

УДК 616-001/-009

# Пептид CGRP и субстанция P как предикторы венозной тазовой боли

С. Г. Гаврилов<sup>1</sup>, Г. Ю. Васильева<sup>2</sup>, И. М. Васильев<sup>2</sup>, О. И. Ефремова<sup>1</sup><sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, 119049 Россия<sup>2</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

\*E-mail: gavrillofsg@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2019

Принята к печати 14.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-88-92

**РЕФЕРАТ** Определено содержание в плазме крови пептида, относящегося к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide, CGRP), и субстанции P (CP) у пациентов с расширением внутритазовых вен. Обследованы 30 женщин с расширением внутритазовых вен и рефлюксом крови по ним по данным ультразвукового ангиосканирования. В группу 1 включены 18 больных с клиническими признаками синдрома тазового венозного полнокровия (СТВП), включая венозную тазовую боль (ВТБ). Группу 2 составили 12 женщин без каких-либо клинических проявлений СТВП на фоне расширения тазовых вен. В исследование включены 10 здоровых женщин в возрасте 21–22 лет. В группе 1 интенсивность ВТБ колебалась от 4 до 8 баллов ( $4.84 \pm 0.43$  в среднем). Уровень CGRP колебался от 0.39 до 1.01 нг/мл (в среднем  $0.71 \pm 0.11$  нг/мл), CP – от 0.005 до 1.33 нг/мл (в среднем  $0.42 \pm 0.18$  нг/мл). В группе 2 значения CGRP составили 0.15–0.32 нг/мл (среднее  $0.26 \pm 0.02$  нг/мл), CP – 0.003–0.3 нг/мл (среднее  $0.15 \pm 0.06$ ). В этой группе уровни изучаемых пептидов были в 3–5 раз ниже, чем у больных с ВТБ. В группе 3 средние значения CGRP составили  $0.06 \pm 0.003$  нг/мл, CP –  $0.03 \pm 0.001$  нг/мл. Эти значения рассматривали как референтные. Статистический анализ проводили на основании этих показателей. Корреляционный анализ выявил сильную взаимосвязь между уровнями CGRP и ВТБ ( $r = 0.82$ ), среднюю – между значениями CP и тазовой болью в группе 1. Относительный риск развития ВТБ при повышении уровня CGRP в группе 1 в 19 раз выше, чем во второй ( $RR = 19.19$ ; 95% ДИ: 2.78–132.35). Во второй группе столь очевидных взаимосвязей не выявлено. Уровни CGRP и CP в плазме крови высоко коррелируют с наличием венозной тазовой боли. Вероятно, CGRP и CP играют существенную роль в формировании болевого синдрома у пациентов с СТВП.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** венозная тазовая боль, пептид, относящийся к гену кальцитонина (CGRP), субстанция P. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВТБ – венозная тазовая боль; СТВП – синдром тазового венозного полнокровия; CGRP – пептид, относящийся к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide); CP – субстанция P.

## ВВЕДЕНИЕ

Хроническая тазовая боль (ХТБ) представляет одну из актуальных и сложных проблем современной медицины [1, 2]. По данным ВОЗ, ХТБ встречается у 2.4–24% населения с преобладанием женщин репродуктивного возраста [3]. По другим данным, ХТБ страдают 3.8% женщин, а ежегодные затраты на лечение ХТБ в странах Европы составляют 3.8 млрд евро [4, 5]. У 10–30% пациентов с ХТБ причиной пеллалгий является синдром тазового венозного полнокровия (СТВП), а у 10% всей женской популяции имеют место расширение и рефлюкс крови по тазовым венам и у 60% из них формируется СТВП [6–9]. В работе Hansrani и соавт. [10] убедительно доказана связь между ХТБ и СТВП у женщин с клапанной недостаточностью внутритазовых вен. Таким образом, тазовая венозная недостаточность является весомым

фактором развития ХТБ. Причины возникновения венозной тазовой боли (ВТБ) до конца не изучены, а имеющиеся гемодинамические и воспалительные гипотезы не могут до конца объяснить причину возникновения болевого синдрома у одних пациентов и его отсутствие у других при одинаковых морфофункциональных изменениях тазовых вен [11–13]. Доказано отсутствие очевидной связи между диаметром висцеральных вен таза и выраженностью ВТБ [14, 15]. Вместе с тем, на возможную связь между нейрогенным воспалением, гиперпродукцией и повышением активности вазоактивных нейропептидов и формированием ВТБ указывают результаты ряда работ [16–19].

