, табл. 2).

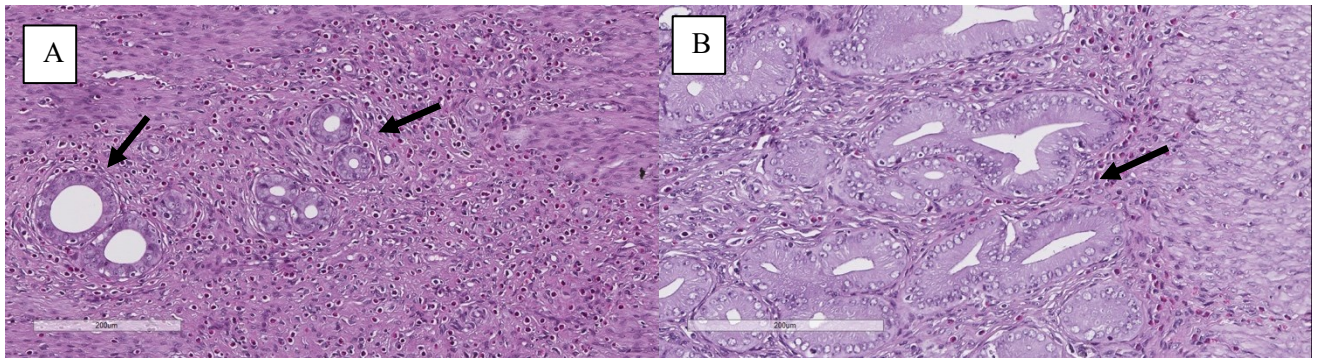


Рисунок 1. Гистологическое строение рога матки белой крысы в норме (А) и при моделируемой гиперплазии эндометрия (В), проявляющейся разрастанием желез, увеличением высоты клеток в них (железы указаны стрелками). Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 20х.

Обнаружено увеличение высоты железистых клеток, как в железах, так и в покровном эпителии просвета рога матки. Высота эпителиальных клеток составила  $42,3 \pm 9,6$  мкм, что в 2 раза превышает подобный показатель в контрольной группе ( $21,4 \pm 4,1$  мкм). Статистически значимое увеличение железисто-стромальных соотношений (рост железистого компонента при  $p \leq 0,05$ ), увеличение высоты эпителиальных клеток в железах ( $p \leq 0,001$ ) и высоты просветных эпителиальных клеток ( $p \leq 0,05$ ) в роге матки в группах с моделируемой ГЭ в сравнении с нормальным пролиферативным эндометрием верифицирует адекватность созданной модели ГЭ.

Таблица 2. Морфометрические характеристики эндометрия в рогах и теле матки крыс в норме и при моделировании гиперплазии

Измеряемый параметр	Экспериментальная группа	Контрольная группа
Строма в поле зрения, площадь, мкм <sup>2</sup>	366610,9±3185,1*	301641,6±62059,3
Железы в поле зрения, площадь, мкм <sup>2</sup>	145159,3±1761,2*	39645,39±21442,7
Соотношение Ж/С	0,39±0,007*	0,14±0,07
Высота просветных эпителиальных клеток, мкм	42,3±9,6*	21,4±4,1
Высота эпителиальных клеток в железах, мкм	34,5±13,4*	17,4±3,2

*Примечания:* \* статистически значимые отличия от контрольной группы; достоверность отличий определяли с использованием t-критерия Стьюдента при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ ; соотношение Ж/С – отношение площади, занимаемой железами, к площади, занимаемой стромой.

Результаты ИГХ анализа показали разнонаправленную динамику рецепторных нарушений при гиперэстрогении (табл. 3). Экспрессия рецепторов к прогестерону стабильно низкая во всех отделах матки у крыс всех групп, а к эстрогену – на модели ГЭ достоверно снижена в роге матки, что может быть вызвано активацией внутриклеточных систем ауторегуляции при избытке эстрогенов, при этом в аналоге шейки матки таких компенсаторных изменений нет.

При оценке числа лимфоцитов разных популяций в строме рога и тела матки при ГЭ выявлена интересная динамика: в тканях крыс контрольной группы лимфоциты CD 138<sup>+</sup>, CD 20<sup>+</sup>, CD 4<sup>+</sup> и CD 8<sup>+</sup> представлены относительно равным числом клеток, а в модели ГЭ самыми малочисленными оказались CD 138<sup>+</sup> клетки в роге и CD 8<sup>+</sup> в теле (табл. 4), что говорит об ингибировании плазмоцитов и Т-лимфоцитов в иммунном ответе этих тканевых зон на фоне ГЭ (рис. 2).

Таблица 3. Экспрессия рецепторов овариальных гормонов, маркеров пролиферации, апоптоза, фактора роста сосудов в матке крысы при моделируемой гиперплазии эндометрия

Показатель	Гиперплазия эндометрия				Контрольная группа			
	рог жел	рог стр	тело жел	тело стр	рог жел	рог стр	тело жел	тело стр
PrR	0,0 [0.0; 0.0]	0,0 [0.0; 0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]
ER	2,0 [2.0;2.0]*	2,0 [2.0;2.0]*	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]
VEGF	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]	3,0 [3.0;3.0]
CD95	3,0 [3.0;3.0]*	3,0 [3.0;3.0]*	3,0 [3.0;3.0]*	3,0 [3.0;3.0]*	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]
bcl2	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]	0,0 [0.0;0.0]
Ki-67	0,0 [0.0;1.0]*	1,0 [1.0;1.0]	0,0 [0.0;1.0]	1,0 [1.0;1.0]*	2,0 [2.0;2.0]	1,0 [1.0;1.0]	1,0 [1.0;1.0]	0,0 [0.0;0.0]

*Примечание:* жел – экспрессия рецепторов и регуляторных белков в железах; стр – экспрессия в строме; \* статистически значимые отличия от интактной группы; достоверность отличий определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ .

Таблица 4. Экспрессия маркеров клеток воспаления в строме эндометрия при моделируемой гиперплазии

Показатель	Гиперплазия эндометрия		Контрольная группа	
	рог матки	тело матки	рог матки	тело матки
CD 138	1,5 [0.0;3.0]*	0,0 [0.0;0.0]*	6,0 [5.0;8.0]	4,5 [3.0;6.0]
CD 20	5,0 [4.0;6.0]	2,0 [0.0;3.0]	6,0 [4.0;8.0]	5,0 [4.0;6.0]
CD 4	4,0 [3.0;9.0]	2,0 [1.0;3.0]	4,5 [4.0;7.0]	3,5 [2.0;5.0]
CD 8	7,0 [5.0;8.0]	2,0 [0.0;3.0]*	6,0 [5.0;8.0]	5,0 [4.0;6.0]

*Примечание:* \* статистически значимые отличия от интактной группы; достоверность отличий определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ .

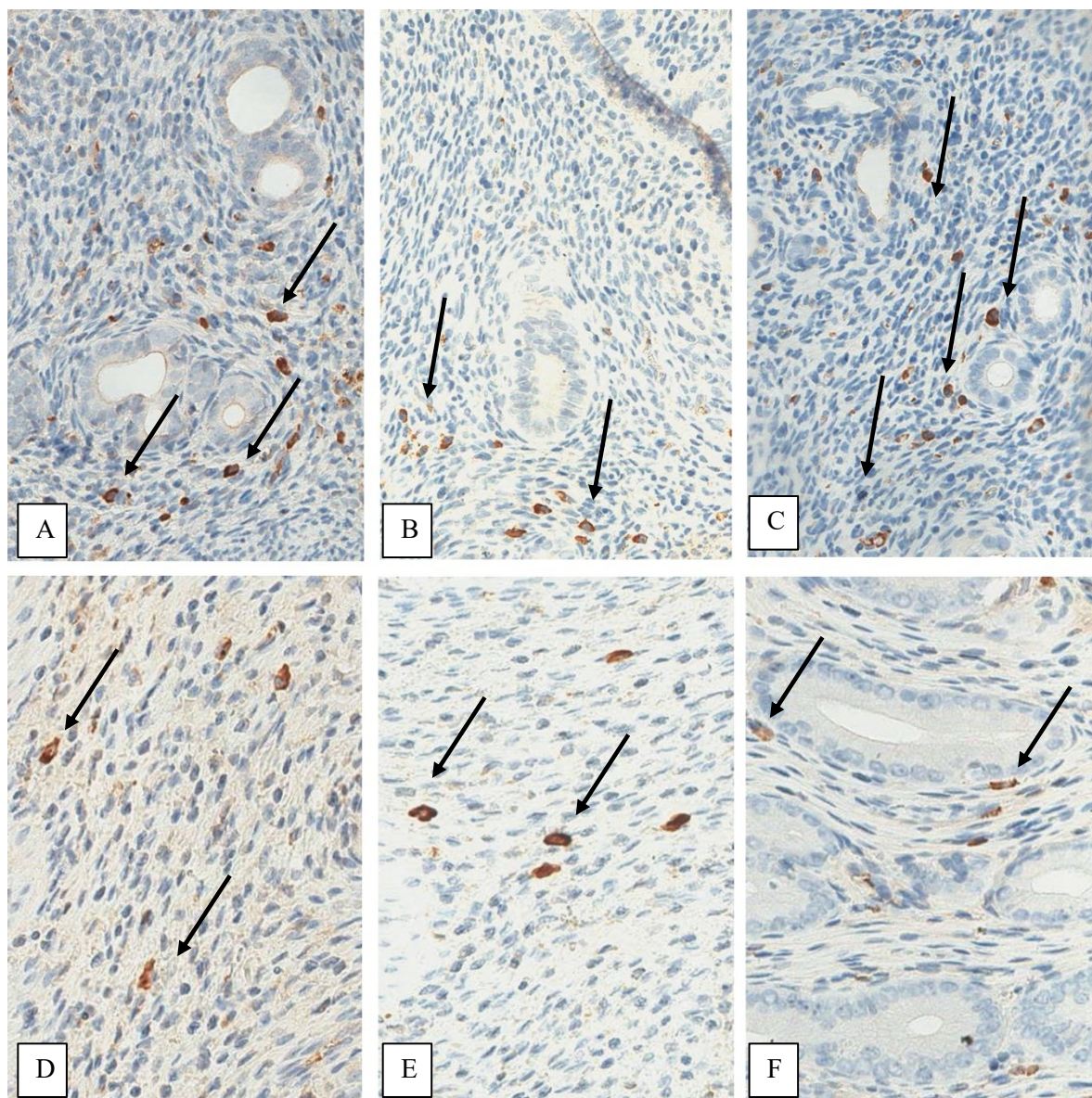


Рисунок 2. Фрагменты ткани рога матки крысы. Парафиновые срезы, иммуногистохимическая реакция. Объектив 40х. Лимфоцитарная инфильтрация в клетках стромы эндометрия рога матки. Реакция с маркерами к CD 4 (А), CD 8 (В), CD 20 (С) в контроле. Снижение числа иммунных клеток CD 4 (D), CD 8 (E), CD 20 (F) при гиперплазии. Позитивная реакция в клетках указана стрелками.

Таким образом, можно заключить, что модель ГЭ после овариэктомии у крыс и трансдермального введения эстрогенов с гистологической верификацией адекватна. Иммунофенотип эндометрия свидетельствует о том, что общими тенденциями при ГЭ является увеличение экспрессии маркеров апоптоза и снижение количества клеток лимфоидного ряда, в то время как изменение

экспрессии маркера регуляции ангиогенеза не выражено. Динамика изученных маркеров в эндометрии тела и рога матки экспериментальных животных других групп отличается.

### **3.2. Морфологическая характеристика и иммунофенотипический профиль эндометрия на модели гиперплазии с применением трех групп препаратов: нестероидных противовоспалительных, иммуномодулирующих, антиэстрогенных**

В аналитической части этого раздела работы также оценивали экспрессию рецепторов, регуляторных белков, маркеров клеток дифференцировано в доминантном правом роге матки (аналог тела матки человека – место плацентации и вынашивания потомства у многоплодных животных) и теле матки (аналог шейки матки человека). Результаты ИГХ анализа показали динамику исследованных маркеров (табл. 5). Как видно, в таблице для некоторых маркеров есть нулевые медианы с квартилями, то есть изучаемые воздействия не оказывали влияния на эндометрий животных. Считаем корректным указывать эти значения не только при нулевых показателях, но во всех случаях, когда значения в разных группах были идентичны, чтоб не потерять возможность оценки реальной экспрессии маркера в данной группе.

Экспрессия PrR низкая во всех группах, лишь при коррекции гиперплазии индолем строма рога матки приобретает умеренно повышенную рецепторную активность. Наоборот, экспрессия рецепторов к эстрогену в роге матки достоверно снижается при моделировании ГЭ, а в теле матки крысы – нет. Это можно объяснить эффективной активацией внутриклеточных систем ауторегуляции клеток-мишеней овариальных гормонов в зоне имплантации. Важно, что в группе с коррекцией мелоксикамом в аналоге шейки матки выявлено снижение числа эстрогеновых рецепторов.

Таблица 5. Экспрессия рецепторов овариальных гормонов, маркеров пролиферации, апоптоза, фактора роста сосудов и клеток воспаления в матке экспериментальных крыс

Показатель	Коррекция индол	Коррекция полиоксидоний	Коррекция мелоксикам	ГЭ без коррекции	Интактная группа
PrR рог жел	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
PrR рог стр	1,0[1.0;1.0]*#	0,0[0.0;1.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
PrR тело жел	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
PrR тело стр	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
ER рог жел	3,0[3.0;3.0]#	3,0[3.0;3.0]	2,0[2.0;2.0]*	2,0[2.0;2.0]*	3,0[3.0;3.0]
ER рог стр	3,0[3.0;3.0]#	2,0[2.0;2.0]*	2,0[2.0;2.0]*	2,0[2.0;2.0]*	3,0[3.0;3.0]
ER тело жел	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	1,0[1.0;1.0]*#	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]
ER тело стр	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	1,0[1.0;1.0]*#	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]
VEGF рог жел	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]
VEGF рог стр	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]
VEGF тело жел	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]
VEGF тело стр	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]	3,0[3.0;3.0]
CD 95 рог жел	3,0[3.0;3.0]*	3,0[3.0;3.0]*	1,0[1.0;1.0]#	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]
CD 95 рог стр	3,0[3.0;3.0]*	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]#	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]
CD 95 тело жел	3,0[3.0;3.0]*	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]#	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]
CD 95 тело стр	3,0[3.0;3.0]*	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]#	3,0[3.0;3.0]*	0,0[0.0;0.0]
bcl2 рог жел	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
bcl2 рог стр	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
bcl2 тело жел	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
bcl2 тело стр	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]	0,0[0.0;0.0]
Ki-67 рог жел	2,0[2.0;3.0]#	1,0[1.0;1.0]*	1,0[1.0;2.0]	0,0[0.0;1.0]*	2,0[2.0;2.0]
Ki-67 рог стр	1,0[1.0;1.0]	1,0[1.0;1.0]	1,0[1.0;2.0]	1,0[1.0;1.0]	1,0[1.0;1.0]
Ki-67 тело жел	2,0[2.0;2.0]	0,0[0.0;0.0]	1,0[1.0;1.0]	0,0[0.0;1.0]	1,0[1.0;1.0]
Ki-67 тело стр	1,0[1.0;1.0]*	1,0[1.0;1.0]*	1,0[1.0;1.0]*	1,0[1.0;1.0]*	0,0[0.0;0.0]
CD 138 рог	3,0[3.0;4.0]	3,5[3.0;5.0]	5,0[3.0;6.0]#	1,5[0.0;3.0]*	6,0[5.0;8.0]
CD 138 тело	0,0[0.0;0.0]*	0,0[0.0;1.0]*	4,0[3.0;5.0]#	0,0[0.0;0.0]*	4,5[3.0;6.0]
CD 20 рог	4,5[3.0;8.0]	6,5[5.0;8.0]	8,5[5.0;12.0]	5,0[4.0;6.0]	6,0[4.0;8.0]
CD 20 тело	2,5[2.0;3.0]	0,0[0.0;1.0]*	8,0[6.0;10.0]#	2,0[0.0;3.0]	5,0[4.0;6.0]
CD 4 рог	6,5[5.0;7.0]	18,5[12.0;20.0]*#	13,5[7.0;30.0]#	4,0[3.0;9.0]	4,5[4.0;7.0]
CD 4 тело	3,0[2.0;4.0]	5,5[4.0;8.0]#	5,5[5.0;8.0]#	2,0[1.0;3.0]	3,5[2.0;5.0]
CD 8 рог	6,0[5.0;6.0]	13,5[9.0;24.0]	8,5[6.0;19.0]	7,0[5.0;8.0]	6,0[5.0;8.0]
CD 8 тело	1,5[1.0;2.0]*	6,0[5.0;6.0]#	15,5[9.0;18.0]#	2,0[0.0;3.0]*	5,0[4.0;6.0]

*Примечания:* жел – экспрессия рецепторов и регуляторных белков в железах; стр – экспрессия в строме; для маркеров клеток воспаления активность определяли только в строме; \* статистически значимые отличия от интактной группы; # - статистически значимые отличия от группы ГЭ без коррекции. достоверность отличий определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни при вероятности ошибки  $p \leq 0,05$ ; Значения экспрессии маркеров PrR, ER, VEGF, CD 95, bcl2 и Ki67 приведены в баллах, для маркеров CD 138, CD 20, CD 4, CD 8 – указано число клеток в поле зрения.

Маркеры апоптоза неодинаково проявлены в тканях крыс разных групп. Экспрессия CD 95 в модели ГЭ высокая по сравнению с контролем во всех зонах. Группа с коррекцией мелоксикамом практически не отличается от интактной группы и имеет также низкую экспрессию этого маркера, за исключением умеренного повышения экспрессии в эпителии желез рога матки. А другие группы с терапевтической коррекцией значительно отличаются от группы коррекции мелоксикама, показавшего свою эффективность по сравнению с полиоксидонием и индолом.

При гиперплазии повышается экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в теле матки, при этом она не поддается коррекции выбранными нами препаратами: в эпителии желез количество клеток, «готовых» к пролиферации, больше варьирует среди групп и не всегда статистически значимо. Этот показатель в железах приближается к аналогичным значениям крыс контрольной группы и при коррекции индолом. Динамика экспрессии Ki-67 в железах не имеет закономерностей.

У крыс группы контроля лимфоциты с кластерами дифференцировки CD 138, CD 20, CD 4 и CD 8 представлены достаточно равномерно (рис. 3). При модели ГЭ CD 138<sup>+</sup> клетки в роге матки и CD 8<sup>+</sup> в теле встречаются редко. Все используемые нами препараты меняют соотношение клеточных популяций в эндометрии, приближая их к показателям крыс контрольной группы, однако мелоксикам более эффективен в отношении Т, В- клеток, плазмоцитов и Т-хелперов в роге и теле матки, а полиоксидоний – преимущественно в роге. Использование всех препаратов смещает соотношение CD 4<sup>+</sup>/CD 8<sup>+</sup> лимфоцитов в сторону Т-хелперов.

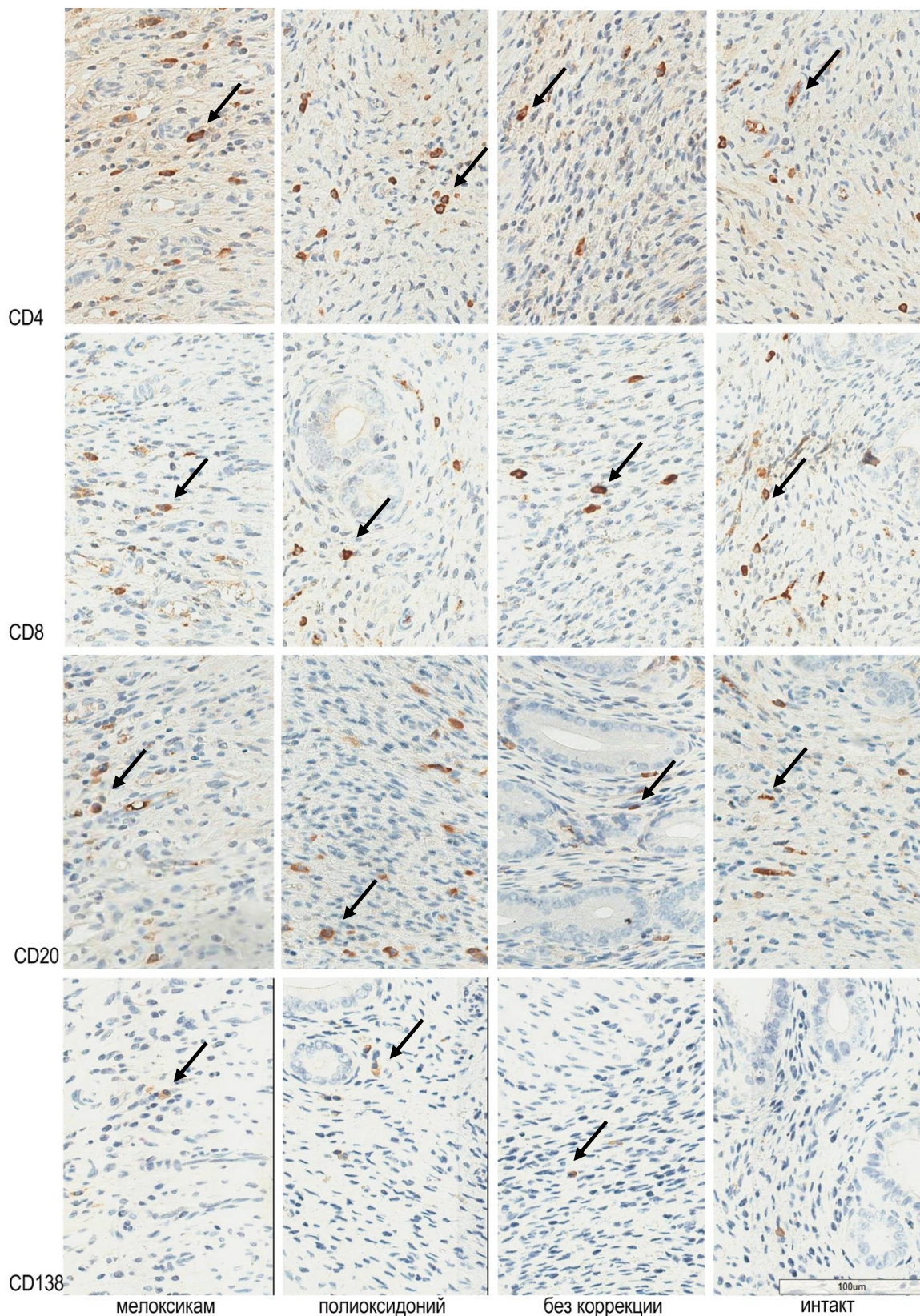


Рисунок 3. Фрагменты ткани рога матки крысы. Парафиновые срезы, ИГХ реакция. Объектив 40х. Экспрессия маркеров воспаления в роге матки экспериментальных и контрольных крыс с разными подходами к коррекции гиперплазии. Позитивная реакция клеток указана стрелками.

