

ПРОЦЕССЫ ЦИТОКИН- И НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ НАРУЖНОМ ГЕНИТАЛЬНОМ ЭНДОМЕТРИОЗЕ, АССОЦИИРОВАННЫМ С БЕСПЛОДИЕМ

Е.Е. Привалова, С.Н. Теплова, Б.И. Медведев, Л.Ф. Зайнетдинова
ЧГМА, г. Челябинск

Установлено достоверное повышение количества цитокинов (VEGF, EGF и IL-12) и уровня конечных стабильных метаболитов оксида азота в циркуляции у женщин репродуктивного возраста при наличии наружного генитального эндометриоза, ассоциированного с бесплодием. В перитонеальной жидкости установлено трехкратное достоверное увеличение уровня факторов роста (VEGF, EGF) без существенного подъема количества IL-12. Выявлена утрата негативной сильной корреляционной связи между уровнями эпидермального фактора роста в крови и количеством IL-12, характерной для здоровых женщин, и появление корреляционных связей, отсутствующих в физиологических условиях.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, бесплодие, васкулоэндотелиальный фактор роста, эпидермальный фактор роста, интерлейкин-12, оксид азота.

Введение. Эндометриоз относится к распространенным заболеваниям женской половой системы, занимая третье место в структуре гинекологической патологии после воспалительных процессов и миомы матки. В 30–60 % случаев эндометриозу сопутствует бесплодие, что определяет важное медико-социальное значение данной проблемы [1–4].

До настоящего времени неизвестно, почему часть отторгнутых клеток эндометрия сохраняет не только свою жизнеспособность и активность, но и способность к имплантации и пролиферации вне полости матки. Недостаточно изучены молекулярно-биологические аспекты эндометриоза, которые по своим особенностям относятся к аномалиям роста клеток.

Одним из интенсивно развиваемых направлений изучения проблемы эндометриоза является обоснование значимости особенностей иммунного ответа на эктопическое разрастание ткани эндометрия. У женщин с эндометриозом увеличено содержание перитонеальных макрофагов [5], усилена их биохимическая и секреторная активность [7, 8], а в самой перитонеальной жидкости повышено содержание провоспалительных цитокинов. На этом основании предполагается, что гиперактивация перитонеальных макрофагов с последующим усилением продукции ими провоспалительных цитокинов и ростовых факторов создает в перитонеальной полости условия, благоприятные для развития эндометриозидных гетеротопий [5, 8]. В развитие иммунологической гипотезы патогенеза эндометриоза нами было предпринято изучение некоторых патогенетически значимых факторов контроля клеточного роста и характера иммунного ответа на системном и локальном уровнях у женщин с эндометриозом.

Цель исследования: анализ процессов системной и локальной цитокин- и нитроксида-регуляции у женщин с наружным генитальным эндометриозом, ассоциированным с бесплодием, для выявления их значимости в патогенезе гетеротопического роста эндометрия.

Материалы и методы. Нами обследовано 24 женщины, госпитализированных для манипуляционной лапароскопии по поводу бесплодия. Из них в 1-ю группу вошли 12 пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) и бесплодием. Вторую группу составили 12 женщин с бесплодием и без признаков НГЭ. Третья (контрольная) группа включала 10 здоровых фертильных женщин. Средний возраст пациенток 1-й группы составил $32,40 \pm 1,74$, 2-й группы $32,80 \pm 1,09$ года. На момент обследования женщины не получали медикаментозную терапию.

Классификацию эндометриоза на 1–4-й стадии заболевания проводили в соответствии с предложениями Американского общества фертильности (R-AFS, 1985), учитывающих локализацию, площадь, глубину поражения, наличие спаечного процесса.

Материалом для исследования служила перитонеальная жидкость (ПЖ), взятая во время лапароскопии, и сыворотка крови.

Определяли уровень васкулоэндотелиального (VEGF) и эпидермального (EGF) факторов роста с помощью твердофазного иммуноферментного метода с тест-системами производства компании Cytimmune (Maryland). В системе использованы мышинные моноклональные и биотинилированные кроличьи античеловеческие антитела против VEGF и EGF. Чувствительность тест-системы VEGF 18,6 пг/мл, а EGF – 8,3 пкг/мл. Учет реакции проводили

на планшетном фотометре «Multiscan plus» (Lab-system) при длине волны 490 нм.