Цель настоящей работы состояла в определении содержания в плазме крови пептида, относящегося к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide,

CGRP), и субстанции P (CP) у пациентов с расширением внутритазовых вен и выявлении корреляционных связей между уровнями этих альгогенов и ВТБ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Пациенты

В исследование включены 30 женщин в возрасте от 22 до 42 лет, у которых расширение внутритазовых вен и патологический рефлюкс крови по ним выявлены по результатам трансабдоминального и трансвагинального ультразвукового ангиосканирования (УЗАС) вен таза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова и зарегистрировано на *clinicaltrials.gov* (NCT03921788). Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании.

#### Дизайн исследования

Пациенты были разделены на группы в зависимости от наличия/отсутствия венозной тазовой боли (ВТБ) в соответствии с критериями включения/исключения. Критериями включения в исследование служили репродуктивный возраст, обнаружение расширения вен таза и ретроградного кровотока по параметральным, маточным, гонадным венам более 0.5 с по данным УЗАС, отсутствие какой-либо сопутствующей патологии, сопровождающейся хронической тазовой болью (ХТБ), согласие пациента на участие в исследовании. Критериями исключения считали отсутствие расширенных тазовых вен и рефлюкса крови по ним при выполнении УЗАС, заболевания, клиническое течение которых предполагает ХТБ и другие разновидности хронического болевого синдрома, включая мигрень. С этой целью все больные консультированы гинекологом, урологом и неврологом, им выполнены ультразвуковые исследова-

ования внутренних половых органов и мочевыделительной системы.

В группу 1 включены 18 пациенток с клиническими признаками синдрома тазового венозного полнокровия (СТВП), включая венозную тазовую боль. Выраженность ВТБ оценивали с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ), в этой группе больных она колебалась от 4 до 8 баллов. Во второй группе (12 пациенток) отсутствовали какие-либо клинические проявления СТВП на фоне расширения тазовых вен.

Третью, контрольную группу, составили 10 добровольцев без каких-либо острых и хронических заболеваний, сопровождающихся болевым синдромом, у них отсутствовала варикозная трансформация вен таза и нижних конечностей визуально и по данным УЗАС. Результаты клинического и ультразвукового исследований представлены в табл. 1.

#### Иммуноферментный анализ

Забор венозной крови из кубитальной вены осуществляли в одно и то же время (8.00–8.30 ч), натощак, в положении сидя, через 7 дней после окончания последней менструации. Кровь отбирали в вакуумные пробирки объемом 4.0 мл, содержащие  $K_2$ -EDTA, центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин. По 1.0 мл плазмы крови помещали в 2 пробирки типа «Эппендорф». Биологический материал немедленно замораживали и хранили при температуре  $-80^{\circ}C$  для последующего анализа. CGRP и субстанцию P (CP) исследовали с помощью конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA) с коммерческими наборами Peninsula laboratories, LLC фирмы Vachem Group (США). Стандарты и образцы анализировали в нескольких повторностях. Использовали рекомендованный производителем протокол № 5 с инкубацией при  $4^{\circ}C$  в течение 14–16 ч (over night). Оптическую плотность измеряли

Таблица 1. Клинические данные и результаты ультразвуковых исследований ( $n = 30$ )