Таким образом, при ГЭ компенсаторно снижается количество рецепторов эстрогена, активность пролиферации в железах и число В-лимфоцитов, но резко активируется апоптоз. При этом индол оказывает антиэстрогенный эффект за счет роста чувствительности к прогестерону и приближает экспрессию маркера пролиферации в железах к значениям интактной группы, а мелоксикам приближает к норме число рецепторов апоптоза, маркеров пролиферации и инфильтрации иммунными клетками. В эффекте мелоксикама обращает на себя внимание то, что он нормализует все показатели в роге матки за исключением экспрессии рецепторов эстрогенов, на которую он влияет лишь в теле матки крыс. В наиболее опасной в плане пролиферации и метаплазии зоне (аналог шейки матки человека) динамика иная: на модели ГЭ увеличивается активность рецепторов апоптоза и пролиферации и снижается число Т и В-лимфоцитов, при этом мелоксикам оказывает выраженное антиэстрогенное действие, нормализует показатели числа иммунокомпетентных клеток и, как и в других участках матки, нормализует кинетику клеточных популяций, что проявляется нормализацией экспрессии маркера апоптоза, а индол и полиоксидоний не оказывают такой эффект.

Выявленные закономерности взаимосвязанных гиперпластических и иммунных изменений эндометрия представляют интерес для продолжения исследования их как диагностических критериев и патогенетической коррекции в практической медицине.

### **3.3. Совершенствование способа моделирования гиперплазии эндометрия у лабораторных животных**

Как указано выше, после завершения эксперимента на модели ГЭ по технологии оперативного вмешательства, описанного в разделе 2, и получив хорошие результаты, выгодно отличающиеся от моделей других научных групп,

мы все же занялись дальнейшей доработкой техники операции и схемы введения гормонов.

Разработка способа моделирования ГЭ у лабораторных животных путем проведения дорсального доступа при овариэктомии, уменьшающего время и травматичность операции, минимизирующая повреждения других органов и снижающая вероятность развития воспалительных послеоперационных осложнений перспективна. В технике ее выполнения возможно уменьшить длину разреза, использовать менее травматичный шовный материал, а также эффективные антисептические и противовоспалительные препараты. Вторым важным направлением совершенствования нашей базовой модели стало сокращение длительности процесса развития ГЭ за счет увеличения дозы вводимого эстрогена. Результаты легли в основу заявки на патент, мы считаем важным подробно описать их в разделе 3 в связи с тем, что эта техника овариэктомии и протокол создания ГЭ разработаны нами для будущих исследований и они могут представлять интерес для различных направлений изучения эндометрия и экспериментального воздействия на матку лабораторных грызунов.

Предлагается использовать билатеральную овариэктомию с применением анестезии поясничным доступом в диэструсе, с последующим трансдермальным ежедневным введением эстрадиола.

В качестве модельных животных используют зрелых самок белых крыс линии Wistar, возраст 3-6 месяцев, масса тела 170-200 грамм, являющихся циклирующими полиэстричными животными. В течение 10 дней после помещения в клетки вивария в стандартные условия со свободным доступом к воде и пище, а также 12-часовым световым днем, животные проходят адаптацию. Ежедневно проводят контроль эстральных циклов путем исследования вагинальных мазков. После периода адаптации и синхронизации цикла, с целью исключения воздействия эндогенных гормонов и для гормональной стандартизации эстрального цикла, всем животным проводят двустороннюю овариэктомию в фазе диэструс.

В асептических условиях с применением анестезии – Золетил в дозе 10 мг/кг живого веса, производят удаление шерсти с операционного поля, обрабатывают операционное поле дважды растворами антисептиков: этиловый спирт 70 % + хлоргексидина биглюконат 0,05 %. Крысу фиксируют в положении на животе на подогреваемой поверхности с температурой +38°C.

Производят прокол кожи по срединной линии спины в области наиболее тонкого слоя поясничных мышц с последующим тупым расширением тканей до 0,5 см, затем – вскрытие париетальной брюшины. Для выделения и извлечения комплекса рог – яичник для минимизации травматизма и уменьшения разреза используют крючок маточный прямой для экстракции внутриматочной спирали. Брыжейку с сосудами и частью маточного рога (2-3 мм) прошивают и перевязывают монокрилом 4,0, что позволяет минимизировать повреждение и тканевую реакцию за счет того, что шовный материал монофиламентный и подходит для операций с наименьшей инвазивностью. Яичник и часть рога матки иссекают.

На остаток рога наносят антиадгезин – гель противоспаечный рассасывающийся стерильный: шприцы 3 г. Производят контроль гемостаза. Прокол ушивают однорядным непрерывным швом – монокрил 4,0. Повторяют операцию на контралатеральной стороне по такой же схеме. Оба яичника оперируют из одного разреза. Повторно производят контроль гемостаза. Общая кровопотеря не должна составлять больше, чем 0,25 мл. Накладывают отдельные узловы швы на кожу – монокрил 4,0. Обрабатывают раствором антисептика, например, используют бриллиантовый зеленый 1 %.

В течение 10 дней проводят ежедневный контроль вагинальных мазков, наблюдение за состоянием и восстановлением животных.

Состояние гиперэстрогении создают у животных с удаленными яичниками путем ежедневного введения эстрогенов через кожу живота курсом длительностью 14 суток в виде аппликации эстрадиол геля 0,1 % – 1 мг/мл из расчета 1,5 мг на 1 кг живого веса, что безболезненно и удобно для эксперимента.

Гель наносят на кожу живота площадью 4 см<sup>2</sup> лопаточкой и втирают пальцем в виниловой перчатке. Исходя из расчета, наносят около 0,3 мг эстрадиола, что является дозой, эффективной для создания гиперэстрогении.

ГЭ верифицируют с 14 суток, что позволяет проводить экспериментальные исследования.

Выполнение дорсального доступа при овариэктомии является более щадящим, сокращает время операции, минимизирует повреждения других органов, исключает осложнения в виде перитонита и развития спаечного процесса. Нанесение в ходе операции на поврежденные органы антиадгезина – противоспаечного рассасывающегося стерильного геля, создающего временное вязкое покрытие между повреждёнными тканями обеспечивает скольжение соседних поверхностей, предупреждая образование спаек в период заживления, использование для ушивания ран монокрила, также позволяет минимизировать повреждение и тканевую реакцию, снижает риск развития послеоперационных осложнений.

Последующее после овариэктомии введение высокой дозы эстрогена способствует скорому достижению состояния гиперэстрогении и надежному развитию ГЭ, что позволяет сократить срок опыта и проводить более точную и информативную оценку новых методов лечения и потенциала лекарственных средств в доклинических исследованиях. Морфологически ГЭ верифицируется с 14 суток, когда можно начинать экспериментальные исследования.

Важно отметить, что эту операцию можно выполнять на животном несколько раз, использовать одну особь для отработки разных моделей. Например, после овариэктомии, создать модель ГЭ, затем спустя 3-4 недели коррекции взять рог матки с одной стороны, затем спустя 3-4 недели воздействия – рог матки с другой стороны.

Так, в наших экспериментах, у 10 самок крыс линии Wistar возрастом 3 месяца и средним весом 171,54±5,61 граммов проведено моделирование ГЭ таким способом. Контрольную группу составили 10 самок аналогичного возраста и веса, перенесших ложную овариэктомию (все хирургические манипуляции проводили

аналогично, за исключением удаления яичников и введения эстрадиола). Через 14 суток после операции у крыс экспериментальной группы отмечен комплекс прямых морфологических и физиологических эффектов гиперэстрогении: на основании цитологической картины вагинальных мазков с 8 суток введения эстрадиола выявлена персистенция эструса; при аутопсии макроскопически толщина маточных рогов в три раза превосходит контрольные показатели; при гистологическом исследовании это проявлено морфометрическими признаками увеличения соотношения площади желез к строме (до 0,49), что является признаком ГЭ, по сравнению с контрольной группой (отношение железистого компонента к стромальному составило 0,13).

Полученные данные демонстрируют, что улучшенный способ позволяет смоделировать ГЭ у крыс, приближенную к ее реальным клинико-морфологическим характеристикам, и при этом обеспечивает выживаемость лабораторных животных в эксперименте, дает возможность изучения механизмов развития заболевания и позволяет оценивать эффективность потенциальных способов лечения и профилактики ГЭ на экспериментальной модели.

## ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ РАБОТЫ

### 4.1. Морфологические критерии верификации неатипической железистой гиперплазии эндометрия

В результате обзорного гистологического исследования соскобов полости матки определено наличие неатипической железистой ГЭ очагового либо распространенного характера в рамках объема исследованного материала. Основными диагностическими морфологическими критериями для верификации ГЭ без атипии являются изменения железистого и стромального компонентов:

1) наличие неравномерного железистого компонента с соотношением желез к строме не менее чем 3:1 (рис. 4);

2) вариабельность размеров и формы желез, кистозная трансформация либо нарушение их архитектоники с участками ветвления желез и других вариантов иррегулярности их контура – эпителий желез пролиферативного типа с участками псевдостратификации, заметной митотической активностью (1-3 фигуры типических митозов в одной железистой структуре) (рис. 5);

3) выстилка желез представлена преимущественно цилиндрическим эпителием с умеренной эозинофильной цитоплазмой, вытянутыми овоидными ядрами, ориентированными перпендикулярно относительно базальной мембраны (рис. 5);

4) очаги метапластических изменений эпителиальной выстилки: эозинофильная, папиллярная, незрелая плоскоклеточная (в том числе морулярная), мерцательная, светлоклеточная, муцинозная (рис. 6);

5) отсутствие цитологических признаков атипии, что проявляется в нормальном ядерно-цитоплазматическом соотношении, ровными контурами ядерной мембраны, отсутствии атипических митозов;

б) строма скудная, при этом с четкой визуализацией базальных мембран желез.

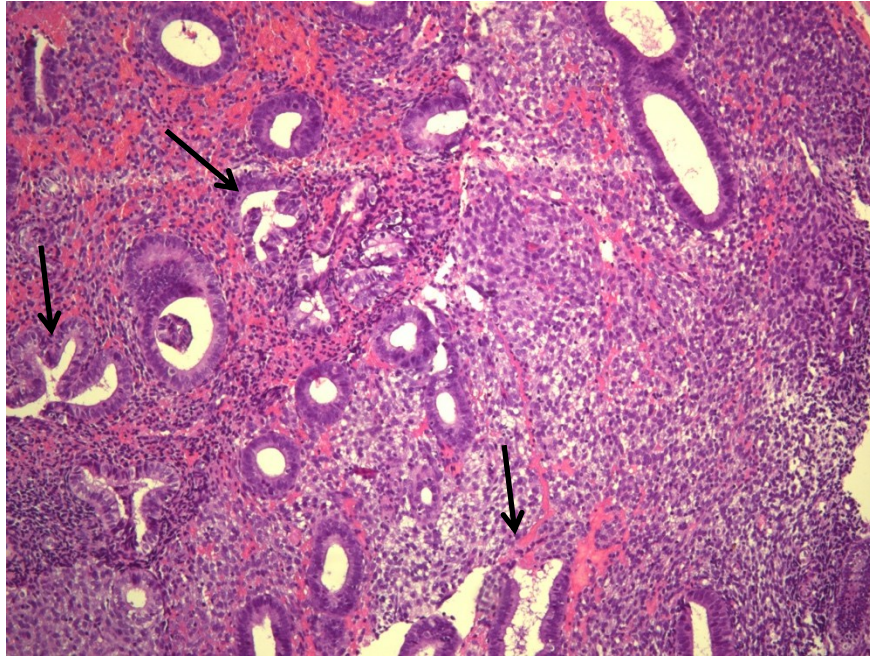


Рисунок 4. Соскоб полости матки. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 20х. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Неравномерное расположение желез пролиферативного типа (стрелки) в строме.

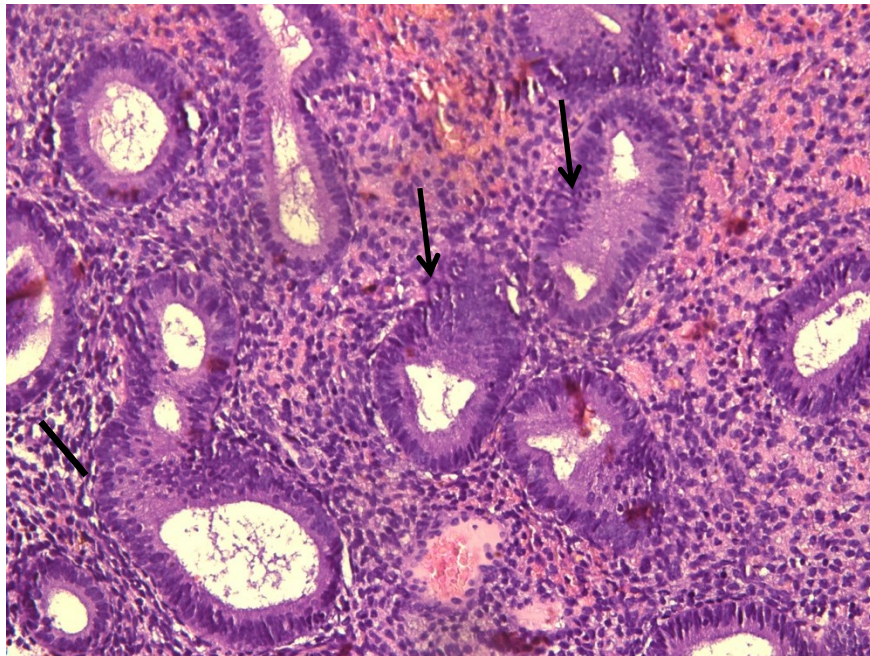


Рисунок 5. Соскоб полости матки. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 40х. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Псевдостратификация эпителия (стрелки). Типические митозы в эпителии желез.

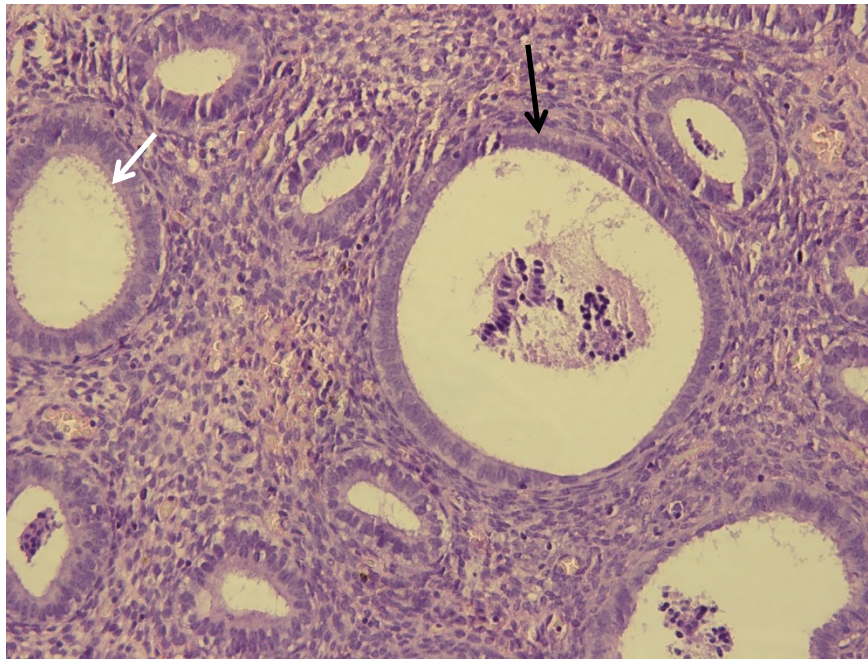


Рисунок 6. Соскоб полости матки. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 40х. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Кистозно-трансформированная железа (черная стрелка) в очаге неатипической гиперплазии эндометрия, мерцательная метаплазия эпителия желез (белая стрелка).

Стромальный компонент представлен обилием различных клеточных элементов, различающиеся в количественном отношении в рамках нашего исследования. Среди них на светооптическом уровне можно выделить иммунные и фибробластические клетки. В целом у всех пациенток с неатипической железистой ГЭ наблюдается чередование участков стромы компактного строения и неравномерного отека. Сосудистая сеть усилена, что проявляется в увеличении плотности разрастания спиральных артерий, не характерных для ранней пролиферативной фазы менструального цикла и менопаузального (пре- и пост-) эндометрия. Гемодинамические нарушения в пределах даже одного соскоба полости матки имеют различную степень выраженности и мозаичный характер. Так, наблюдается чередование участков гиперемии капилляров и паретического расширения сосудов, в том числе синусоидального типа. Часть сосудов с явлениями сладжа эритроцитов, наличием тромбозов и кровоизлияний: от

периваскулярных петехиальных до участков геморрагической инфильтрации (рис. 7).

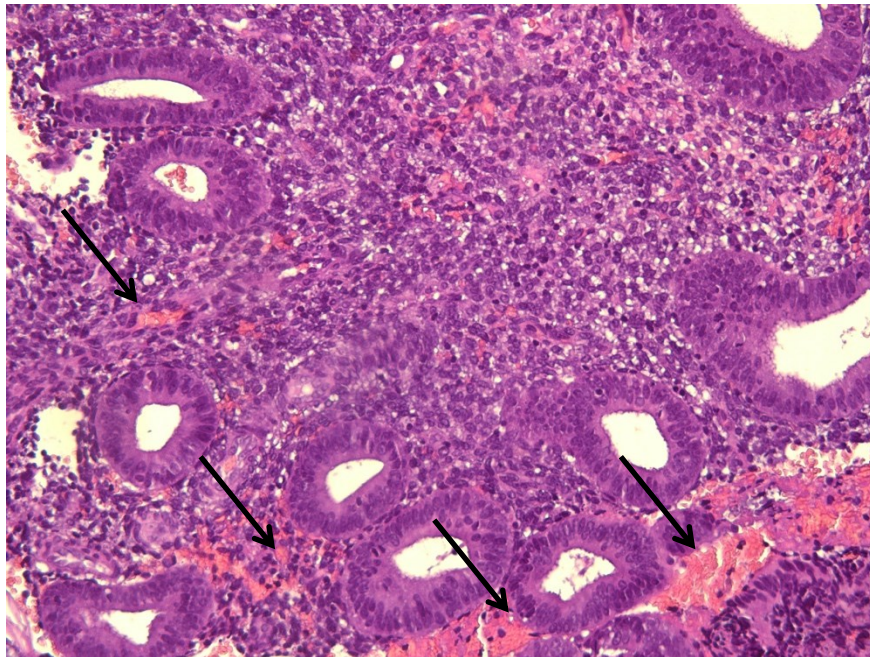


Рисунок 7. Соскоб полости матки. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 40х. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Гиперемия спиральных артерий и сосуда синусоидального типа (стрелки). Очаговые кровоизлияния.

В 27 % случаев строма характеризуется чередованием участков отека и очагов разрастания соединительнотканых волокон, вплоть до участков перигландулярного и периваскулярного фиброза с формированием муаровых структур. Количество клеточных элементов в данных очагах резко уменьшается, и в основном представлено популяцией фибробластоподобных клеток вытянутой формы с овоидными ядрами, умеренной эозинофильной цитоплазмой либо веретеновидными клетками с заостренными овоидными ядрами по типу фиброцитов. В этих участках наблюдается и структурная перестройка стенок сосудов, за счет их склерозирования. Клетки эндотелия уплощаются, располагаются параллельно базальным мембранам сосудов (рисунок 8).

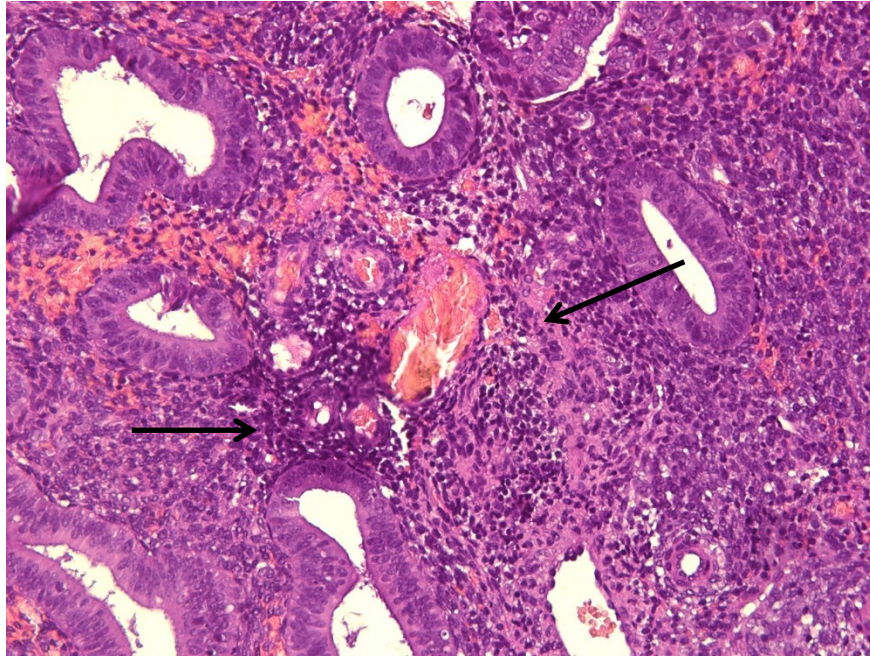


Рисунок 8. Соскоб полости матки. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 40х. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Очаг периваскулярного склерозирования стромы с лимфоидной инфильтрацией (стрелки).