Показатель		Группа 1 ( $n = 18$ )	Группа 2 ( $n = 12$ )	Группа 3 ( $n = 10$ )
Возраст, лет		$30.2 \pm 2.4$	$31.6 \pm 1.9^*$	$21.3 \pm 0.8^{**}$
ИМТ		$23.4 \pm 0.8$	$22 \pm 0.6^*$	$20.4 \pm 0.3^{**}$
Количество родов		1–3	1–3	0
Стаж заболевания/обнаружения варикозных вен таза, лет		$4.9 \pm 1.3$	$3.3 \pm 1.1^*$	0
ВТБ, $n/\%$		18/100	0	0
ХТБ любой другой локализации, %		0	0	0
КН	Параметральные вены, $n/\%$	30/100	30/100	0
	Маточные вены, $n/\%$	9/50	5/41.6	0
	Гонадные вены, $n/\%$	4/22.2	3/25	0

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; КН – клапанная недостаточность. \*  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.05$ .

на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (микропланшетный фотометр Awareness Technology Inc., США) в стандартных 96-луночных планшетах при длине волны 450 нм. Концентрацию нейропептидов рассчитывали с использованием компьютерной программы Cobas EIA Recalibration Software (F.Hoffmann – La Roche Ltd, Швейцария).

### Статистическая обработка

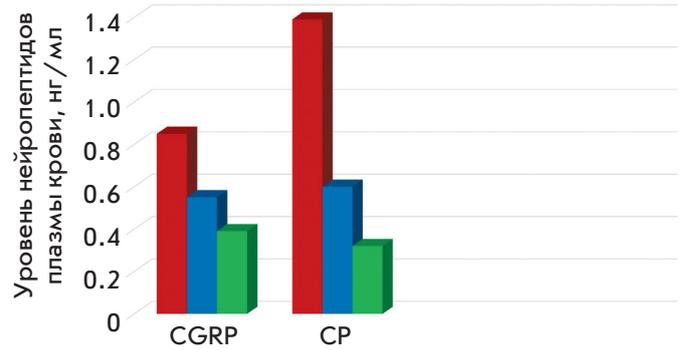
Статистический анализ проведен с использованием компьютерных программ Microsoft Excel, Statistica 6.0 и статистического онлайн-калькулятора medstatistic.ru. Рассчитывали среднее арифметическое ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Данные представлены в виде абсолютных и относительных величин. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Взаимосвязь между клиническими и лабораторными показателями оценивали с использованием корреляционно-регрессионного анализа ( $r$ ) и расчета относительного риска ( $RR$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные трансабдоминального и трансвагинального УЗАС свидетельствовали об отсутствии значимых отличий в распространенности клапанной недостаточности тазовых вен у больных 1-й и 2-й групп. У пациентов второй группы, несмотря на патологический рефлюкс крови по гонадным (25%) и маточным (41.6%) венам, отсутствовали признаки тазового венозного полнокровия. Диаметр внутритазовых вен не учитывали вследствие отсутствия сколь-либо значимой взаимосвязи с наличием и выраженностью ВТБ, что согласуется с результатами, полученными ранее [14, 15]. Результаты лабораторных исследований выявляют статистически значимые различия между группами.

#### Группа 1

Среди пациентов этой группы интенсивность ВТБ колебалась от 4 до 8 баллов, составив в среднем  $4.84 \pm 0.43$  балла. Уровень CGRP в группе 1 колебался от 0.39 до 1.01 нг/мл (в среднем  $0.71 \pm 0.11$  нг/мл), CP – от 0.005 до 1.33 нг/мл ( $0.42 \pm 0.18$  нг/мл в среднем). У шести пациентов с выраженностью ВТБ 5–8 баллов уровни CGRP находились в пределах 0.69–1.01 нг/мл, CP – от 0.006 до 1.45 нг/мл. В двух наблюдениях с максимальной болью 8 баллов отмечено сочетание повышения концентрации нейропептидов: CGRP – 0.69 нг/мл, CP – 1.33 нг/мл у одной пациентки; CGRP – 1.01 нг/мл, CP – 1.45 нг/мл – у второй. Вероятно, сочетанное увеличение продукции этих белков способствует формированию более выраженного болевого синдрома. У шести пациентов тазовая боль интенсивностью 4 балла сопровождалась менее



Выраженность ВТБ: ■ 8 баллов ■ 5–6 баллов ■ 4 балла

Содержание CGRP, CP и выраженность венозной тазовой боли у больных первой группы

значимым увеличением концентраций CGRP (0.39–0.51 нг/мл) и CP (0.005–0.38 нг/мл). На рисунке представлены клиничко-лабораторные параллели между интенсивностью ВТБ и уровнем нейротрансмиттеров.