В 9 % случаев за счет ремоделирования стромы и гиперплазии железистого аппарата эндометрий формирует полиповидные выросты с наличием пучков утолщенных спиральных сосудов, а в 3 % на фоне полиповидной неатипической железистой гиперплазии определяется наличие железистых и/или железисто-фиброзных полипов эндометрия с фиброзно-сосудистыми основаниями и очаговыми проявлениями воспалительной инфильтрации, а также гемодинамических нарушений с тромбозами питающих сосудов, приводящих к очаговым некробиотическим изменениям, дистрофическому полиморфизму, явления реактивной атипии эпителия желез.

Иммунные клетки стромы диффузно располагаются в перигландулярных и периваскулярных пространствах, однако в некоторых случаях отмечается наличие очаговых лимфоидных скоплений вплоть до формирования лимфоидных агрегатов и даже фолликулов с расширенными герминативными центрами, что, по-нашему мнению, является свидетельством персистирующей антигенной

стимуляции. Определяются участки интраэпителиальной инфильтрации лимфоидными клетками (рис. 9).

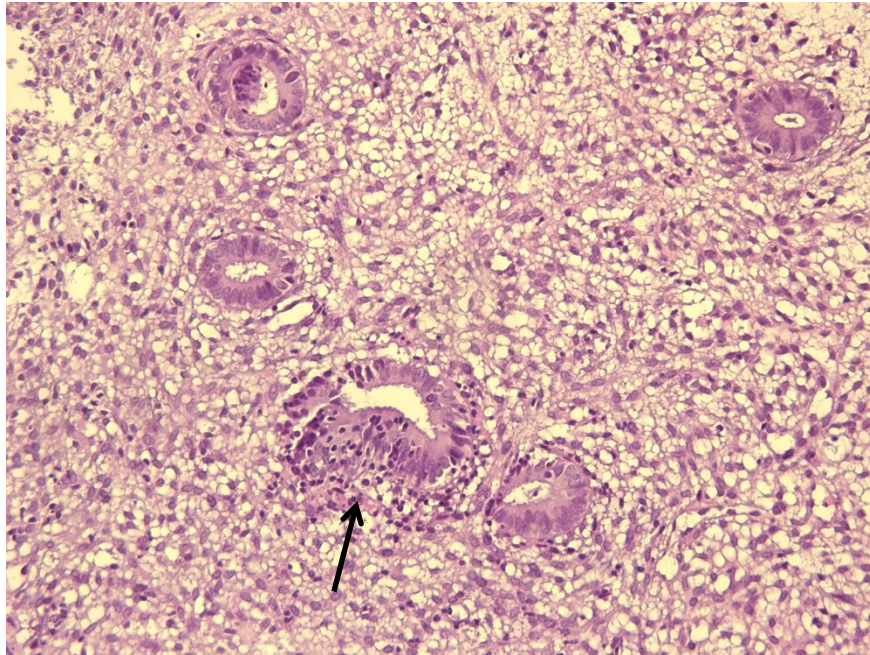


Рисунок 9. Соскоб полости матки. Парафиновый срез. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 40х. Неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Перигландулярная и интраэпителиальная инфильтрация малыми лимфоцитами (стрелка).

Превалирующими популяциями являются лимфоидные клетки и макрофаги. Лимфоциты в основном представлены малыми формами с округлыми мноморфными гиперхромными клетками с узким едва заметным ободком цитоплазмы. В светлых зонах лимфоидных агрегатов определяется наличие лимфоцитов средних размеров по типу иммунобластов. В некоторых случаях на светооптическом уровне определяются единичные клетки с плазмоцитоидной цитоплазмой, эксцентрически расположенным ядром и наличием перинуклеарного просветления. Данные клетки при ИГХ исследовании впоследствии были идентифицированы как CD 138<sup>+</sup> плазмоциты.

Макрофагальная популяция представлена клетками средних размеров с обильной эозинофильной цитоплазмой, округлым ядром с неровными контурами ядерной мембраны и крупнодисперсным хроматином.

В очагах некробиотического повреждения и перифокальных участках определяется примесь лейкоцитов, в том числе нейтрофильных гранулоцитов, иногда инфильтрирующих эпителий желез.

Таким образом, морфология поясняет и иллюстрирует патофизиологические пути структурных изменений эндометрия. Морфологическая диагностика неатипической железистой ГЭ не представляет сложности, но требует сочетания с ИГХ для уточнения диагноза и выявления хронического эндометрита, подтвержденного инфильтрацией эндометрия CD 138<sup>+</sup> клетками, что стало вторым этапом работы в данном разделе.

#### **4.2. Полиморфизм проявлений неполной картины хронического эндометрита при железистой гиперплазии эндометрия**

Персонафицированный подход, основанный на ИГХ определении наличия воспаления эндометрия, позволяет отнести пациенток к различным группам, в зависимости от которых будет определен алгоритм введения, назначена патогенетическая терапия (в данном случае этиотропная при наличии инфекций половых путей и патогенетическая НПВС при наличии воспаления), а также возможность предпринять меры профилактики прогрессии и развития ЭК. На основании полученных данных возможна разработка эффективных предложений по совершенствованию терапии.

Проведенное ИГХ исследования с маркером CD 138 в объеме нашей выборки установило наличие верифицированного хронического эндометрита как фонового процесса неатипической железистой гиперплазии в 38 % случаев, что позволило систематизировать выборку на две принципиальные группы: CD138<sup>+</sup> неатипическая железистая ГЭ (n=19) и CD138<sup>-</sup> неатипическая железистая ГЭ (n=31) (табл. 6).

Таблица 6. Количественные показатели экспрессии CD138+ плазматических клеток у пациенток с неатипической железистой гиперплазией

Иммуногистохимический маркер	CD 138+ ГЭ (n=19), абс	CD 138- ГЭ (n=31), абс
CD138	7,05±0,02	0*

*Примечания:* \*  $p < 0,05$  достоверность межгрупповых различий показателей по критерию Стьюдента, абс – измерение в абсолютных числах путем подсчета количества клеток, ГЭ – гиперплазия эндометрия.

Плазматические клетки демонстрируют яркую мембранную экспрессию и располагаются среди клеток стромы в произвольных участках, без тенденции к перигландулярной и/или периваскулярной локализации (рис. 10). Единственной особенностью является практически 100 % обнаружение плазмоцитов в строме железисто-фиброзных полипов, с тенденцией к обнаружению их ближе к фиброзно-сосудистому основанию.

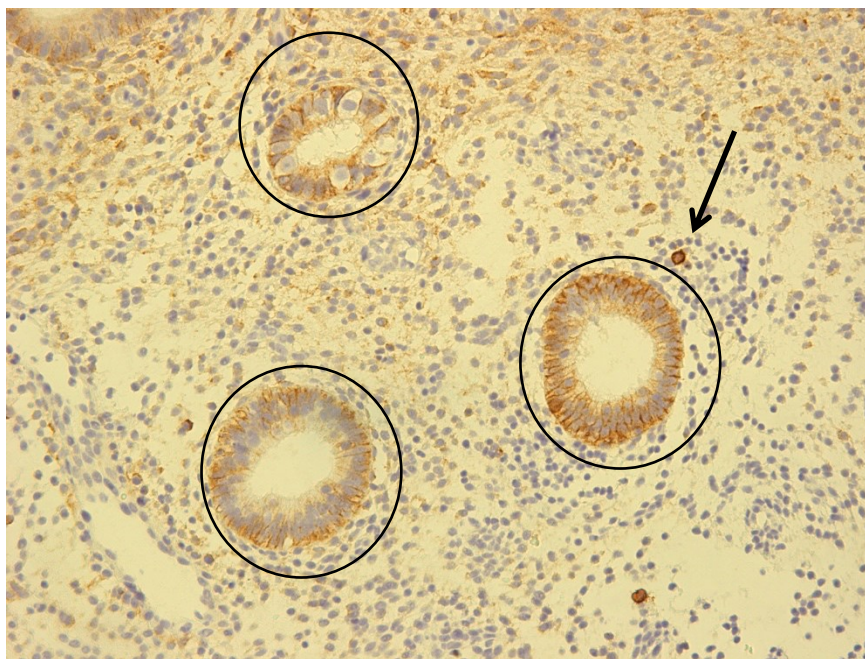


Рисунок 10. Соскоб полости матки. ИГХ с маркером CD 138. Объектив 40х. CD 138<sup>+</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Позитивная мембранная реакция в плазмоцитах стромы эндометрия (стрелки) и эпителии желез (внутренний позитивный контроль, круг).

Как видно, 62 % соскобов полости матки (СПМ) как гистологически, так и иммуногистохимически характеризуются отсутствием признаков пролонгированного воспалительного процесса и структурного ремоделирования стромы в виде значимых участков фиброза. Однако следует отметить, что одной из особенностей ИГХ реакций с маркером CD 138 является наличие очагов цитоплазматической экспрессии в клетках фибробластического ряда. Данный факт является показателем активности синдекана 1 – трансмембранного белка, связывающегося с молекулами гепарансульфата и хондроитинсульфата, что свидетельствует о значимых реактивных изменениях соединительной ткани, проиллюстрировано на рис. 11 и более подробно интерпретировано в главе 4.

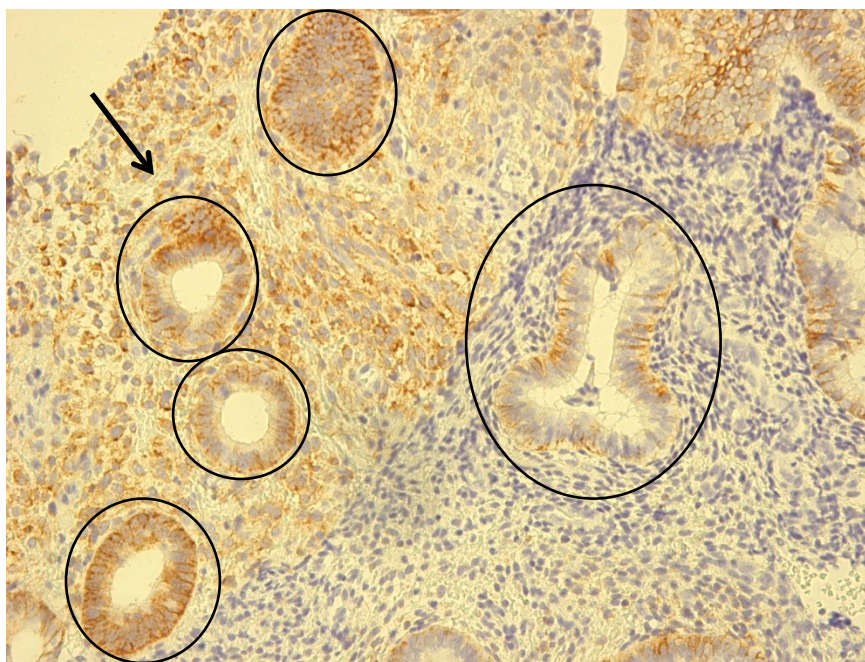


Рисунок 11. Соскоб полости матки. ИГХ с маркером CD 138. Объектив 40х. CD138<sup>+</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Позитивная цитоплазматическая реакция (стрелка) в строме и эпителии желез (внутренний позитивный контроль, круги).

Показатели адаптивного иммунитета в материале СПМ пациенток с CD 138<sup>+</sup> неатипической железистой ГЭ также продемонстрировали гетерогенность и статистическую значимость между пациентками как внутри этой группы, так и по отношению к показателям CD 138<sup>-</sup> неатипической железистой ГЭ, на основании

этой гетерогенности они разделены на первую и вторую подгруппы (табл. 7). Наиболее очевидны отличия по соотношению CD 4/CD 8 – иммунорегуляторному индексу.

Таблица 7. Количественные показатели экспрессии маркеров клеточного и гуморального иммунитета у пациенток с неатипической железистой гиперплазией

ИГХ маркер	Подгруппа 1 CD138 <sup>+</sup> ГЭ (n=10), абс	Подгруппа 2 CD138 <sup>+</sup> ГЭ (n=9), абс	CD138 <sup>-</sup> ГЭ (n=31), абс
CD 138	8,21±0,03#	3,56±0,01*#	0
CD 4	57,34±3,01#	14,02±1,01*#	7,11±0,21
CD 8	28,61±3,51#	35,87±4,12*#	8,02±0,59
CD 4/CD 8	2,00±0,04#	0,39±0,01*#	0,89±0,02
CD 20	23,02±1,01#	59,85±0,87#	2,31±0,01
CD 56	10,02±0,78#	42,23±1,02*#	9,28±1,11

*Примечания:* \* -  $p < 0,05$  достоверность различий показателей между подгруппой 1 и подгруппой 2; # – достоверность различий показателей между CD 138<sup>+</sup>ГЭ и CD 138<sup>-</sup>ГЭ, на основании t-критерия; абс – измерение в абсолютных числах путем подсчета количества клеток.

Согласно полученным результатам у пациенток *группы CD 138<sup>-</sup> неатипической железистой гиперплазии* определяется равномерное распределение популяций клеточного и гуморального иммунитета, соответствующее в среднем показателям нормы для пролиферативной фазы менструального цикла. Так, CD 4<sup>+</sup> Т-лимфоциты хелперы, цитотоксические CD 8<sup>+</sup> Т-лимфоциты диффузно рассредоточены в строме эндометрия и демонстрируют позитивную мембранную реакцию (рис. 12). Соотношение CD 4/CD 8 – иммунорегуляторный индекс (табл. 7), который свидетельствует о количественном паритете данных клеточных популяций и соответственно о готовности локального иммунитета к адаптивной иммунной реакции в зависимости от инициирующего травматического воздействия. Показатели количества В-лимфоцитов и CD 56<sup>+</sup> НК-клеток также находятся в пределах статистической нормы для эндометрия, демонстрируя позитивную мембранную реакцию в CD 20<sup>+</sup> клетках, расположенных ближе к нижним отделам

функционального слоя и с преимущественной периваскулярной локализацией CD56<sup>+</sup> клеток (рис. 13).

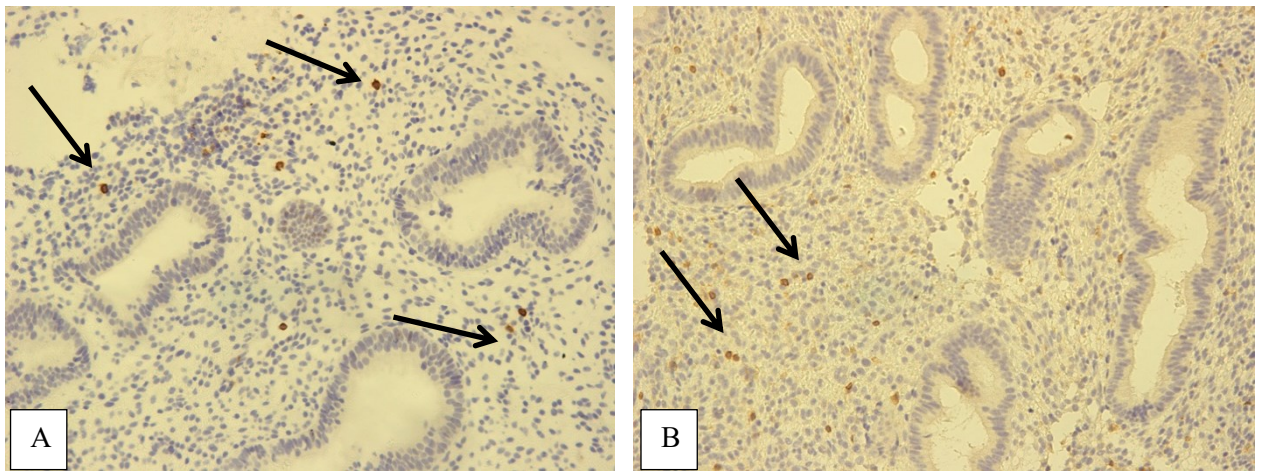


Рисунок 12. Соскоб полости матки. Объектив 20х. CD 138<sup>-</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. А – ИГХ реакция с CD 4: позитивная мембранная реакция в Т-лимфоцитах хелперах в строме эндометрия (стрелки). В – ИГХ реакция с CD 8: позитивная мембранная реакция в Т-цитотоксических лимфоцитах в строме эндометрия (стрелки).

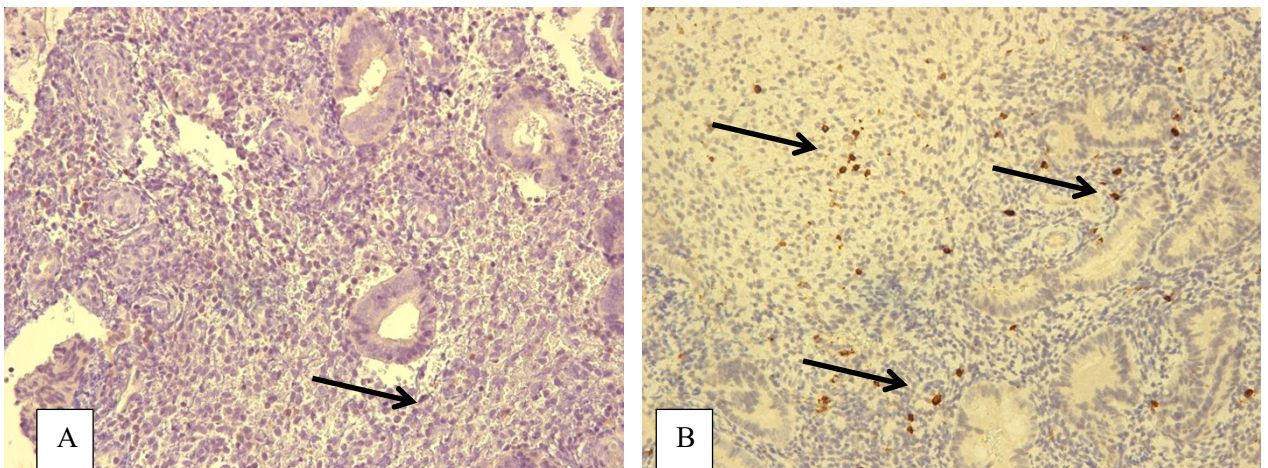


Рисунок 13. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. CD 138<sup>-</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. А – ИГХ реакция с CD 20: позитивная мембранная реакция в единичных В-лимфоцитах в строме эндометрия (стрелка). В – ИГХ с CD 56: позитивная мембранная реакция в НК-клетках в строме эндометрия (стрелки).

Интересными представляются результаты ИГХ исследования рецепторной активности эстрогена и прогестерона в группе пациенток с CD 138<sup>-</sup> неатипической железистой гиперплазией, которые демонстрируют неоднородность полученных результатов. Так в большинстве случаев (n=27) определяется выраженная позитивная ядерная реакция с маркером ER и PrR как в эпителии желез (по шкале Allred score 5+3=8), так и в клетках стромы (Allred score 5+3=8), что свидетельствует о сохранной рецепторнике эндометрия (рис. 14).

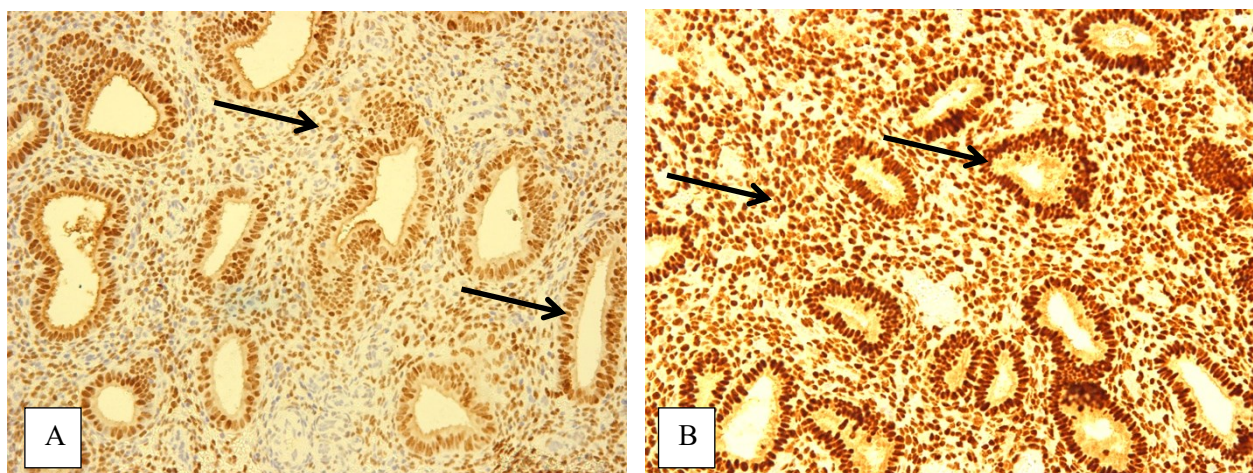


Рисунок 14. Соскоб полости матки. Объектив 20х. CD 138<sup>-</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. А – ИГХ реакция с ER: позитивная ядерная реакция в эпителии желез (Allred score 5+3=8) и клетках стромы (Allred score 5+3=8) (стрелки). В – ИГХ реакция с PrR: позитивная ядерная реакция в эпителии желез (Allred score 5+3=8) и клетках стромы (Allred score 5+3=8) (стрелки).

При этом у 4 пациенток данной группы определяется снижение рецепторной активности ER в эпителии желез с соотношением рецепторов эстрогена и прогестерона 1:2. Важно подчеркнуть, что стромальные клетки демонстрируют стабильно высокие показатели ядерной экспрессии ER и PrR высокой интенсивности реакции независимо от выраженности реакций в эпителиальном компоненте (рис. 15). Данный факт свидетельствует об истощении рецепторного аппарата со снижением эстрогеновых рецепторов. Однако, детально проанализировав ИГХ реакции маркеров иммунных клеток у этих пациенток, мы

отметили, незначительное превышение показателей CD 4 и CD 8 со сдвигом иммунорегуляторного индекса в сторону преобладания цитотоксических лимфоцитов, активацию CD 20<sup>+</sup> В-лимфоцитов с увеличением их числа до 6-7 в одном срезе при увеличении x20, а так же интенсификацию CD 56<sup>+</sup> NK-клеток с распределением их более диффузно в строме эндометрия.

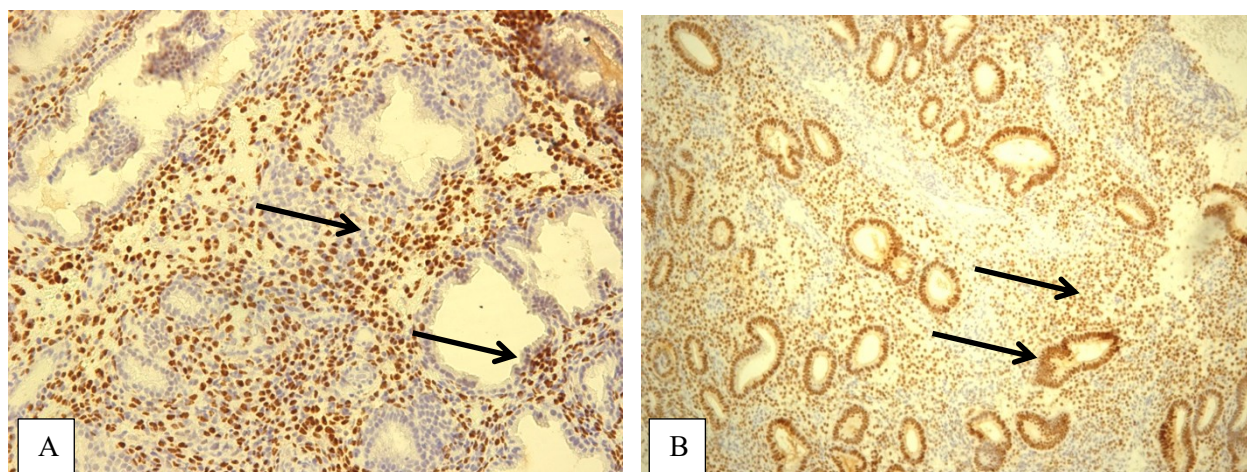


Рисунок 15. Соскоб полости матки. Объектив 20х. CD 138<sup>-</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. А – ИГХ реакция с ER: слабо позитивная ядерная реакция в эпителии желез (Allred score 1+1=2) и клетках стромы (Allred score 5+3=8). В – ИГХ реакция с PrR: позитивная ядерная реакция в эпителии желез (Allred score 5+3=8) и клетках стромы (Allred score 5+3=8) (стрелки).

Описанные характеристики клеточных компонентов адаптивного иммунитета, в комплексе с данными об истощении рецепторов эстрогена, могут являться показателями неполной морфологической картины хронического эндометрита, нуждающейся в детализации этиологических факторов риска его возникновения.

Анализ ИГХ реакций с маркерами адаптивного иммунитета и рецепторной активности эндометрия у пациенток с верифицированной CD 138<sup>+</sup> неатипической железистой гиперплазией свидетельствует о неоднородности полученных результатов количественных характеристик популяций лимфоидных клеток и иммунорегуляторного индекса, что позволило выделить 2 подгруппы пациенток с

хроническим эндометритом на фоне железистой ГЭ без атипии: подгруппа 1 с провоспалительным иммунным ответом (n=10) и подгруппа 2 с противовоспалительным иммунным ответом (n=9), о чем ранее упоминалось при описании таблицы 7.

Во всех исследованных соскобах полости матки пациенток подгруппы 1 на светооптическом уровне определяется превалирование экссудативно-альтеративных процессов в строме эндометрия, что проявляется в неравномерно выраженном отеке, диффузно выраженной мононуклеарной инфильтрации, слабыми или очаговыми явлениями склерозирования стромы. Количество плазматических клеток варьирует от 5-6 до 15-16 в поле зрения при увеличении x20 (рис. 16).

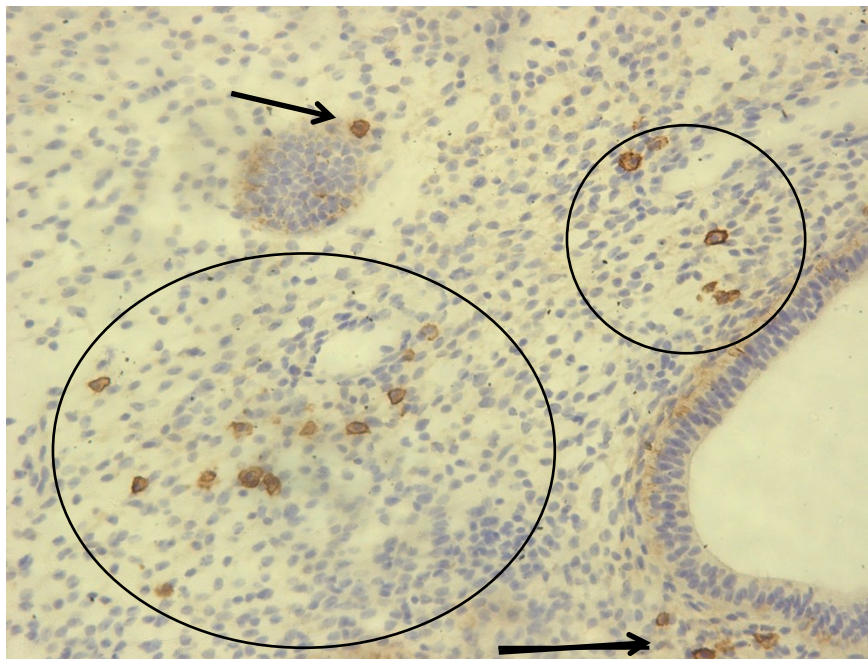


Рисунок 16. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 40х. Подгруппа 1 CD 138<sup>+</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия. Позитивная мембранная реакция с маркером CD 138 в плазматических клетках (стрелки и круги).

CD 138<sup>+</sup> клетки располагаются как диффузно, так и в виде очаговых скоплений, равномерно распределяясь по функциональному слою эндометрия.

Т-лимфоциты хелперы являются преобладающей лимфоидной клеточной популяцией, значимо преобладая над цитотоксическими лимфоцитами, НК клетками и В-лимфоцитами в строме. При микроскопическом исследовании определяется наличие  $CD 4^+$  клеток, как в функциональном, так и в участках базального слоя (рис. 17).

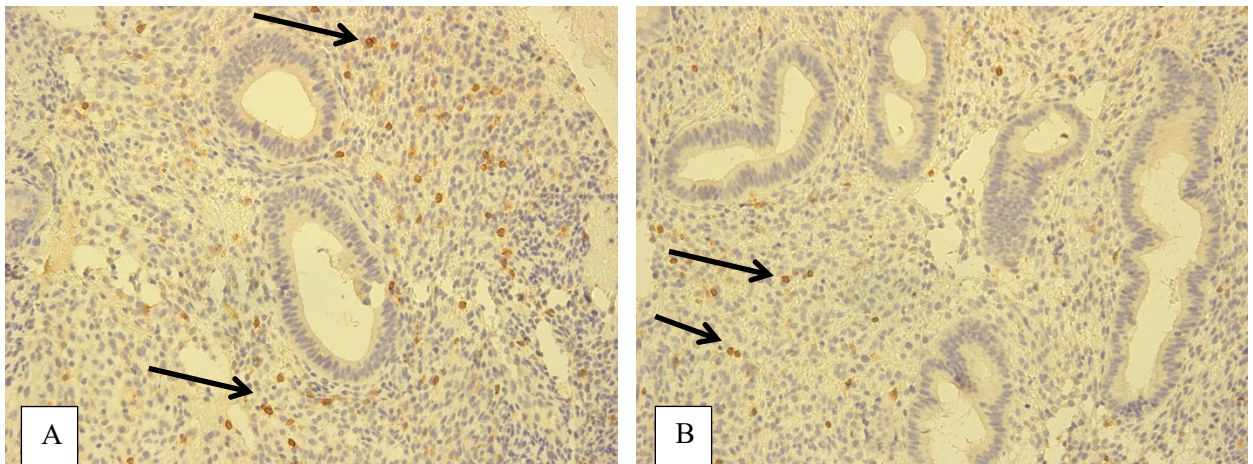


Рисунок 17. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. Подгруппа 1 ( $CD138^+$  неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). А – Диффузно рассеянная инфильтрация стромы  $CD4^+$  Т-лимфоцитами хелперами с позитивной мембранной реакцией (стрелки). В – Диффузно рассеянная инфильтрация стромы  $CD 8^+$  Т цитотоксическими лимфоцитами с позитивной мембранной реакцией (стрелки).

Интересным представляется расположение Т-лимфоцитов хелперов и цитотоксических лимфоцитов в очагах формирования лимфоидных агрегатов. При оценке ИГХ реакций в этих участках фиксируется тенденция к периферическому расположению указанных клеток, с формированием псевдомантийной зоны.

Причем  $CD 4^+$  клетки выстраиваются в виде демаркационного вала по периферии герминативного центра, а  $CD 8^+$  клетки инфильтрируют его единичными клетками (рис. 18).

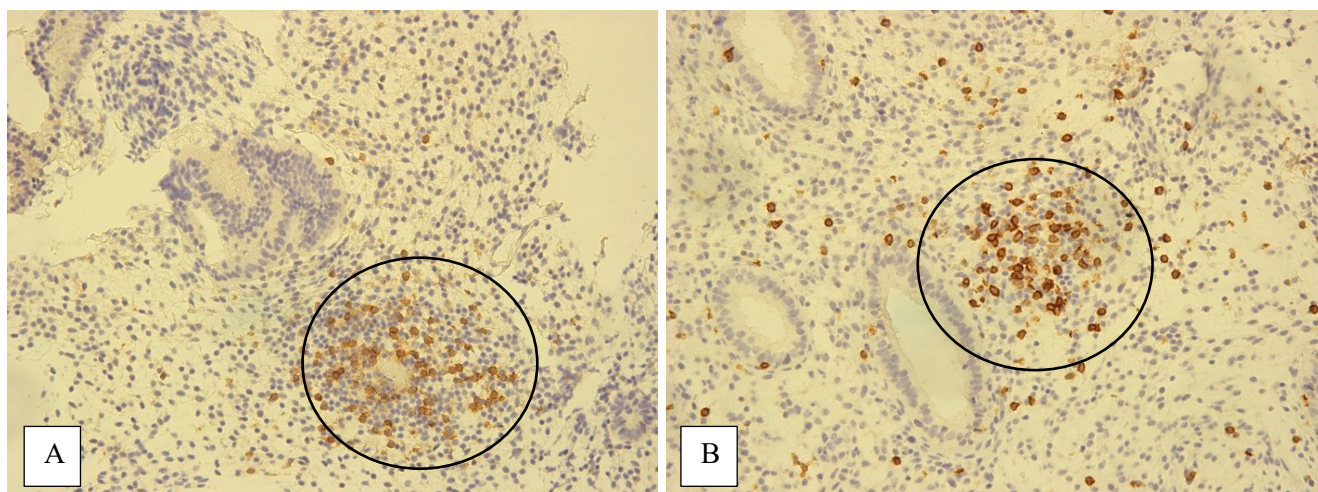


Рисунок 18. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. Подгруппа 1 ( $CD\ 138^+$  неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). Лимфоидные скопления в строме эндометрия (круг). А –  $CD\ 4^+$  Т-лимфоциты хелперы с позитивной мембранной реакцией. В –  $CD\ 8^+$  Т-цитотоксические лимфоциты с позитивной мембранной реакцией.

Количественным выражением соотношения клеточных популяций Т-лимфоцитов является сдвиг иммунорегуляторного индекса  $CD\ 4/CD\ 8$  до  $2,00 \pm 0,04$  в сторону значимого преобладания Т-лимфоцитов хелперов. По-нашему мнению такие локализационные особенности, а также числовые показатели свидетельствуют о векторной клональной пролиферации Т-лимфоцитов хелперов, необходимых для реализации противоинфекционного иммунного ответа, направленного на уничтожение и элиминацию бактериальных и вирусных агентов. Данное предположение подтверждается и активацией клеточных компонентов гуморального иммунитета с демонстрацией интенсификации В-лимфоцитов как в зонах лимфоидных скоплений, так и в виде диффузно рассеянной в строме клеточной популяции (рис. 19).

НК-клетки визуализируются в пределах диагностически значимых показателей нормы либо количество их незначительно увеличено. Такие клетки с позитивной мембранной реакцией распределяются в виде очаговых скоплений вокруг пучков сосудов, а в части случаев вокруг базальных мембран железистых структур эндометрия. Это указывает на минимальную вовлеченность механизма

естественного цитолиза клеток-мишеней с внутриклеточным персистированием инфекционных агентов, вероятно вирусной этиологии в случаях интенсификации популяции, либо аутоиммунизации воспалительного процесса (рис. 20).

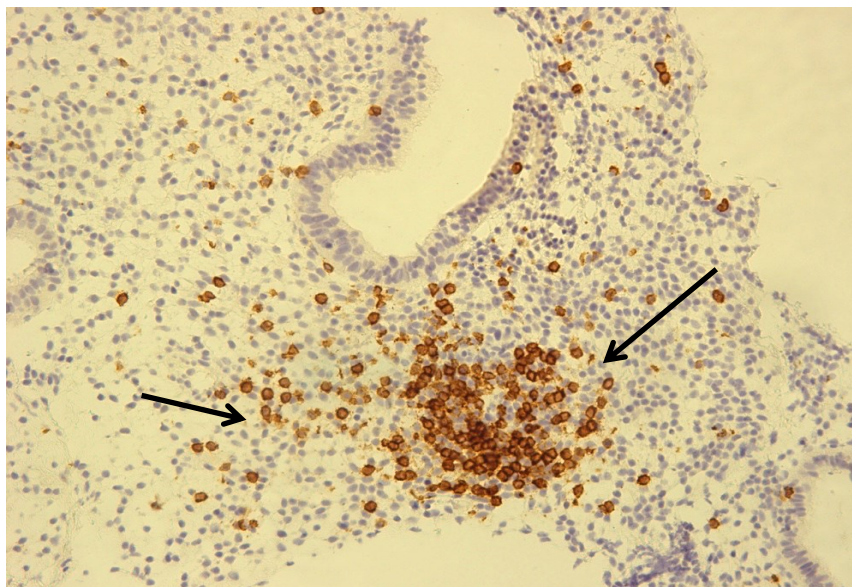


Рисунок 19. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 40х. Подгруппа 1 (CD 138<sup>+</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). CD 20<sup>+</sup> В-лимфоциты с позитивной мембранной реакцией в лимфоидном агрегате и перигландулярной строме (стрелки).

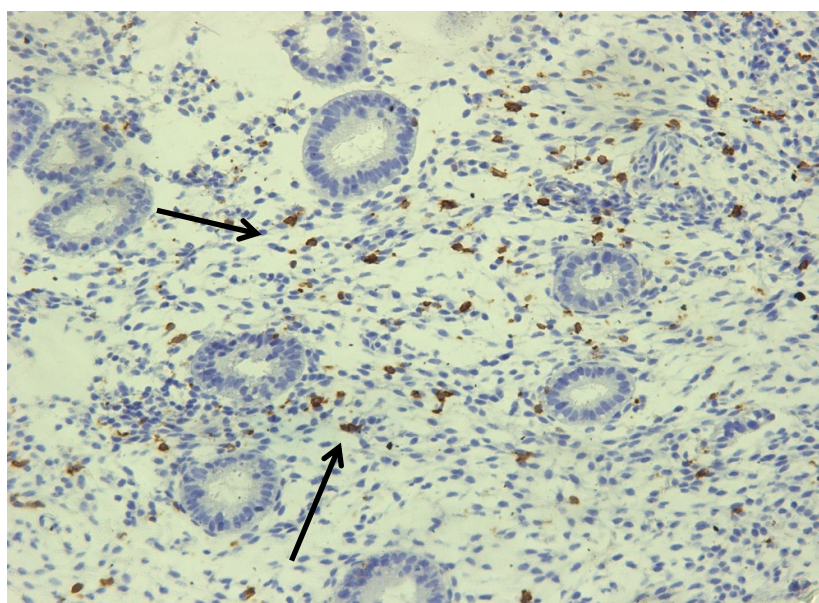


Рисунок 20. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 40х. Подгруппа 1 (CD 138<sup>+</sup> неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). CD 56<sup>+</sup> НК-клетки с позитивной мембранной реакцией в функциональном слое (стрелки).

В подгруппе 2 наблюдается инверсия иммунорегуляторного индекса относительно подгруппы 1 с абсолютным превалированием цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток (рис. 21). Соскобы полости матки пациенток подгруппы 2 CD 138<sup>+</sup> неатипической железистой гиперплазией характеризуются также значимыми количественными сдвигами клеточных популяций в строме эндометрия. CD 8<sup>+</sup> клетки регистрируются, как в виде диффузно рассеянной клеточной популяции с позитивной мембранной ИГХ реакцией, так и в виде очаговых скоплений, с локализацией, как в центральной герминативной зоне агрегата, так и по периферии, формируя псевдомантийную зону (рис. 22).

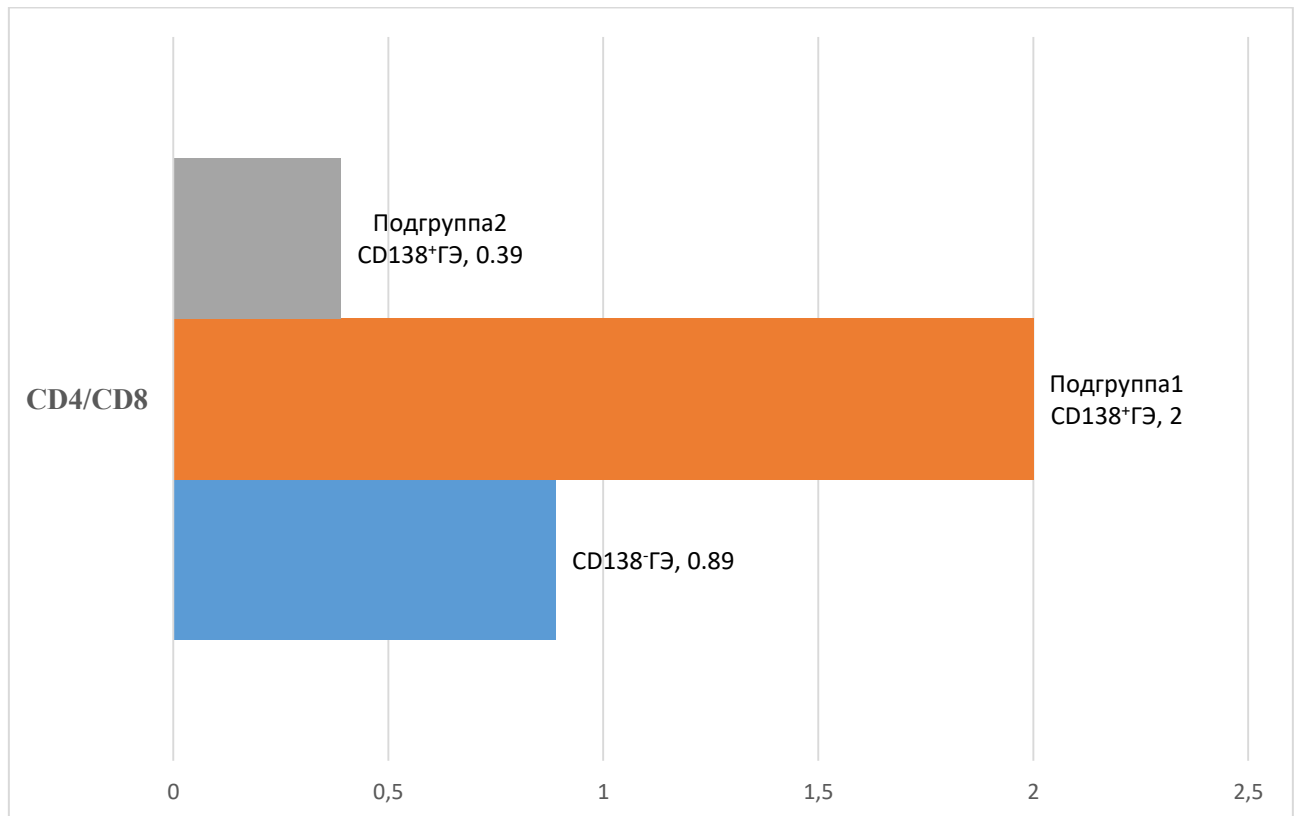


Рисунок 21. Показатели иммунорегуляторного индекса CD 4/CD 8 (единиц) у пациенток с неатипической железистой гиперплазией с/без фонового хронического эндометрита.