Примечательно, что, в отличие от CGRP, уровни CP в плазме крови больных этой группы варьировали в широких пределах: от нормальных значений до значительных (1.45 нг/мл). Причину этого феномена предстоит изучить в ходе дальнейшей работы.

#### Группа 2

У пациентов второй группы отсутствовала ВТБ. Содержание CGRP у них составило 0.15–0.32 нг/мл (среднее –  $0.26 \pm 0.02$  нг/мл), CP – 0.003–0.3 нг/мл (среднее –  $0.15 \pm 0.06$ ). В этой группе уровни нейропептидов были в 3–5 раз ниже, чем у больных с ВТБ. Установить какие-либо закономерности между значениями CGRP и CP у пациентов без тазовых болей не удалось.

#### Группа 3

У добровольцев отсутствовали указания на хронический болевой синдром любой локализации. Средние значения CGRP у них составили  $0.06 \pm 0.003$  нг/мл, CP –  $0.03 \pm 0.001$  нг/мл. Эти значения рассматривали как референтные, статистический анализ проводили с использованием этих показателей.

Корреляционный анализ выявил сильную взаимосвязь между уровнями CGRP и ВТБ ( $r = 0.82$ ) и среднюю – между значениями CP и тазовой болью в первой группе больных. Значения относительного риска формирования ВТБ при повышении уровня CGRP в первой группе были в 19 раз выше, чем во второй ( $RR = 19.19$ ; 95% ДИ: 2.78–132.35), что свидетельствует о прямой взаимосвязи между ВТБ и содержанием CGRP. Во второй группе столь очевидных взаимосвязей не выявлено.

Таблица 2. Выраженность ВТБ и содержание CGRP и CP в плазме крови в исследуемых группах

Показатель	Группа 1 (n = 18)	Группа 2 (n = 12)	p*	Группа 3 (n = 10)	p**
ВТБ, баллы	4.84 ± 0.43	0	-	0	-
CGRP, нг/мл	0.71 ± 0.11	0.26 ± 0.02	0.0004	0.06 ± 0.003	0.0001
CP, нг/мл	0.42 ± 0.18	0.15 ± 0.06	0.166	0.03 ± 0.001	0.05

\*Сравнение групп 1 и 2. \*\*Сравнение групп 2 и 3.

В табл. 2 представлены интенсивность ВТБ и результаты определения содержания CGRP и CP в исследуемых группах.

Выявлены статистически значимые различия в уровнях CGRP в плазме крови пациентов первой и второй групп. Различия в содержании CP плазмы крови в этих группах статистически недостоверны. Вместе с тем, очевидна тенденция к росту этого показателя у пациентов с ВТБ. Значения CGRP и CP в третьей группе значимо ниже, чем во второй, что, вероятно, свидетельствует о том, что сам факт существования варикозных вен таза вне зависимости от наличия или отсутствия болевого синдрома может сопровождаться увеличением содержания этих нейропептидов.

Еще в 1985 году Fischer и Vorn отметили выраженные сердечно-сосудистые эффекты CGRP (вазодилатация, гипотензия, положительное хронотропное и инотропное действие на сердце) при его внутривенном введении [20]. CGRP широко распространен в периферической и центральной нервной системе, а его рецепторы представлены в проводящих путях болевой чувствительности и обычно колокализуются с другими нейропептидами, включая вещество P [21]. Рецепторы к CGRP и CP обнаружены и во внутритазовых венах женщин [17, 22]. Установлено высокое содержание CP в эндотелиальных клетках вен яичника и усиление тазовой боли при внутривенном введении CGRP пациентам с СТВП. Это, в свою очередь, стало веским доводом в пользу изучения влияния этих нейротрансмиттеров на формирование ВТБ у больных СТВП. Обследование женщин с венозной тазовой болью, обусловленной СТВП, и здоровых добровольцев выявило существенные различия, а именно, усилие боли у женщин с СТВП и отсутствие какой-либо реакции у здоровых людей при внутривенном введении CGRP [17]. По мнению Stones [22], возникновение тазовой боли при СТВП обусловлено не столько расширением вены, сколько формированием нейрогенного воспаления. Автор сравнивает мигрень, при которой головные боли возникают на фоне сосудистых нарушений, с развитием болевого синдрома при нарушении венозного оттока из тазовых органов.