Такая поляризация иммунных клеток является демонстрацией доминирования цитотоксических реакций, направленных либо на ликвидацию клеток с внутриклеточным персистированием инфекционного агента, либо на

собственные клетки организма при их трансформации. Локальная гиперэргия цитотоксических лимфоцитов может приводить к развитию аутореактивности. И в том, и в другом случае побочным эффектом может быть эффект аутоиммунизации, когда эффекторный Т-лимфоцит киллер воспринимает клетки организма в качестве клетки-мишени, инициируя в них активацию апоптоза, либо лизирование путем прямого межклеточного взаимодействия и высвобождения цитолитических ферментов гразнзима и перфорина.

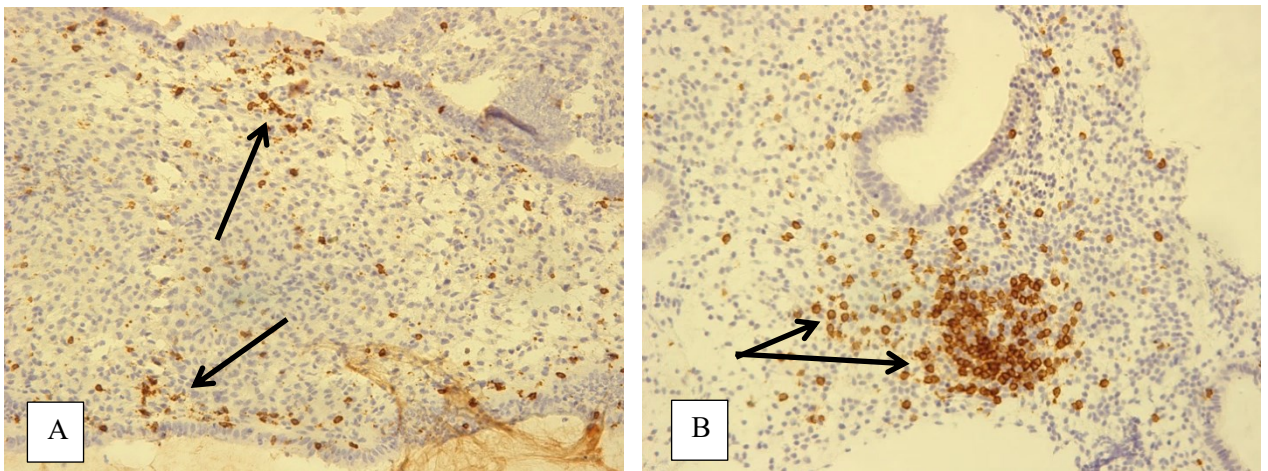


Рисунок 22. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. Подгруппа 2 ( $CD\ 138^+$  неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). А –  $CD8^+$  Т-цитотоксические лимфоциты в строме (стрелки). В –  $CD8^+$  Т-цитотоксические лимфоциты диффузно расположенные и в лимфоидном агрегате (стрелки).

Во фрагментах эндометрия, полученных у пациенток подгруппы 2, на светооптическом уровне определяется превалирование пролиферативных процессов над альтеративными, с визуально более выраженным ремоделированием стромального компонента за счет пролиферации фибробластического дифферона, что по-нашему мнению, может свидетельствовать в пользу пролонгации воспалительного процесса и, в частности, аутоиммунизации стромы. Данный факт подтверждается и ИГХ реакцией с маркером В-лимфоцитов  $CD\ 20$  (рис. 23 А), и натуральных киллеров  $CD\ 56$  (рис. 23 В).

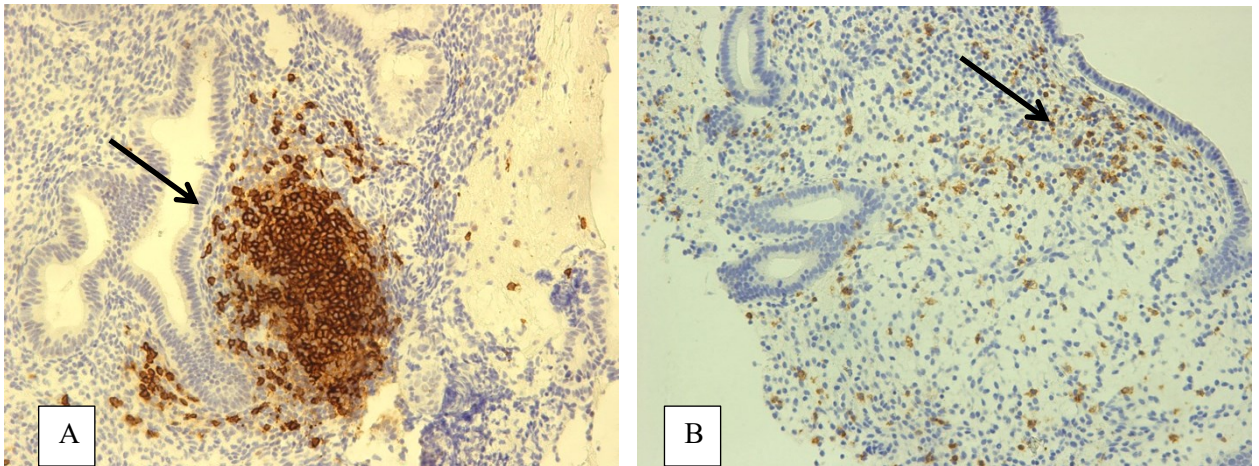


Рисунок 23. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. Подгруппа 2 ( $CD138^+$  неатипическая железистая гиперплазия эндометрия).  $CD 20^+$  В-лимфоциты в лимфоидном агрегате (А) и  $CD 56^+$  НК-клетки в строме эндометрия (В) (стрелки).

Рецепторная активность эндометрия не демонстрирует значимой вариативности между подгруппами с наличием хронического эндометрита или без него на фоне неатипической железистой гиперплазии и, в большинстве случаев, свидетельствует о сохранной рецептнике, как эстрогена, так и прогестерона (рис. 24).

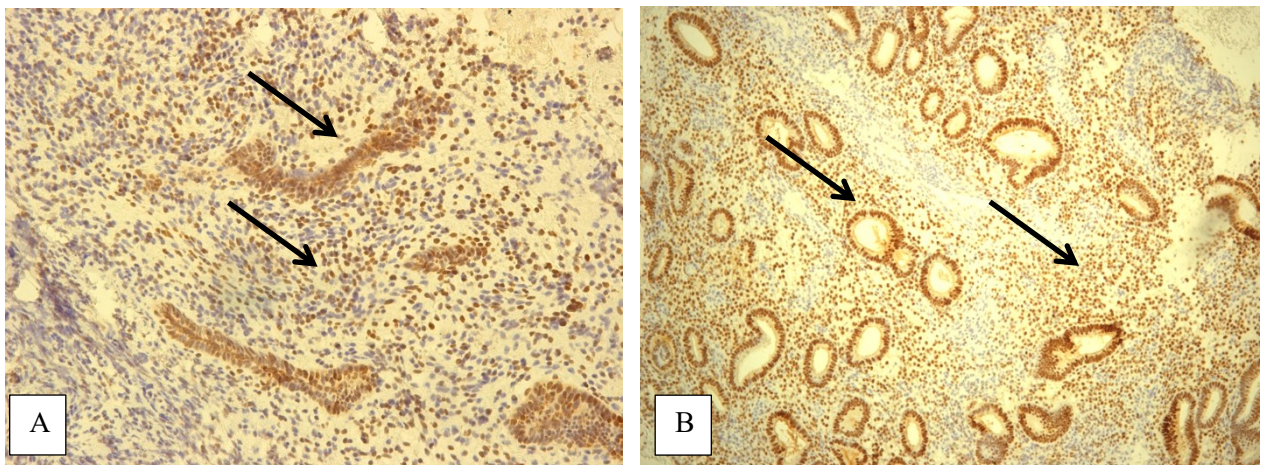


Рисунок 24. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. Подгруппа 2 ( $CD138^+$  неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). А – положительная ядерная реакция с ER в строме эндометрия (Allred score 4+3=7) и эпителии желез (Allred score 5+3=8). В – положительная ядерная реакция с PrR в строме эндометрия (Allred score 4+3=7) и эпителии желез (Allred score 5+3=8) (стрелки).

При этом нужно отметить, что при сопоставлении показателей соотношения рецепторов эстрогена к прогестерону и фазы менструального цикла, в ряде случаев ( $n=3$ ) отмечается тенденция к снижению количества рецепторов эстрогена по отношению к прогестерону, составляя 1:1, при норме от 2:1 до 4:1 для пролиферативной фазы менструального цикла и от 1:2 до 1:4 – для секреторной.

У 6 пациенток данной группы зафиксировано абсолютное снижение количества рецепторов эстрогена с разницей по локализации истощения рецепторов: в железистом или стромальном компонентах (рис. 25). При этом количество рецепторов прогестерона остается высоким, с интенсивностью окраски Allred score  $5+3=8$  как в железах, так и в клетках стромы.

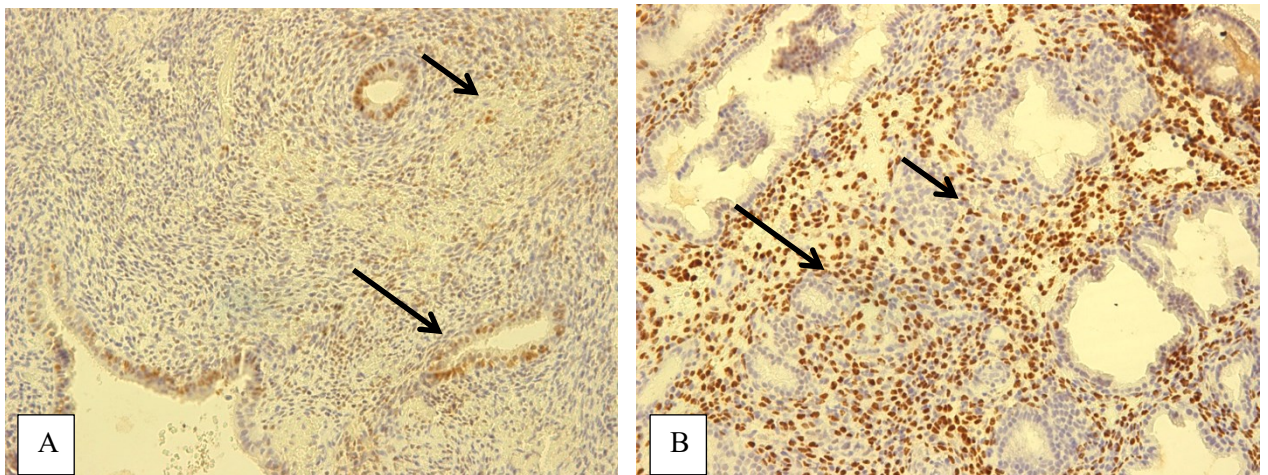


Рисунок 25. Соскоб полости матки. ИГХ. Объектив 20х. Подгруппа 2 ( $CD138^+$  неатипическая железистая гиперплазия эндометрия). А – позитивная ядерная реакция в эпителии желез (Allred score  $5+2=7$ ) и клетках стромы (Allred score  $3+1=4$ ). В – позитивная ядерная реакция в эпителии желез (Allred score  $2+1=3$ ) и клетках стромы (Allred score  $5+3=8$ ) (стрелки).

### **4.3. Диагностический алгоритм выявления и коррекции слабоактивного воспаления при неатипической железистой гиперплазии эндометрия**

Как правило, манифестацией ГЭ является аномальное маточное кровотечение, которое является поводом обращения пациентки к гинекологу. Обращение пациентки к врачу первичного звена медицинской помощи сопровождается УЗИ-диагностикой и лечебно-диагностическим фракционным выскабливанием полости матки. С диагностической точки зрения его цель состоит в морфологической верификации диагноза ГЭ, исключения ЭИН и ЭК.

Параллельно не менее важным является обследование на количественное содержание гормонов в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа для определения функции ритмичного стероидогенеза овариальной железы (в репродуктивном возрасте), щитовидной железы и передней доли аденогипофиза, поскольку от взаимосвязи гормонов данных желез зависит гормональный регуляторный коктейль и структура органов-мишеней гормонов яичника, к которым относится матка и эндометрий, в частности. Скрининг на инфекционные заболевания, передающиеся половым путем, позволяет выявить инфекционный агент хронического воспалительного процесса. Индекс массы тела и оценка углеводного обмена могут иметь вспомогательное значение при диагностике метаболического синдрома, ожирения и инсулинорезистентности любой этиологии.

После гистологической оценки эндометрия по показаниям назначается ИГХ с панелью маркеров для выявления гистофизиологического иммунного и гормонально-рецепторного дисбаланса. На основании анализа уровня экспрессии маркеров, полученных при ИГХ молекулярной диагностике, врач делает заключение о патогенетических сдвигах в ее развитии. Это дает направление детализации клинико-anamнестических данных и дополнительных исследований. В последующем такой алгоритм позволяет подобрать этиотропную, гормональную и патогенетическую терапию для каждой пациентки (рис. 26).

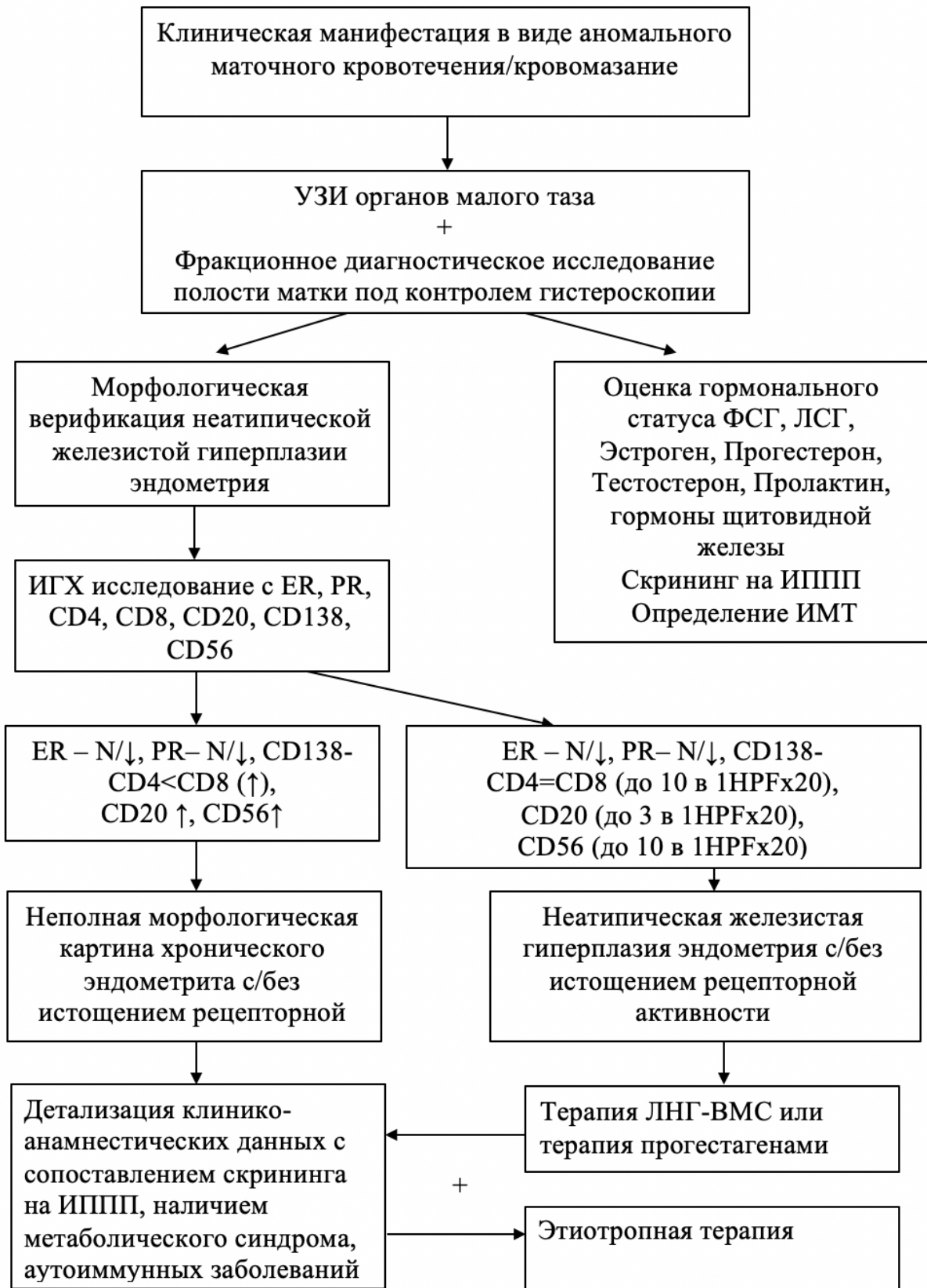


Рисунок 26. Алгоритм диагностики и лечения неполной морфологической картины хронического эндометрита на фоне неатипической железистой гиперплазии

Эта схема персонифицированного ведения женщин с верифицированной ГЭ должна быть расширена в случае наследственного риска злокачественных новообразований и ряда других патологических состояний.

Предложенный нами алгоритм создан по запросу клиницистов в процессе длительной совместной работы, он отражает персонифицированный пациентоориентированный мультидисциплинарный подход, оптимальный с точки зрения современной медицины. И также важно, что он легко реализуем в медицинских учреждениях поликлинического звена, доступен и понятен, а также патогенетически и морфологически обоснован.

## ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью начального этапа эксперимента *было верифицировать развитие ГЭ на созданной модели* избытка эстрогенов у белых крыс и изучить методом ИГХ экспрессию и локализацию маркеров клеточного цикла, ангиогенеза и воспаления в гиперплазированном эндометрии.

Модель успешно верифицирована. При корреляционном анализе по методу Спирмана выявлена положительная связь между экспрессией рецепторов эстрогена и пролиферативной активностью эпителиальных клеток желез рога матки. Также выявлена сильная положительная корреляция между количеством CD 4<sup>+</sup>, CD 8<sup>+</sup> и CD 138<sup>+</sup> лимфоцитов в строме рогов и тела матки внутри групп. Это указывает на комплексные взаимосвязанные эффекты ГЭ.

Отмечена специфика динамики маркеров в зонах тела и рога матки экспериментальных животных. Общей тенденцией изменений в обоих отделах является активация маркеров апоптоза. При этом количество рецепторов эстрогенов в роге при ГЭ снижается, что может быть связано с компенсаторным ингибированием экспрессии рецепторов избытком экзогенного эстрогена. Кроме того, и в теле, и в роге матки отмечено снижение Т и В-лимфоцитов. По-видимому, от уровня эстрогеновых рецепторов может зависеть активность процессов пролиферации. Так в роге матки активность маркера Ki-67 имеет тенденцию к снижению, а в теле матки к некоторому увеличению.

При проведении клинических исследований ранее было показано, что на фоне гиперэстрогении хроническое воспаление постепенно становится лидирующим патогенетическим фактором [29, 30].

В экспериментальных исследованиях на животных моделирование гиперэстрогении проявлялось в большей степени морфологической трансформацией тканей эндометрия, обусловленное изменением баланса процессов пролиферации и апоптоза. Причем мы не обнаружили увеличения лимфоцитарных маркеров в тканях гиперплазированного эндометрия у крыс, что

может быть следствием недостаточного временного фактора в формировании гиперплазии, или свидетельствовать о малой активности лимфоцитарных механизмов в возможном формировании воспалительных изменений. При этом НПВС (мелоксикам) в условиях отсутствия признаков воспаления эндометрия в эксперименте при ГЭ оказывает эффект на эндометрий рога и тела матки, приводя гистофизиологические ИГХ показатели к значениям, близким к группе без ГЭ.

Описанные патологические закономерности ГЭ требуют дальнейшего изучения, однако все они созвучны теории Д. Ханахана и Р. Вайнберга *Hallmarks of Cancer* [77]. В проведенном исследовании при формировании экспериментальной ГЭ показана тенденция к активной пролиферации эндометрия и потери надзора ткани эндометрия со стороны иммунной системы. Данные изменения могут способствовать дальнейшим процессам прогрессирования гиперплазии и возможной малигнизации эндометрия с усилением ангиогенеза, формированием геномной нестабильности и фенотипической пластичности.

*При сравнении разных схем терапии ставили задачу провести комплексное иммуноморфологическое исследование при ГЭ, подобрав патогенетическую терапию и оценить ее эффективность.*

Важно отметить, что эпителий тела матки крысы по аналогии с шейкой матки женщины по сравнению с зонами вынашивания плода, не только является пролиферативно, метапластически и трансформационно более опасной зоной, но и более подвержен инфицированию вследствие контакта с внешней средой. Поэтому максимальный патогенетический эффект мелоксикама в этой зоне представляет терапевтический интерес как противовоспалительного препарата, опосредованно (через простагландины и цитокины) снижающего чувствительность клеток к избытку эстрогенов. А динамика лимфоцитов различных популяций в эндометрии не противоречит базовым понятиям патофизиологии воспаления, поскольку мы работаем с моделью не воспаления, а гиперплазии и эндокринной дисрегуляции, где изменения воспалительных маркеров носят характер вторичных, а ингибиторы циклооксигеназы 2 нормализуют гистофизиологию матки опосредованно. При этом присутствие

иммунокомпетентных клеток в умеренном количестве является базой иммунного гомеостаза, о чем свидетельствуют результаты измерений в тканях крыс контрольной группы. Описанные различными авторами общие патологические закономерности ГЭ требуют дальнейшего изучения, однако все они созвучны ключевым теориям, выделяющим ряд признаков трансформации клеток [77].

*Несмотря на успешность использованной нами модели ГЭ, мы усовершенствовали ее для будущих исследований, улучшив технику операции и сократив период введения эстрогенов в два раза. Применение такого способа для разработки различных терапевтических схем лечения ГЭ позволяет стандартизировать результаты исследований, элиминируя вариабельность жизненных показателей животных, связанных с эстральными циклами и хроническим воспалением. Предложенная техника операции позволяет выполнять повторные оперативные вмешательства на одной и той же особи, не выводя животное из эксперимента, после минимальной адаптации техники под конкретные исследовательские задачи. Это может быть необходимо для взятия ткани на морфологическое исследование или в связи с другими потребностями дизайна экспериментальной работы (с учетом того, что яичник и рог матки – это парные анатомические образования).*

Завершив таким образом фундаментальную часть работы, практическим выходом которой стала разработка способа создания модели ГЭ, а ключевым фундаментальным результатом – гистофизиологический антипролиферативный эффект НПВС, требующий дальнейших клинических исследований, мы приступили к морфологическим и молекулярно-биологическим исследованиям эндометрия женщин.

Аномальные маточные кровотечения в репродуктивных циклах и постменопаузальном периоде являются главным признаком патологии эндометрия и, в связи с актуальным поиском атипии или рака, требуют морфологической оценки ткани [127]. Важно отметить, что это позволяет в подавляющем большинстве случаев исключить явления начала или реализации трансформации нормальных эпителиальных клеток в опухолевые, происходящие

вследствие избытка эстрогенов на фоне мутационной нагрузки [128]. При исключении атипии и рака, у женщин репродуктивного возраста, становятся наиболее привлекательными нехирургические методы лечения, особенно в случаях стремления к сохранению фертильности [34].

*В клинической части работы* на первом этапе мы провели обзорное патогистологическое исследование, чтоб продемонстрировать морфологические признаки железистой гиперплазии эндометрия в рутинной диагностике в клинике. На данном этапе мы сконцентрировались на простой ГЭ без признаков атипии, как значительно наиболее распространенной. Обзорные окраски выявили инфильтрацию ткани эндометрия, но не позволили установить достоверные и клинически значимые критерии хронического эндометрита, часто сопровождающего ГЭ и оценить частоту распространения хронического эндометрита в данной выборке пациенток и закономерности его структурных проявлений.

Иммуногистохимическая (ИГХ) оценка маркера CD 138 позволяет дополнить верификацию патоморфологических изменений путем визуализации ключевого показателя эндометрита клеток плазмочитов. Мы предполагаем, что в «панельный» подход комбинаций ИГХ биомаркеров, может быть более информативным, чем узконаправленная диагностика, однако в данной работе посчитали важным продемонстрировать особенности морфологических проявлений ГЭ в сочетании с эндометритом и без него.

Так, в условиях клинически значимой эстрогении на светооптическом уровне в эндометрии происходит симуляция персистирующей пролиферативной фолликулиновой фазы менструального цикла, что сопровождается пролонгацией пролиферации желез с повышением митотической активности эпителия, увеличением количества желез и уменьшением площади стромального компонента, приводя к формированию неатипической железистой ГЭ как патологического процесса (рис. 27).

При этом в нашем исследовании установлено наличие полиморфизма изменений стромы эндометрия, проявлявшееся как в виде закономерного

уменьшения количества стромальных элементов и сохранением общей цитогенности, так и в наличии очаговых или распространенных участков структурного ремоделирования стромы за счет фиброзной трансформации и превалирования воспалительной инфильтрации. Данный факт, по-нашему мнению может быть связан с наличием хронического эндометрита в качестве фонового патологического процесса у данной группы пациенток.



Рисунок 27. Схематическое изображение механизма развития неатипической железистой гиперплазии эндометрия.

Для подтверждения данной гипотезы нами было проведено ИГХ исследование для:

- 1) подтверждения/исключения хронического эндометрита – ИГХ реакция с маркером плазмоцитов CD 138 [34];
- 2) оценки локального клеточного и гуморального иммунитета в эндометрии – ИГХ с маркерами CD 4 – Т-лимфоциты хелперы, CD 8 – цитотоксические лимфоциты, CD 56 – NK-клетки, CD 20 – В-лимфоциты;

3) оценки рецепторного статуса эндометрия и чувствительности к овариальным гормонам (ER и PR) для уточнения степени функциональной активности.

Пациентки систематизированы на две группы в зависимости от результата постановки ИГХ с маркером CD 138 (плазматические клетки): CD 138<sup>+</sup> неатипическая железистая ГЭ (n=19) (наличие хронического эндометрита) и CD 138<sup>-</sup> неатипическая железистая ГЭ (n=31) (отсутствие хронического эндометрита).

Как видно, 62 % СПМ гистологически и иммуногистохимически характеризуются отсутствием признаков пролонгированного воспалительного процесса и структурного ремоделирования стромы в виде значимых участков фиброза. Однако если более подробно охарактеризовать такую особенность ИГХ реакций с маркером CD 138, как наличие очагов цитоплазматической экспрессии в клетках фибробластического ряда, с учетом данных литературных источников, то этот факт является показателем активности синдекана 1 – трансмембранного белка, связывающегося с молекулами гепарансульфата и хондроитинсульфата.

Основной ролью синдеканов, и, в частности, синдекана 1 в организме является контроль роста и дифференцировки клеток, а также поддержание клеточной адгезии и миграции клеток. Данные белки осуществляют регуляцию передачи сигналов клетки путем интеграции внешних сигналов от циркулирующих лигандов и внеклеточного матрикса с другими клеточными рецепторами, взаимодействуя с основными факторами роста фибробластов, факторами роста эндотелия сосудов, фактором роста гепатоцитов или трансформирующим фактором роста- $\alpha$  и белки внеклеточного матрикса, включая фибронектин и ламинин [129]. Цитоплазматическая экспрессия CD 138 клетками фибробластического ряда интерпретируется как повышенная реактивность соединительнотканной стромы. В нашем исследовании в материале СПМ пациенток с неатипической железистой гиперплазией с фоновым хроническим эндометритом, так и без него определяется наличие участков с полиповидной морфологией, сопровождавшейся интенсификацией данного типа ИГХ реакции.

Полученные нами в дальнейшей работе (при исследовании других маркеров воспалительных клеток и рецепторов половых гормонов) характеристики клеточных компонентов адаптивного иммунитета, в комплексе с данными об истощении рецепторов эстрогена, могут являться показателями неполной морфологической картины хронического эндометрита, нуждающейся в детализации этиологических факторов риска его возникновения. Например, клиничко-анамнестических данных (внутриматочная спираль в анамнезе, аутоиммунные процессы, антифосфолипидный синдром и т.д.) с целью последующей коррекции терапевтического воздействия и применения эти патогенетического лечения, направленного не только на нормализацию гормонального фона, но и на причины, способствующие структурной перестройке эндометрия, на фоне персистирующих воспалительных реакций.

Данная теория не противоречит гипотезе развития ГЭ и ЭИН, общепринятой в современной литературе (рис. 28), однако может быть принята за основу разработки тактического алгоритма ведения пациенток с ГЭ.

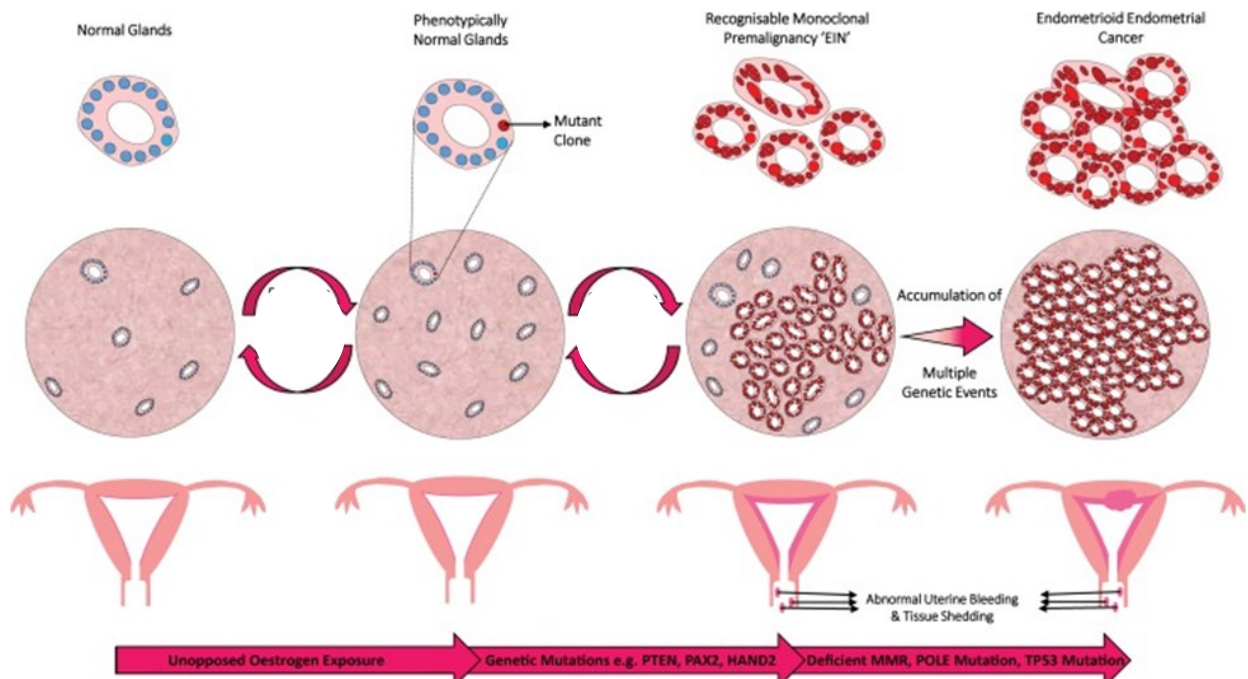


Рисунок 28. Механизм моноклонального развития ЭИН [9].

Согласно классической теории, эндометрий подвергается воздействию эстрогенов несколькими возможными путями (рис. 28). Эстрогены стимулируют пролиферацию эндометриальных желез. Этот процесс может быть обратимым, например, с терапией прогестином, действующим как супрессор или антагонист. У женщин групп риска в этой среде может развиваться мутантный клон. Мутантный клон встречается в фенотипически нормальных эндометриальных железах. Он отбирается и прогрессирует благодаря влиянию эстрогенов. Со временем, с накоплением дополнительных генетических повреждений, мутантный клон размножается, и повреждение ЭИН может быть диагностировано во время обычного гистологического исследования с окраской среза гематоксилином и эозином. Гуморальные модуляторы и модификаторы могут изменить баланс между прогрессированием ЭИН и инволюцией. У пациентки могут быть симптомы АМК и утолщенный эндометрий при УЗИ. При продолжающемся накоплении дальнейших генетических повреждений, ЭИН подвергается злокачественной трансформации в ЭК [130]. Представляет интерес роль иммунных клеток в этом процессе.

Итак, в нашем клиническом исследовании мы можем заключить, что воспаление как фон для ГЭ имеет важное патогенетическое значение в ее развитии и должно быть учтено в клинической работе. Оно может быть как инфекционным, так и аутоиммунным.

Важно подчеркнуть, что механизм аутоиммунизации может быть связан как с гиперэргической реакцией локального иммунитета, так и являться результатом системных аутоиммунных заболеваний, что актуализирует детализацию анамнестических данных и расширение клинико-диагностического поиска.

Пролонгация воспалительного процесса независимо от этиологического фактора приводит к структурному ремоделированию стенок сосудов, их склерозированию, нарушению сосудистой проницаемости и как следствие нарастанию тканевой гипоксии. Локальный дисбаланс оксигенации тканевых элементов приводит к инициации реполяризации макрофагов во 2 функциональный тип, индуцирующих компенсаторный неоангиогенез за счет

повышения концентрации сосудистого фактора роста-А, хемотаксису фибробластов и интенсификации коллагенообразования [130].

Разрастание соединительнотканых волокон способствует неравномерному распределению гиперплазированного железистого компонента, что приводит к формированию псевдополиповидных выростов с усиленной микроциркуляцией за счет вновь образованных сосудов. Пролонгация процесса усугубляет фиброзирование стромы полиповидных выростов и приводит к формированию железисто-фиброзных полипов эндометрия на фоне железистой гиперплазии (рис. 29).

Таким образом, в результате нашего исследования установлено, что у пациенток с неатипической железистой ГЭ необходимо исключение хронического эндометрита в качестве сочетанного патологического процесса, который может способствовать структурной перестройке стромального и железистого компонентов эндометрия, а также формированию полиповидной формы гиперплазии и/или полипов эндометрия.

Учитывая истощение рецепторного аппарата в результате пролонгированного воспалительного процесса в эндометрии рекомендована коррекция медикаментозного лечения, с учетом этиологических факторов. В связи с чем, всем пациенткам с клинико-морфологическими признаками гиперпластических процессов рекомендовано: 1) проведение ИГХ исследование с CD 138, CD 4, CD 8, CD 20, CD 56, ER, PrR на материале соскобов полости матки и/или биопсии эндометрия; 2) детализация клинико-анамнестических данных: внутриматочные контрацептивы, аборты, привычное невынашивание, инфекции половых путей, аутоиммунные и вирусные заболевания; 3) исключение патологии яичников (УЗИ, онкомаркеры); 4) скрининг инфекций половых путей методом ПЦР.

Так, учитывая значимость молекулярных процессов в развитии ГЭ, разработан алгоритм с использованием молекулярных диагностических инструментов или патогенетических терапевтических ресурсов, которые можно

использовать в практической медицине для более эффективной работы в диагностике, классификации подтипов и лечении ГЭ.

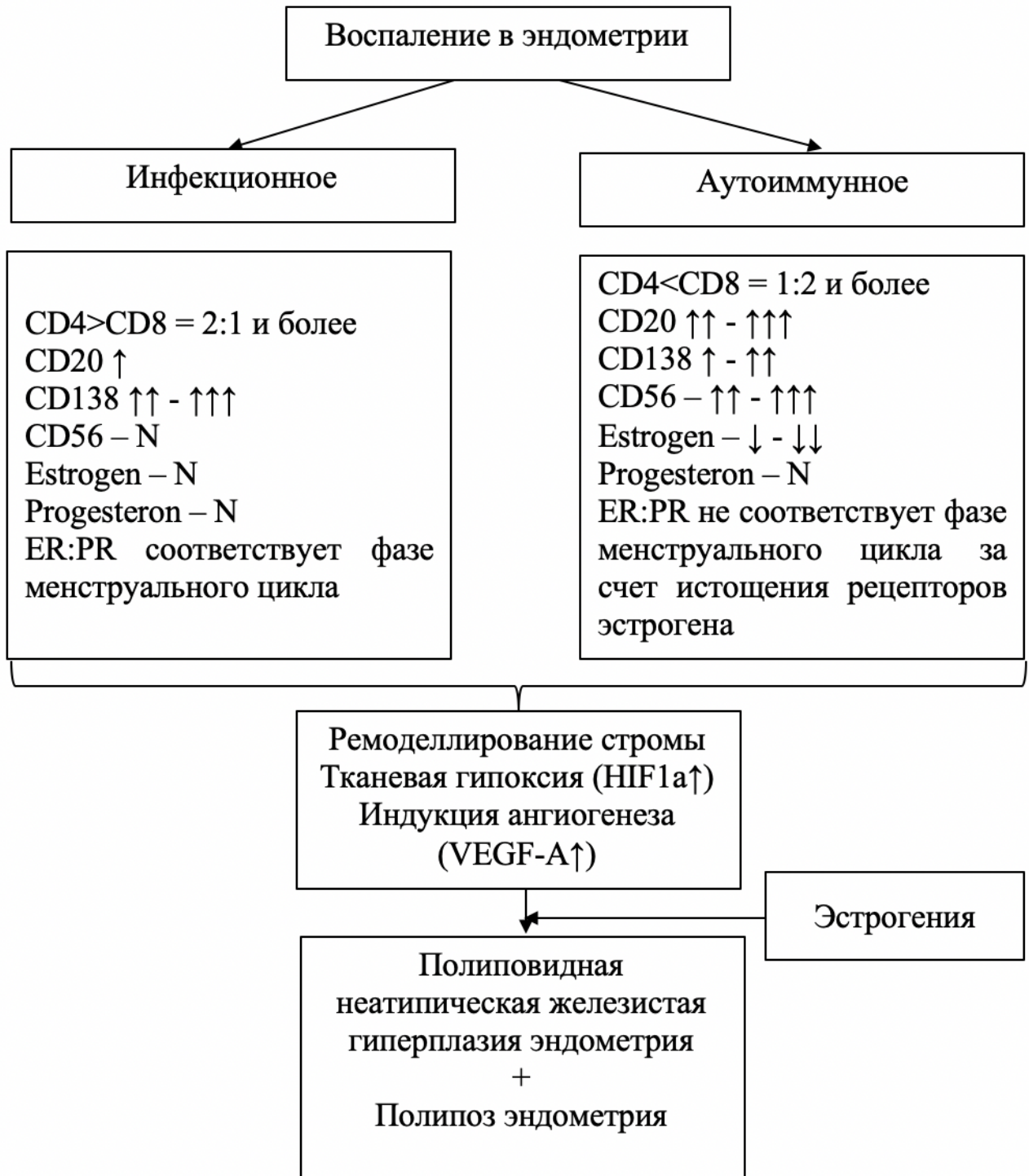


Рисунок 29. Механизм формирования неатипической железистой гиперплазии на фоне пролонгированного воспаления в эндометрии.

В результате проведенных исследований представлен и лабораторный протокол диагностического подхода при ГЭ. Протокол в разделе описания материалов и методов включает подробное описание маркеров иммуногистохимической реакции (моноклональных антител, имеющих регистрационные удостоверения для *in vitro* диагностики для применения в медицине, доступных для лицензирования и закупки на территории РФ и неподлежащих санкционным ограничениям), рекомендуемое для данного вида ткани разведение, выбор режима демаскировки и рекомендованной рН буфера, длительность периода инкубации реакции антиген-антитело. На основании полученных результатов разработаны эффективные предложения по совершенствованию работы с пациентами, предложен к внедрению новый алгоритмы которые внедрен в клиническую практику.

Перспективы работы в данном направлении состоят в том, что современные «-омные» (транскриптомные, геномные, протеомные) подходы позволят получить большое количество информации об этиопатологии ГЭ: выявить драйверные мутации, аберрантные регуляторные программы и подтипы заболеваний для ГЭ и опухолей эндометрия человека. Это открывает новую область, которая может позволить клиницистам выбирать более эффективные методы лечения на основе конкретных молекулярных путей, которые изменяются в каждом случае ГЭ индивидуально. Мы рассмотрели один из путей, который связан с развитием воспаления в эндометрии. Фактически, он отражает взаимодействие между клетками эпителия и стромы, а также локальные и автономные механизмы в микроокружении эпителиоцитов, которые могут иметь большое значение для лучшего понимания происхождения ГЭ и трансформации ее в ЭК, а также прогрессии опухолевого роста. Молекулярная диагностика в настоящее время крайне востребована и заняла прочное место в клинических рекомендациях, а новые методы станут следующим шагом к пониманию патогенеза ГЭ с точки зрения исследователя и клинициста.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучены закономерности взаимосвязанных гиперпластических, воспалительных и иммунных изменений эндометрия, представляющие интерес для использования их как диагностических критериев и патогенетической коррекции в практической медицине.

Создана удобная экспериментальная модель ГЭ для исследования гистофизиологии изменений эндометрия у лабораторных животных. На морфологически верифицированной модели ГЭ у лабораторных крыс исследованы маркеры пролиферации и апоптоза, воспаления и рецепторов овариальных гормонов дифференцированно в строме и железах эндометрия рога и тела матки в группах с ГЭ и ее патогенетической коррекции (НПВС, растительным антагонистом эстрогенов и иммуномодулятором) в сравнении с контролем.

Выявлена связь между экспрессией рецепторов эстрогенов, пролиферативной активностью эпителиальных клеток желез и количеством CD 4<sup>+</sup>, CD 8<sup>+</sup> и CD 138<sup>+</sup> лимфоцитов в строме матки лабораторных животных. Это указывает на комплексные взаимосвязанные эффекты гиперэстрогении: ГЭ проявляется морфологической трансформацией тканей эндометрия вследствие дисбаланса процессов пролиферации и апоптоза. В отсутствие роста числа лимфоцитарных маркеров в тканях гиперплазированного эндометрия у крыс (по причине недостаточного временного фактора в формировании гиперплазии, или вследствие малой активности клеточных механизмов в формировании воспалительных изменений), НПВС (мелоксикам) оказывает эффект на эндометрий рога и тела матки, приводя гистофизиологические ИГХ показатели к значениям, близким к группе без ГЭ. Несущественная динамика лимфоцитов различных популяций в эндометрии не противоречит базовым понятиям патофизиологии воспаления, поскольку изменения воспалительных маркеров носят характер вторичных, а ингибиторы циклооксигеназы 2 нормализуют

гистофизиологию матки через молекулярные механизмы. При этом присутствие иммунокомпетентных клеток в умеренном количестве является базой иммунного гомеостаза, о чем свидетельствуют результаты измерений в тканях крыс контрольной группы.

При этом исследование биоматериала женщин показало существенную динамику иммунных клеточных маркеров в механизмах воспаления. Морфология проиллюстрировала патофизиологические пути изменений при ГЭ, а выявление CD 138<sup>+</sup> плазмоцитов верифицировало хроническое воспаление у 39 % женщин с ГЭ в исследованной выборке. На основании результатов расширенного ИГХ исследования (иммунные клетки и маркеры рецепторов гормонов), расчете иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) установлена гетерогенность среди пациенток с верифицированным хроническим эндометритом: 1) с преобладанием провоспалительного и 2) противовоспалительного ответа. Среди женщин с отрицательной реакцией на CD 138 в эндометрии у 15 % выявлена неполная морфологическая картина хронического эндометрита, инициирующая поиск причин, что повлияет на тактику ведения пациентки. Разработан и внедрен в практику дифференцированный подход выявления признаков и понимания роли воспаления при неатипической железистой ГЭ у пациенток с CD 138<sup>-</sup> и CD 138<sup>+</sup> ИГХ статусом маркера плазмоцитов, включающий алгоритм и протоколы диагностики и лечения, в том числе и для неполной морфологической картины хронического эндометрита с целью своевременного выявления пациенток, их наблюдения и лечения по расширенному патогенетически обоснованному протоколу.