Результаты определения уровней CGRP и CP в плазме крови в группах больных с расширением внутритазовых вен и рефлюксом крови указывают на существование тесной взаимосвязи между уровнями этих нейропептидов и тазовой болью. Это, в определенной мере, служит косвенным подтверждением теории веноспецифического воспаления, возникающего на фоне варикозной трансформации вен и сопровождающегося гипоксией стенки вены, которую следует рассматривать в качестве повреждающего агента, способствующего формированию нейрогенного воспаления в стенке вены. Вероятно, застой крови во внутритазовых венозных сплетениях и формирующаяся тазовая венозная гипертензия вызывают активацию каскада патологических реакций, сопровождающихся активацией эндотелиоцитов и дегрануляцией тучных клеток. Не исключено, что эти процессы генерируют повышение синтеза CGRP и CP в периваскулярных ганглиях, которые ответственны за развитие нейрогенного воспаления венозной стенки и возникновение ВТБ.

На сегодняшний день отсутствуют референтные значения CGRP и CP у здоровых людей. Имеющиеся данные разноречивы, некоторые из них свидетельствуют об отсутствии этих веществ в плазме здоровых людей, другие утверждают, что концентрация CGRP в норме колеблется от 2 до 36 пмоль/л, а CP не превышает 0.1–0.19 нг/мл [23–25]. По данным нашего исследования концентрация CGRP и CP у добровольцев женского пола не превышает 0.06 ± 0.003 и 0.03 ± 0.001 нг/мл соответственно. Вместе с тем, следует учитывать различия в тест-системах, использованных в разных работах. Полученные результаты, свидетельствуют о целесообразности и перспективности этого направления научного поиска.

Следует отметить, что CGRP и CP – лишь два вазоактивных нейропептида, содержание которых определено у пациентов с венозной тазовой болью. Между тем, процесс формирования болевого синдрома при СТВП включает активацию целого спектра нейротрансмиттеров и альгогенов (нейрокинин А, эндотелины, простагландины, оксид азота, интерлейкин-1, фактор некроза опухоли-α и др.). В част-

ности, по мнению Agu и соавт. [26] и Yang и соавт. [27], снижение экспрессии эндотелина-1 в сочетании с уменьшением количества рецепторов эндотелина-1 служит фактором снижения вазоконстрикторной активности вен и формирования их варикозной трансформации. Показано, что у женщин с хроническим заболеванием вен прием микронизированной очищенной фракции флавоноидов приводит к повышению уровня эндотелина-1 на фоне снижения концентрации фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), что косвенно указывает на участие эндотелина-1 в регуляции венозного тонуса [28]. Эти данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения нейробиологических причин венозной тазовой боли, что позволит оценить воздействие других белковых соединений на патологические процессы в стенке вены.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия CGRP и CP в плазме крови высоко коррелирует с наличием венозной тазовой боли. Эти

нейропептиды играют, по-видимому, существенную роль в процессе формирования болевого синдрома у пациентов с синдромом тазового венозного полнокровия. Высокое содержание CGRP и CP при ВТБ, резистентной к традиционной флеботропной терапии, может служить показанием к применению блокаторов этих нейротрансмиттеров при такой форме заболевания. ●

*Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Разработка инновационных технологий профилактики и лечения хирургических заболеваний, связанных с нарушением кровообращения и гипоксией» (№ 01201254811) Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (РНИМУ) и Программы фундаментальных исследований (тема 65.1) Института медико-биологических проблем (ИМБП).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Howard F.M. // Obstet. Gynecol. 2003. V. 101. № 3. P. 594–611.
- Champaneria R., Shah L., Moss J., Gupta J.K., Birch J., Middleton L.J., Daniels J.P. // Hlth Technol. Assess. 2016. V. 20. № 5. P. 1–108.
- Latthe P., Latthe M., Say L., Gulmezoglu M., Khan K.S. // BMC Public Hlth. 2006. V. 6. № 177. P. 1–7.
- Mathias S.D., Kuppermann M., Liberman R.F., Lipschutz R.C., Steege J.F. // Obstet. Gynecol. 1996. V. 87. P. 321–327.
- Riding D.M., Hansrani V., McCollum C. // Vasc. Hlth Risk Manag. 2017. V. 27. № 13. P. 439–447.
- Belenky A., Bartal G., Atar E., Bachar G.N. // Am. J. Roentgenol. 2002. V. 179. P. 625–627.
- Ignacio E.A., Dua R., Sarin S., Harper A.S., Yim D., Mathur V., Venbrux A.C. // Semin. Intervent. Radiol. 2008. V. 25. P. 361–368.
- Meneses L.Q., Uribe S., Tejos C., Andia M.E., Fava M., Irrarazaval P. // Phlebology. 2011. V. 26. № 4. P. 157–161.
- Fassiadis N. // Int. Angiol. 2006. V. 25. № 1. P. 1–3.
- Hansrani V., Morris J., Caress A.L., Payne K., Seif M., McCollum C.N. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2016. V. 196. P. 21–25.
- Danziger N. // J. Mal. Vasc. 2007. V. 32. № 1. P. 1–7.
- Mansilha A., Sousa J. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 6. P. 1669.
- Phillips D., Deipolyi A.R., Hesketh R.L., Midia M., Oklu R. // J. Vasc. Interv. Radiol. 2014. V. 25. № 5. P. 725–733.
- Dos Santos S.J., Holdstock J.M., Harrison C.C., Lopez A.J., Whiteley M.S. // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2015. V. 49. № 1. P. 90–94.
- Гаврилов С.Г., Москаленко Е.П., Каралкин А.В., Лебедев И.С., Сон Д.А., Турищева О.О. // Флебология. 2017. Т. 11. № 1. С. 28–31.
- Kindgen-Milles D., Arndt J.O. // Pain. 1996. V. 64. P. 139–142.
- Stones R.W., Thomas D.C., Beard R.W. // Clin. Auton. Res. 1992. V. 2. № 5. P. 343–348.
- Gyftopoulos K., Chondrogianni C., Papadaki H. // Fertil. Steril. 2011. V. 95. № 8. P. 2554–2556.
- Kee Z., Kodji X., Brain S.D. // Front. Physiol. 2018. V. 19. № 9. P. 1249.
- Fischer J.A., Born W. // Peptides. 1985. V. 6. P. 265–271.
- Schou W.S., Ashina S., Amin F.M., Goadsby P.J., Ashina M. // J. Headache Pain. 2017. V. 18. № 1. P. 34.
- Stones R.W., Loesch A., Beard R.W., Burnstock G. // Obstet. Gynecol. 1995. V. 85. № 2. P. 273–278.
- Stevenson J.C., MacDonald D.W.R., Warren R.C., Booker M.W., Whitehead M.J. // Br. Med. J. 1986. V. 293. P. 1329–1330.
- Schifter S. // Peptides. 1991. V. 12. № 2. P. 365–369.
- Левченко М.В., Орлов В.И., Светличная С.В. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2008. № 3. С. 5–8.
- Agu O., Hamilton G., Baker D.M., Dashwood M.R. // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2002. V. 23. № 2. P. 165–171.
- Yang L., Qi G.Y., Cao Y.X., Liu J., Zhao M. // Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2008. V. 46. № 17. P. 1325–1328.
- Pietrzycka A., Kózka M., Urbanek T., Stpniewski M., Kucharzewski M. // Curr. Vasc. Pharmacol. 2015. V. 13. № 6. P. 801–808.