## ВЫВОДЫ

1. В эксперименте выявлено значимое увеличение железисто-стромального соотношения с ростом железистого компонента ( $p=0,0012$ ), увеличение высоты эпителиальных клеток в железах ( $p=0,0008$ ) и высоты просветных эпителиальных клеток ( $p=0,001$ ) в роге матки при модели ГЭ в сравнении с группой без ГЭ с нормальным пролиферативным эндометрием. Это подтверждает результативность предложенной нами модели ГЭ с трансдермальным введением эстрогенов.

2. При ГЭ в железах рогов матки крыс снижается количество ER, активность пролиферации и В-лимфоцитов, резко активируется апоптоз; индол вызывает рост числа PrR и приближает экспрессию маркера Ki-67 к норме; мелоксикам нормализует процессы апоптоза, пролиферации и инфильтрации иммунными клетками, за исключением экспрессии ER, на которую он влияет лишь в теле матки. В теле матки на модели ГЭ растет активность рецепторов апоптоза и пролиферации, снижается число Т и В-лимфоцитов; мелоксикам нормализует показатели иммунокомпетентных клеток и кинетику клеточных популяций, а индол и полиоксидоний не оказывают такой эффект.

3. Морфология иллюстрирует патофизиологические пути изменений при ГЭ у женщин: обилие желез при скудной строме (3:1); полиповидные выросты, метаплазия при отсутствии атипии; гиперемия, отек и фиброз стромы, лимфоидная инфильтрация. Выявление CD 138<sup>+</sup> плазмоцитов верифицирует ХЭ у 39 % женщин с ГЭ. Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) и другие показатели адаптивного иммунитета разделили группу с ХЭ почти поровну на подгруппы с провоспалительным и противовоспалительным ответом: 1) с преобладанием экссудативно-альтеративных процессов и индексом  $2,00 \pm 0,04$ ; 2) с гиперэргией цитотоксических клеток, аутореактивностью, пролиферацией стромы и индексом  $0,39 \pm 0,01$ .

4. Группа CD 138<sup>-</sup> ГЭ также неоднородна по результатам ИГХ исследования иммунных клеток и рецепторной активности. У меньшей части пациенток (8 % от

общей выборки и 15% от группы без ХЭ) снижена активность ER в железах, сдвиг индекса CD 4/CD 8 с преобладанием цитотоксических лимфоцитов, активация CD 20<sup>+</sup> В-лимфоцитов и CD 56<sup>+</sup> NK-клеток. Такие изменения адаптивного иммунитета при истощении ER, могут являться показателями неполной морфологической картины ХЭ при CD 138<sup>+</sup>ГЭ, нуждающейся в уточнении причин.

5. Разработан и внедрен в практику дифференцированный подход выявления признаков и роли воспаления при неатипической железистой ГЭ у пациенток с CD 138<sup>-</sup> и CD 138<sup>+</sup> ИГХ статусом маркера плазмоцитов, включающий алгоритм и протоколы диагностики и лечения, в том числе и для неполной морфологической картины хронического эндометрита с целью своевременного выявления пациенток, их наблюдения по расширенному патогенетически обоснованному протоколу.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработан способ моделирования ГЭ у полиэстричных лабораторных грызунов с усовершенствованной техникой овариэктомии и трансдермальным введением эстрогенов на протяжении 14 суток с последующей гистологической верификацией. Способ минимизирует риски воспалительных осложнений, что важно для патофизиологических экспериментов и позволяет проводить морфологические исследования поэтапно с повторным оперативным вмешательством.

2. В клинической практике важно учесть, что воспаление играет патогенетическую роль в развитии неатипической железистой ГЭ, сопровождается истощением рецепторного аппарата в эндометрии и требует коррекции медикаментозного лечения, с учетом этиологических факторов. В связи с чем, пациенткам с клинико-морфологическими признаками ГЭ рекомендованы: 1) проведение ИГХ исследования с CD 138, CD 4, CD 8, CD 20, CD 56, ER, PR на материале соскобов полости матки или биопсии эндометрия; 2) детализация клинико-anamnestических данных (внутриматочные контрацептивы, аборты, привычное невынашивание, инфекции половых путей, аутоиммунные и вирусные заболевания); 3) исключение патологии яичников (УЗИ, онкомаркеры); 4) скрининг инфекций половых путей методом ПЦР.

3. Разработан алгоритм диагностики и лечения неполной морфологической картины хронического эндометрита на фоне неатипической железистой ГЭ для своевременного выявления пациенток, их наблюдения по расширенному протоколу с предлагаемыми описанными лабораторными и морфологическими методиками, включая преаналитический и аналитический этап оценки результата.

**ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

АМК – аномальные маточные кровотечения

ВМС – внутриматочная система

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГнРГ – гонадотропин рилизинг гормон

ГЭ - гиперплазия эндометрия

ДНК – дезоксирибонуклеионовая кислота

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

КОК – комбинированные оральные контрацептивы

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ПГИ – патогистологическое исследование

ППЭ – пролиферативные процессы эндометрия

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

СПМ – соскоб полости матки

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦНИЛ – Центральная научно-исследовательская лаборатория

ЭИН – эндометриальная интраэпителиальная неоплазия

ЭК – аденокарцинома эндометрия или эндометриоидная карцинома

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

bFGF – основной фактор роста фибробластов (англ.: basic fibroblast growth factor)

CD138 – плазмоциты

CD20 – В-лимфоциты

CD4 – Т-лимфоциты хелперы

CD56 – НК-клетки

CD8 – цитотоксические лимфоциты

CSGF – колониестимулирующий фактор роста (англ.: colony-stimulating growth factor)

EGF – фактор роста эпителия

ER – рецепторы к эстрогену

IETA – международная система исследований опухолей эндометрия (англ.: International Endometrial Tumor Analysis) система оценки ультразвуковых характеристик эндометрия и полости матки

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста

IL - интерлейкины (англ.: interleukins)

NF-κB – ядерный фактор-κB

NK – натуральный киллер

PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа (англ.: phosphoinositide 3-kinase)

PrR – рецепторы к прогестерону

PTEN – ген-супрессор роста опухоли (англ.: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)

TNF-α – фактор некроза опухолей (англ.: tumor necrosis factor)

TNF-R1 – рецептор фактора некроза опухоли 1

VEGF – фактор роста сосудов (англ.: vascular endothelial growth factor)

WDR13 – белок, играющий важную роль в прогрессии опухолевого роста (англ.:

WD repeat domain 13)

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Ring, K. L. Endometrial Hyperplasia. – Текст: непосредственный / K. L. Ring, A. M. Mills, S. C. Modesitt // *Obstet Gynecol.* – 2022. – Vol. 140(6) – P. 1061–1075.
2. Endometrial hyperplasia as a risk factor of endometrial cancer / L. K. Nees, S. Heublein, S. Steinmacher [et al.]. – Текст: непосредственный // *Arch Gynecol Obstet.* – 2022. – Vol. 306(2). – P. 407–421.
3. Злокачественные новообразования в России в 2024 году (заболеваемость) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова, Н. Ю. Золотарева. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – 178 с. – ISBN 978-5-85502-311-4. – Текст : непосредственный.
4. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – 275 с. – ISBN 978-5-85502-309-1. – Текст : непосредственный
5. Navigating the future of fertility preservation: advanced predictive strategies for treatment outcomes of endometrial atypical hyperplasia and carcinoma / T. Xing, H. Li, P. L. Sun, H. Gao. – Текст : электронный // *J Gynecol Oncol.* – 2025. – Vol. 36(6):e123. – URL: doi: 10.3802/jgo.2025.36.e123.
6. Современное представление о проблеме гиперплазии эндометрия // *Научное обозрение* / Л. Г. Ерофеева, А. Г. Сидоркина, Г. Н. Новопашина, Б. Б. Ерофеев. – Текст: непосредственный // *Медицинские науки.* – 2022. – №6. – С. 82–88.
7. Эндометриальная гиперплазия: современные концепции этиопатогенеза / А. Э. Протасова, Л. В. Адамян, М. С. Собивчак, А. А. Цыпурдеева. – Текст : непосредственный // *Проблемы репродукции.* – 2023. –Т. 29, № 4. –С. 75–80.

8. Executive Summary of the Uterine Cancer Evidence Review Conference / D. Chelmow, R. Brooks, A. Cavens [ et al.]. – Текст : непосредственный // *Obstet Gynecol.* – 2022. – Vol. 139(4). – P. 626–643.

9. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia / P. A. Sanderson, H. O. Critchley, A. R. Williams [et al.]. – Текст : непосредственный // *Humen reproduction update.* – 2017. – Vol. 23, №2. – P. 232–254.

10. Molecular classification and fertility-sparing outcomes in endometrial cancer and atypical endometrial hyperplasia / J. Wang, G. Jiang, S. Yan [et al.]. – Текст : непосредственный // *Biomol Biomed.* – 2025. – Vol. 26(3). – P. 471–482.

11. Женское бесплодие. Клинические рекомендации / Н. В. Долгушина, В. С. Корсак, И. Е. Корнеева [и др.] // *Акушерство и гинекология.* – 2025. – № S10.– Текст : непосредственный.

12. Effect of postmenopausal hormone therapy on body weight and waist and hip girths. Postmenopausal Estrogen-Progestin Interventions Study Investigators / M. A. Espeland, M. L. Stefanick, D. Kritz-Silverstein [et al.]. – Текст: непосредственный // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1997. – Vol. 82(5). – P. 1549–1556.

13. Прогнозирование риска озлокачествления гиперплазии эндометрия в репродуктивном возрасте / И. М. Ордянц, А. А. Куулар, А. А. Ямурзина, Д. С. Новгинов. – Текст : непосредственный // *Фундаментальная и клиническая медицина.* – 2020. – №5(1). – С. 57–63.

14. Тумилович, Л. Г. Справочник гинеколога-эндокринолога / Л. Г. Тумилович, М. А. Геворкян. – Москва : Практическая медицина, 2017. – 67 с. – ISBN 978-5-98811-239-6. – Текст : непосредственный.

15. Чистякова, Г. Н. Гиперплазия эндометрия: классификация, особенности патогенеза, диагностика / Г. Н. Чистякова, А. А. Гришкина, И. И. Ремизова. – Текст : непосредственный // *Проблемы репродукции.* – 2018. – №(5). – С. 53–57.

16. Обоснованные подходы к диагностике и лечению тамоксифен-индуцированных состояний эндометрия у больных раком молочной железы / А. Э.

Протасова, И. А. Солнцева, А. А. Цыпурдеева [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал акушерства и женских болезней. – 2018. – Т. 67, №6. – С. 69–78.

17. The Role of Microsatellite Instability in Endometrial Hyperplasia and Risk of Carcinoma Development / A. Mollova-Kyosebekirova, E. Uchikova, A. Mihaylova [et al.]. – Текст : непосредственный // Biomedicines. – 2025. – Vol. 13(12). – P. 2953.

18. Adenomyosis associated with endometrial cancer: Possible correlation with pathological, immunohistochemical and molecular characteristics / F. La Torre, Y. Hurni, E. Farsi [et al.]. – Текст : непосредственный // Gynecol Oncol. – 2025. – Vol. 195. – P. 45–49.

19. Spectrum of Histopathological Changes in Abnormal Uterine Bleeding with Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Endometrial Hyperplasia and Carcinoma / R. Mohan, A. Mohanraj, A. Ramdas, A. Padma. – Текст : непосредственный // J Midlife Health. – 2025. – Vol. 16(4). – P. 395–401.

20. Molecular Subtype and Mutational Profile of Endometrial Atypical Hyperplasia/Endometrioid Intraepithelial Neoplasia / A. Leino, A. Nostolahti, A. Ahtikoski, J. Huvila. – Текст : непосредственный // Int J Gynecol Pathol. – 2026. – Vol.45(2). – P. 120–128.

21. Molecular classification and fertility-sparing outcomes in endometrial cancer and atypical endometrial hyperplasia / J. Wang, G. Jiang, S. Yan [et al.]. – Текст : непосредственный // Biomol Biomed. – 2025. – Vol. 26(3). – P. 471–482.

22. Molecular analysis of the evolutionary history of endometrial and ovarian carcinoma in Lynch syndrome / A. K. Kauppinen, A. P. Olkinuora, J. P. Mecklin, P. T. Peltomäki. – Текст : непосредственный // Int J Cancer. – 2025. – Vol. 157(11). – P. 2294–2308.

23. Paruchuri, B. Gynecologic Cancers: Endometrial Cancer / B. Paruchuri, A. Miller. – Текст : непосредственный // FP Essent. – 2025. – Vol. 558. – P. 15–20.

24. Knockdown of HSF1 inhibits invasion, metastasis, and proliferation of endometrial carcinoma cells while promoting apoptosis / H. Liu, X. Gu, J. Meng [et al.]. – Текст : электронный // Cancer Biomark. – 2025. – Vol.42(4). – URL: 18758592241311191. doi: 10.1177/18758592241311191.

25. Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia or endometrial cancer / D. Kim, V. Jordan, F. Casciola [et al.]. – Текст : электронный // Cochrane Database Syst Rev. – 2025. – Vol.10(10):CD000402. – URL: doi: 10.1002/14651858.CD000402.pub5.

26. Pregnancy complications and outcomes in patients with early endometrial cancer or atypical hyperplasia after fertility-sparing treatment / Y. Cheng, Y. Dong, B. Yang [et al.]. – Текст : электронный // J Gynecol Oncol. – 2025. – Vol.36(6):e111. – URL: doi: 10.3802/jgo.2025.36.e111.

27. Molecular Classification Guides Fertility-Sparing Treatment for Endometrial Cancer and Atypical Hyperplasia Patients / Y. Wang, L. Bo, X. Fan [et al.]. – Текст: непосредственный // Curr Oncol. – 2025. – Vol. 32(6). – P. 317.

28. Маркеры воспаления и гормональный фон в маточных смывах при различных вариантах лечения женщин с неатипической гиперплазией эндометрия / О. В. Карапетян, Е. П. Коваленко, Л. В. Анисимова [и др.]. – Текст: непосредственный // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2023. – Т. 13, №4. – С. 27–34.

29. Состояние локальных маркеров воспаления и апоптоза в эндометрии при гиперплазиях различной степени тяжести / О. В. Карапетян, И. И. Фомочкина, Е. Ю. Зяблицкая [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15, №3. – С. 342–347.

30. Межклеточные взаимодействия в развитии воспаления, ассоциированного с гиперплазией эндометрия / О. В. Карапетян, Е. П. Коваленко, С. Л. Литвинова [и др.]. – Текст : непосредственный // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2020. – Т. 10, №3. – С. 125.

31. Патент на полезную модель № 164282 U1 Российская Федерация, МПК А61В 10/00. Способ мониторинга интенсивности воспаления при гиперплазии эндометрия : № 2016121193/93 : заявл. 20.05.2016 : опубл. 20.08.2016 / А. В. Кубышкин, Т. Ф. Татарчук, Е. П. Коваленко [и др.] ; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования "Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского" (ФГАОУ ВО "КФУ им. В. И. Вернадского"). – Текст: непосредственный.

32. Патент на полезную модель № 164289 U1 Российская Федерация, МПК А61В 10/00. Способ выявления деструктивного компонента при воспалении, ассоциированном с гиперплазией эндометрия : № 2016121201/93 : заявл. 27.05.2016 : опубл. 20.08.2016 / А. В. Кубышкин, Е. П. Коваленко, Т. Ф. Татарчук [и др.] ; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского" (ФГАОУ ВО "КФУ им. В. И. Вернадского"). – Текст : непосредственный.

33. Гиперпластические процессы эндометрия: современная тактика ведения пациенток / Р. И. Габидуллина, Г. А. Смирнова, Ф. Р. Нухбала [и др.]. – Текст : непосредственный // Гинекология. – 2019. – Т. 21, №6. – С. 53–58.

34. Клинические рекомендации : Гиперплазия эндометрия / ред. совет: Л. В. Адамян, Е. Н. Андреева, Н. В. Артымук [и др.]. – Москва : [б. и.], 2021. – 35 с. – Текст : непосредственный.

35. Сочетанные доброкачественные опухоли и гиперпластические процессы матки (миома, аденомиоз, гиперплазия эндометрия) : клинические рекомендации по ведению больных / Л. В. Адамян, Е. Н. Андреева, В. Ф. Беженарь [и др.]. – Москва : [б. и.], 2015. – 26 с.

36. Tamoxifen activates Nrf2-dependent SQSTM1 transcription to promote endometrial hyperplasia / F. Lifeng, L. Jiaqiu, Y. Lixian [et al.]. – Текст : непосредственный // Theranostics. – 2017. – Vol. 7(7). – P. 1890–1900.

37. Comparative uterotrophic effects of Endoxifen and Tamoxifen in ovariectomized Sprague Dawley rats / M. S. Karen, R. E. Sandy, L. S. Stephanie [et al.]. – Текст : непосредственный // Toxicol Pathol. – 2014. – Vol. 42(8). – P. 1188–1196.

38. Вовк, И. Б. Клинико-иммуногистохимическая характеристика неатипичной гиперплазии эндометрия у женщин репродуктивного возраста / И. Б. Вовк, Т. Д. Задорожная, Н. Е. Горбань. – Текст : непосредственный // Медицинские перспективы. – 2020. – Т. 25, №1. – С. 134–141.

39. Expression of EFP, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue / H. Dai, S. Zhao, L. Xu [et al.]. – Текст : непосредственный // *Oncol Rep.* – 2010. – Vol. 23(3). – P. 795–9.

40. Корнева, Ю. С. Прогностическое значение изменений микроциркуляторного русла и клеточного микроокружения при железистой гиперплазии эндометрия и раке эндометрия (обзор литературы) / Ю. С. Корнева, Р. В. Украинец, А. Е. Доросевич. – Текст : непосредственный // *Опухоли женской репродуктивной системы.* – 2019. – Т. 15, №1. – С. 67–72.

41. Pathogenetic relationship of endometrial hyperplasia with aseptic nonspecific inflammatory process / O. V. Karapetyan, Ye. P. Kovalenko, S. V. Litvinova [et al.]. – Текст : непосредственный // *The New Armenian Medical Journal.* – 2019. – Vol. 13, №2. – P. 80–86.

42. Sobczuk, K. New classification system of endometrial hyperplasia WHO 2014 and its clinical implications / K. Sobczuk, A. Sobczuk. – Текст : непосредственный // *Prz Menopauzalny.* – 2017. – Vol. 16(3). – P. 107–11.

43. Royal College of Obstetrician and gynecologists. Management of Endometrial Hyperplasia. GreenTop Guideline No.67. RCOG/BSGE Joint Guideline – February 2016. – Текст : электронный. – URL: <https://www.rcog.org.uk/guidance/browse-all-guidance/green-top-guidelines/managementof-endometrial-hyperplasia-green-top-guideline-no-67/> Accessed: 20.09.2022

44. Акушерство : Национальное руководство / В. Н. Серов, М. А. Курцер, В. Е. Радзинский [и др.]. – 3-е издание, исправленное и дополненное. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2026. – 1048 с. – ISBN 978-5-9704-9451-6.

45. Overactive mTOR signaling leads to endometrial hyperplasia in aged women and mice / P. Bajwa, S. Nielsen, J. Lombard [et al.]. – Текст : непосредственный // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(5). – P. 7265–7275

46. Клинико-патогенетические особенности гиперпластических процессов эндометрия у женщин перименопаузального возраста / А. Л. Унанян, И. С. Сидорова, Е. А. Коган, Д. В. Бабурин. – Текст : непосредственный // *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение.* – 2018. – Т. 1, №1. – С. 67–71.

47. Estrogen and high-fat diet induced alterations in C57BL/6 mice endometrial transcriptome profile. Endometrial mRNA profile in E2 and HFD mice / Y. Cheng, Q. Lv, B. Xie [et al.]. – Текст : непосредственный // *Endocrine Connections*. – 2018. – Vol. 7(1). – P. 36–46.

48. Molecular characterization of Wdr13 knockout female mice uteri: a model for human endometrial hyperplasia / S. Singh, S. Pavuluri, B. J. Lakshmi [et al.]. – Текст : электронный // *Scientific Reports*. – 2020 – Vol.10. – 14621 – URL: [www.nature.com/scientificreports/](http://www.nature.com/scientificreports/) <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70773-w>.

49. Effects of melatonin on uterine hypertrophy/hyperplasia: A preliminary experimental rat study / M. C. Sivasa, O. L. Tapisiza, R. T. Ayika [et al.]. – 2020. 6:e05142.– URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05142>.

50. Activation of Estrogen Response Element-Independent ER $\alpha$  Signaling Protects Female Mice From Diet-Induced Obesity / Yasrebi A, Rivera JA, Krumm EA. [et al.]. – Текст : непосредственный // *Endocrinology*. – 2017 Feb 1;158(2):319-334.

51. Hormonal, metabolic, and inflammatory profiles and endometrial cancer risk within the EPIC cohort – a factor analysis / L. Dossus, A. Lukanova, S. Rinaldi [et al.]. – Текст : непосредственный // *American Journal of Epidemiology*. – 2013. – Vol. 177. – P. 787–799.

52. Effect of letrozole in carcinogen-plus-estrogen-induced endometrial hyperplasia in mice /Alessandra Cerávolo Lara, Eduardo Batista Cândido, Paula Vieira Vidiga [et al.]. – Текст : электронный // 286 - *Acta Cirúrgica Brasileira*. – 2016. – Vol. 31(4). – URL: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160040000010>

53. Microphysiological Modeling of the Human Endometrium / Hannes Campo, Alina Murphy, Sule Yildiz [et al.]. – Текст : непосредственный // *Tissue Eng Part A*. – 2020. – Vol. 26(13–14). – P. 759–768.

54. Гайдуков, С. Н. Эффективность гормонотерапии и таргетных медикаментозных средств при лечении гиперплазии эндометрия в сочетании с аденомиозом / С. Н. Гайдуков, А. Ф. Арутюнян. – Текст : электронный // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 6. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=23761> (дата обращения: 29.03.2026).

55. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram [et al.]. – Текст : непосредственный // *CA Cancer J Clin.* – 2018. – Vol. 68(6). – P. 394–424.

56. International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978–2013 / J. Lortet-Tieulent, J. Ferlay, F. Bray, A. Jemal. – Текст : непосредственный // *J Natl Cancer Inst.* – 2018. – Vol. 110(4). – P. 354–361.

57. Pathogenetic relationship of endometrial hyperplasia with a septic nonspecific inflammatory process / O. V. Karapetyan, Ye. P. Kovalenko, S. V. Litvinova [et al.] // *New Armenian Medical Journal.* – 2019. – Vol. 13, No. 2. – P. 80-86..

58. К вопросу о патогенезе гиперплазии эндометрия / А. Х. Биштави, О. А. Горных, В. Н. Гулиева [и др.]. – Текст : непосредственный // *Опухоли женской репродуктивной системы.* – 2012. – №3–4. – С. 108-111.

59. The clinical significance of inflammatory cytokines in primary cell culture in endometrial carcinoma / H. O. Smith, N. D. Stephens, C. R. Qualls [et al.]. – Текст : непосредственный // *Mol. Oncol.* – 2013. – Vol. 7. – P. 41–54.

60. NF- $\kappa$ B and COX-2 expression in nonmalignant endometrial lesions and cancer / C. C. Faloppa, G. Baiocchi, I. W. Cunha [et al.]. – Текст : непосредственный // *Am J Clin Pathol.* – 2014. – Vol. 141. – P. 196–203.

61. Protective Effects of Irbesartan an Angiotensin Receptor Blocker with PPAR $\gamma$  Agonistic Activity, against Estradiol Benzoate-Induced Endometrial Hyperplasia and Atypia in Female Rats via Modulation of TNF $\alpha$ /Survivin Pathway / M. A. Morsy, W. M. Abdelraheem, M. El-Hussieny, M. M. M. Refaie. – Текст : непосредственный // *Pharmaceuticals.* – 2021. – Vol. 14. – P. 649.

62. Ozkara, S. K. Significantly decreased P27 expression in endometrial carcinoma compared to complex hyperplasia with atypia (correlation with p53 expression) / S. K. Ozkara, A. Corakci. – Текст : непосредственный // *Pathol Oncol Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 89–97.

63. Kyo, S. Stem cells in endometrium and endometrial cancer: Accumulating evidence and unresolved questions / S. Kyo, Y. Maida, M. Inoue. – Текст : непосредственный // *Cancer Lett.* – 2011. – Vol. 308. – P. 123–133.

64. Stem Cell-Like Differentiation Potentials of Endometrial Side Population Cells as Revealed by a Newly Developed In Vivo Endometrial Stem Cell Assay / K. Miyazaki, T. Maruyama, H. Masuda [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – e50749. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050749>

65. Gellersen, B. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure / B. Gellersen, J. Brosens. – Текст : непосредственный // *Endocr. Rev.* – 2014. – Vol. 35. – P. 851–905.

66. Uterine stem cells: From basic research to advanced cell therapies / X. Santamaria, A. Mas, I. Cervelló [et al.]. – Текст : непосредственный // *Hum. Reprod. Updat.* – 2018. – Vol. 24. – P. 673–693.

67. Molecular Basis of Endometriosis and Endometrial Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives / M. Terzic, G. Aimagambetova, J. Kunz [et al.]. – Текст : непосредственный // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 9274.

68. Gibson, D. A. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors / D. A. Gibson, P. T. K. Saunders. – Текст : непосредственный // *Mol Cell Endocrinol.* – 2012. – Vol. 348. – P. 361–372.

69. Endometrial cancer / F. Amant, P. Moerman, P. Neven [et al.]. – Текст : непосредственный // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – P. 491–505.

70. Loss of progesterone receptor links to high proliferation and increases from primary to metastatic endometrial cancer lesions / I. L. Tangen, H. M. J. Werner, A. Berg [et al.]. – Текст : непосредственный // *Eur J Cancer.* – 2014. – Vol. 50. – P. 3003–3010.

71. Kurman, R. World Health Organisation Classification of Tumors of Female Reproductive Organs / R. Kurman, M. Carcangiu, C. Y. R. Herrington. – 4th edn. – Lyon Fr Int Agency Res Cancer Press, 2014. – Текст : электронный. – URL:

<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Female-Reproductive-Organs-2014>

72. Marwa, M. M. The role of interleukin-1b and its antagonist (diacerein) in estradiol benzoate-induced endometrial hyperplasia and atypia in female rats / M. M. Marwa, Maram El-Hussieny. – Текст : непосредственный // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2017. – Vol. 31. – P. 438–446.

73. An estrogen-induced endometrial hyperplasia in mouse model recapitulating human disease progression and genetic aberrations / C. Yang, A. Almomen, Y. S. Wee, E. A. Jarboe. – Текст : непосредственный // *Cancer Med*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1039–1050.

74. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease / H. N. Jabbour, K. J. Sales, R. D. Catalano, J. E. Norman. – Текст : непосредственный // *Reproduction*. – 2009. – Vol. 38. – P. 903–919.

75. Concurrent and future risk of endometrial cancer in women with endometrial hyperplasia: A systematic review and meta-analysis / M. T. Doherty, O. B. Sanni, H. G. Coleman [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS ONE*. – Vol. 15(4). e0232231. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232231>

76. Management of Endometrial Hyperplasia: A Comparative Review of Guidelines / Boureka E, Tsakiridis I, Kapetanios G [et al.]. – Текст : непосредственный // *Cancers (Basel)*. 2025 Sep 27;17(19):3143

77. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions / D. Hanahan. – Текст : непосредственный // *Cancer discovery*. – 2022. – Vol. 12(1). – P. 31–46.

78. Chloroform Fraction of *Drymaria cordata* Linn (CFDC) Suppresses Estradiol Benzoate- Induced Endometrial Hyperplasia / A. O. Olowofolahan, O. Akinjiola, J. O. Olanlokun [et al.]. – Текст : непосредственный // *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 23(11). – P. 1298–1308.

79. Curcumin modulates oxidative stress via NOX4 to ameliorate endometrial hyperplasia / W. Li, C. Zheng, X. Sun [et al.]. – Текст : электронный // *International Immunopharmacology*. – 2025. – Vol.164:115392. – URL: [doi:10.1016/j.intimp.2025.115392](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.115392)

80. PLIN2: a potential prognostic markers of early-stage atypical endometrial hyperplasia / C. Lian, M. He, C. Zhao [et al.]. – Текст : электронный // Journal of gynecologic oncology. – 2025. – Vol. 36(5):e84. – URL: doi:10.3802/jgo.2025.36.e84

81. Nikolakopoulou K, Turco MY. Investigation of infertility using endometrial organoids. *Reproduction*. 2021 May;161(5):R113-R127. doi: 10.1530/REP-20-0428.

82. Ультразвуковые признаки для диагностики и оценки эффективности медикаментозного лечения сочетанных пролиферативных заболеваний матки / А. Г. Кедрова, С. А. Леваков, О. Е. Нечаева [и др.]. – Текст : непосредственный // Клиническая практика. – 2014. – №3. – С. 25–34.

83. Terms, definitions and measurements to describe the sonographic features of the endometrium and intrauterine lesions: a consensus opinion from the International Endometrial Tumor Analysis (IETA) group / D. Timmerman, T. Bourne, L. Valentin [et al.]. – Текст : непосредственный // *Ultrasound Obstet Gynecol*. – 2010. – Vol. 35(1). – P. 103–12.

84. Batra, S. Power Doppler sonography – A supplement to hysteroscopy in abnormal uterine bleeding: Redefining diagnostic strategies / S. Batra, A. Khanna, R. C. Shukla. – Текст : непосредственный // *Indian J Cancer*. – 2022. – Vol. 59(2). – P. 194–202.

85. ACOG Committee Opinion No. 426: The Role of Transvaginal ultrasonography in the Evaluation of Postmenopausal Bleeding. – Текст : непосредственный // *Obstetrics & Gynecology*: February. – 2009. – Vol. 113, №2, pt 1. – P. 462–464.

86. Hysteroscopy for asymptomatic postmenopausal women with sonographically thickened endometrium / T. Schmidt, M. Breidenbach, F. Nawroth [et al.]. – Текст : непосредственный // *Maturitas*. – 2009. – Vol. 62. – P. 176–178.

87. Accuracy of Transvaginal Ultrasonography, Hysteroscopy and Uterine Curettage in Evaluating Endometrial Pathologies / M. D. Wanderley, M. M. Álvares, M. F. Vogt, L. M. Sasaki. – Текст : непосредственный // *Rev Bras Ginecol Obstet*. – 2016. – Vol. 38(10). – P. 506–511.

88. Addition of power Doppler to grey scale transvaginal ultrasonography for improving the prediction of endometrial pathology in perimenopausal women with abnormal uterine bleeding / Veena P, Baskaran D, Maurya DK [et al.]. – Текст : непосредственный // Indian J Med Res. 2018 Sep;148(3):302-308. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_96\_17..

89. Intraperitoneal dissemination of endometrial cancer cells after hysteroscopy: a systematic review and meta-analysis / N. P. Polyzos, D. Mauri, S. Tsioras [et al.]. – Текст : непосредственный // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2010. – Vol. 20. – P. 261–7.

90. Comparison of the success of histopathological diagnosis with dilatation–curettage and Pipelle endometrial sampling / M. Kazandi, F. Okmen, A. M. Ergenoglu [et al.]. – Текст : непосредственный // J. Obstet. Gynaecol. – 2012. – Vol. 32(8). – P. 790–4.

91. Immunohistochemical markers in endometrial hyperplasia: is there a panel with promise? A review. Appl. Immunohistochem / K. H. Allison, E. Tenpenny, S. D. Reed [et al.]. – Текст : непосредственный // Mol. Morphol. –2008. – Vol. 16(4). – P. 329–43.

92. О тактике ведения больных с атипической гиперплазией эндометрия / О. А. Горных, Ю. Ю. Табакман, А. Х. Биштави [и др.]. – Текст : непосредственный // Проблемы репродукции. – 2014. – №1. – С. 20–23.

93. Ткаченко, Л. В. Роль агонистов гонадотропин-рилизинг-гормона в комплексной терапии гиперпластических процессов репродуктивных органов / Л. В. Ткаченко, Н. И. Свиридова. – Текст : непосредственный // Журнал акушерства и женских болезней. – 2014. – №2. – С. 6–11.

94. Endometrial Hyperplasia: Current Insights into Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Management / Galani A, Stavros S, Moustakli E [et al.]. – Текст : непосредственный // Cancers (Basel). 2025 Dec 31;18(1):148. doi: 10.3390/cancers18010148. PMID: 41514656; PMCID: PMC12784877.

95. Treatment results of endometrial hyperplasia after prospective D-score classification A follow-up study comparing effect of LNG-IUD and oral progestins

versus observation only / A. Ørbo, Marit Arnes, Christine Hancke [et al.]. – Текст : непосредственный // *Gynecol. Oncol.* – 2008. – Vol. 111(1). – P. 68–73.

96. Гиперплазия эндометрия – от патогенеза к эффективной терапии / М. Р. Оразов, М. Б. Хамошина, И. А. Муллина, Ю. С. Артеменко. – Текст : непосредственный // *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение.* – 2021. – Т. 9, №3. – С. 21–8.

97. Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women / C. Campagnoli, Chiara Abbà, Simona Ambroggio [ et al. ]. – Текст : непосредственный // *Gynecol. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 29(2). – P. 119–124.

98. Catch it before it kills: progesterone, obesity, and the prevention of endometrial cancer / M. J. Carlson, Kristina W Thiel, Shujie Yang, Kimberly K Leslie. – Текст : непосредственный // *Discov. Med.* – 2012. – Vol. 14(76). – P. 215–222.

99. Гинекология. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. Г. М. Савельевой, Г. Т. Сухих, И. Б. Манухина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 704 с. – ISBN 978-5-9704-2662-3. – Текст : непосредственный.

100. Самостоятельная гормонотерапия предрака и начального рака эндометрия: за и против / О. В. Новикова, Ю. Ю. Андреева, Е. Г. Новиков [и др.]. – Текст: непосредственный // *Вопросы онкологии.* – 2014. – Т. 60, №3. – С. 306–312.

101. LNG-IUS versus oral progestogen treatment for endometrial hyperplasia: a long-term comparative cohort study / I. D. Gallos, Preeti Krishan, Manjeet Shehmar [ et al. ]. – Текст: непосредственный // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol. 28(11). – P. 2966–2971.

102. Pathologic features associated with resolution of complex atypical hyperplasia and grade 1 endometrial adenocarcinoma after progestin therapy / C. C. Gunderson, Sonia Dutta, Amanda Nickles Fade [et al.]. – Текст : непосредственный // *Gynecol. Oncol.* – 2014. – Vol. 132(1). – P. 33–37.

103. Оразов, М. Р. Дискуссионные вопросы ведения пациенток с гиперплазией эндометрия / М. Р. Оразов. – Текст: непосредственный // *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение.* – 2016. – №3. – С. 46–58.

104. Therapeutic options for management of endometrial hyperplasia / V. Chandra, J. J. Kim, D. M. Benbrook [et al.]. – Текст: электронный // *J Gynecol Oncol.* – 2016. – Vol. 27(1). e8. – PMID: 26463434.

105. Abu Hashim H. Levonorgestrel-releasing intrauterine system vs oral progestins for non-atypical endometrial hyperplasia: a systematic review and meta-analysis of randomized trials / H. Abu Hashim, E. Ghayaty, M. El Rakhawy. – Текст : непосредственный // *Am J Obstet Gynecol.* – 2015. – Vol. 213. – P. 469–78.

106. Oral progestogens vs levonorgestrel-releasing intrauterine system for endometrial hyperplasia: a systematic review and metaanalysis / I. D. Gallos, M. Shehmar, S. Thangaratinam [et al.]. – Текст : непосредственный // *Am J Obstet Gynecol.* – 2010. – Vol. 203(6). – P. 547.

107. Levonorgestrel-releasing intrauterine device versus dydrogesterone for management of endometrial hyperplasia without atypia / M. M. El Behery, H. S. Saleh, M. A. Ibrahim [et al.]. – Текст : непосредственный // *Reprod Sci.* – 2015. – Vol. 22(3). – P. 329–34.

108. Mittermeier T. Levonorgestrel-releasing intrauterine system for endometrial hyperplasia / T. Mittermeier, C. Farrant, M. R. Wise. – Текст : электронный // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2020. – Vol.6. 9:CD012658. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32909630?dopt=Abstract>

109. Effectiveness of Megestrol for the Treatment of Patients with Atypical Endometrial Hyperplasia or Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma (Stage IA, Well Differentiated) / Akhavan S, Sabet F, Mousavi AS [et al.]. – Текст : непосредственный // *J Res Pharm Pract.* 2021 Dec 25;10(3):138-143.

110. Significance of progesterone receptors (PR-A and PR-B) expression as predictors for relapse after successful therapy of endometrial hyperplasia: a retrospective cohort study / E. T. Sletten, M. Arnes, L. M. Lyså [et al.]. – Текст : непосредственный // *BJOG.* – 2019. – Vol. 126(7). – P. 936–94.

111. Treatment of simple and complex endometrial non-atypical hyperplasia with natural progesterone: response rate to different doses / C. Marra, C. Penati, L.

Ferrari [et al.]. – Текст : непосредственный // *Gynecol Endocrinol.* – 2014. – Vol. 30(12). – P. 899–901.

112. Direct transport of progesterone from vagina to uterus / E. Cicinelli, D. de Ziegler, C. Bulletti [et al.]. – Текст: непосредственный // *Obstet. Gynecol.* – 2000. – Vol. 95. – P. 403–406.

113. Walker, K. Menstrual Dysfunction in PCOS / K. Walker, A. H. Decherney, R. Saunders. – Текст: непосредственный // *Clin Obstet Gynecol.* – 2021. – Vol. 64(1). – P. 119–125.

114. Risk Factors for Endometrial Cancer or Hyperplasia in Adolescents and Women 25 Years Old or Younger / M. W. Rosen, J. Tasset, E. K. Kobernik [et al.]. – Текст : непосредственный // *J Pediatr Adolesc Gynecol.* – 2019. – Vol. 32(5) – P. 546–549.

115. Effect of levonorgestrel IUD and oral medroxyprogesterone acetate on Glandular and stromal progesterone receptors (PRA and PRB), and estrogen receptors (ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ ) in human endometrial hyperplasia / A. B. Vereide, Turid Kaino, Georg Sager [et al.]. – Текст : непосредственный // *Gynecologic. Oncology.* – 2006. – Vol. 101. – P. 214–223.

116. Prevention of endometrial hyperplasia without atypia in women of reproductive age / M. R. Orazov, L. M. Mihaleva, R. E. Orekhov, I. A. Mullina. – Текст : непосредственный // *Gynecology.* – 2021. – Vol. 23(5). – P. 454–458.

117. Пустотина, О. А. Агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона и add-back-терапия / О. А. Пустотина. – Текст : непосредственный // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2023. – Т. 23, №2. – С. 63–69.

118. Aromatase inhibitor anastrozole for treating endometrial hyperplasia in obese postmenopausal women / T. Agorastos, Violeta Vaitzi, Konstantinos Pantazis [et al.]. – Текст : непосредственный // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2005. – Vol. 118 (2). – P. 239–240.

119. Barker, L. C. Sustained effect of the aromatase inhibitors anastrozole and letrozole on endometrial thickness in patients with endometrial hyperplasia and

endometrial carcinoma / L. C. Barker, I. R. Brand, S. M. Crawford. – Текст : непосредственный // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2009. – Vol. 25(5). – P. 1105–1109.

120. Арсланян, К. Н. Еще один взгляд на лечебные аспекты применения комбинированных оральных контрацептивов / К. Н. Арсланян, Г. Р. Байрамова. – Текст : непосредственный // *Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения.* – 2014. – №2(4). – С. 151–155.

121. Тихомиров, А. Л. Пролонгированный режим низкодозированных комбинированных оральных контрацептивов в комплексном консервативном лечении больных миомой матки и типичными гиперплазиями эндометрия / А. Л. Тихомиров, В. В. Казенашев. – Текст : непосредственный // *Акушерство и гинекология.* – 2013. – №8. – С. 113–116.

122. Current management of endometrial hyperplasia—a survey of United Kingdom consultant gynaecologists / I. D. Gallos, Olumide Ofinran, M Shehmar [et al.]. – Текст : непосредственный // *Eur. J. Obstet. Gynecol.* – 2011. – Vol. 158(2). – P. 305–307.

123. Шешукова, Н. А. Роль воспалительного фактора в опухолевой трансформации эндометрия / Н. А. Шешукова, Т. Д. Гуриев, А. С. Федотова. – Текст : непосредственный // *Гинекология.* – 2014. – №3. – С. 57–58.

124. Иммуногистохимические методы : руководство / ed. George L. Kumar, Lars Rudbeck ; рус. изд. под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова ; [пер. с англ. Н. В. Данилова, Л. В. Москвина, Н. М. Гайфуллин]. – Москва : [б. и.], 2011. – 223 с. : ил. – ISBN 978-5-91366-295-8. – Текст : непосредственный.

125. Allred Scoring of ER-IHC Stained Whole-Slide Images for Hormone Receptor Status in Breast Carcinoma / M. F. Ahmad Fauzi, Wan Ahmad WSHM, M. F. Jamaluddin [et al.]. – Текст : непосредственный // *Diagnostics (Basel).* – 2022. – Vol. 12(12). – P. 3093.

126. Allred score is a promising predictor of prognosis and medroxyprogesterone acetate efficacy in patients with endometrial cancer / M. Yunokawa, H. Yoshida, R. Watanabe [et al.]. – Текст : непосредственный // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2017. – Vol. 80(1). – P. 127–134.

127. Marnach, M. L. Evaluation and Management of Abnormal Uterine Bleeding / M. L. Marnach, S. K. Laughlin-Tommaso. – Текст : непосредственный // Mayo Clin Proc. – 2019. – Vol. 94(2). – P. 326–335.

128. Nonoperative management of atypical endometrial hyperplasia and grade 1 endometrial cancer with the levonorgestrel intrauterine device in medically ill postmenopausal women / W. D. Baker, S. R. Pierce, A. M. Mills [et al.]. – Текст : непосредственный // Gynecol Oncol. – 2017. – Vol. 146(1). – P. 34–38.

129. Teng, Y. H. Molecular function of syndecan-1 in diseases / Y. H. Teng, R. S. Aquino, P. W. Park. – Текст : непосредственный // Matrix biol. : journal. – 2012. – Vol. 31, №1. – P. 186–195.

130. Chronic Endometritis: Old Problem, Novel Insights and Future Challenges / E. Puente, L. Alonso, A. S. Laganà [et al.]. – Текст : непосредственный // Int. J. Fertil. Steril. – 2020. – Vol. 13, №4. – P. 250–256.