Уровень интерлейкина-12 (IL-12) определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа с тест-системой Biosource International Inc., при длине волны 450 нм, чувствительность тест-системы составляет 2 пк/мл.

Уровень продукции эндогенного оксида азота (NOx) оценивали по концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота (нитритов, нитратов и суммарным продуктам) с помощью модифицированной реакции Griess (Коробейникова Э.Н., 2002).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета прикладных программ StatSoft Statistica v6.0. Результаты представлены в табл. 1, 2 в виде средней и ошибки средней ($M \pm m$). Различия между группами оценивали по непараметрическим критериям Манна-Уитни (при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. При анализе жалоб пациенток с наружным генитальным эндометриозом, ассоциированным с бесплодием (1-я группа), было выявлено наличие хронической тазовой боли у 100 % женщин, в то время как у пациенток с бесплодием без НГЭ (2-я группа) только в 25 % случаев. При анализе гинекологического анамнеза были установлены следующие особенности: наличие миомы матки в 1-й группе у половины женщин, во 2-й – у 12 %, спаечный процесс был выявлен у 75 и 33 % женщин соответственно. У всех женщин 1-й и 2-й группы были обнаружены хронические воспалительные процессы верхних или нижних отделов полового тракта в неактивной стадии. Значимых различий в уровне половых гормонов между группами сравнения выявлено не было, в 1-й и 2-й группах выявлены признаки недостаточности лютеиновой фазы (17 и 8 %) , гиперандрогения (25 % в каждой из групп).

Согласно классификации R-AFS у женщин 1-й группы 1-2 стадия НГЭ была выявлена в 58 % случаев ($n = 7$), 3-4 стадия – в 42 % случаев ($n = 5$).

В соответствии с целями исследования у женщин обеих групп были определены в сыворотке крови и перитонеальной жидкости цитокины, оказывающие регулирующее влияние на процессы роста клеток и ангиогенеза. В качестве фактора роста эпителиальных клеток нами определен уровень EGF в биологических жидкостях. Выбор факторов роста для исследования определялся тем, что эпителиальный фактор роста имеет принципиальное значение в контроле роста клеток эндометрия. При взаимодействии фактора с его рецептором EGF стимулирует процессы внутриклеточного фосфорилирования белков и тем самым способствует росту и пролиферации клетки-мишени. EGF участвует в контроле роста эпителиоцитов как в условиях нормы, так и при опухолевых процессах. VEGF является митогеном для клеток эндотелия и влияет на процессы неопластического роста эпителиоцитов. Человеческий интерлейкин-12 (IL-12) секретируется активированными антиген-представля-

ющими клетками (в частности, макрофагами) при их примировании антигенами, патоген – ассоциированными молекулами и молекулами, ассоциированными с повреждением собственных клеток, что приводит к инициации T-helper-1 (Th1) иммунного ответа. IL-12 действует как ростовой фактор T- и NK-клеток, является ключевым цитокином в развитии Th1 лимфоцитов, индуцирует апоптоз, ингибирует ангиогенез. IL-12 усиливает цитотоксичность макрофагов, дефицит его продукции макрофагами может значительно снижать противоопухолевую активность клеток.

Оксид азота относится к универсальным внутриклеточным мессенджерам. Активными продуцентами его являются эндотелиоциты, макрофаги, газообразное состояние мессенджера определяет не только его внутриклеточное действие, но и регулирующие объемные эффекты, включающие вазодилатацию, инициацию воспалительного процесса и апоптоза клеток. Данные о содержании цитокинов в изучаемых биологических жидкостях представлены в табл. 1.

При анализе табл. 1 видно, что у пациенток с НГЭ уровни VEGF и EGF в сыворотке крови максимальны в сопоставлении с показателями группы контроля и группы женщин без НГЭ, что подтверждает вероятную роль обоих факторов роста в процессе гетеротопического расселения клеток эндометрия. Локально на уровне перитонеальной жидкости у женщин 1-й и 2-й групп выявляются достоверные различия содержания изучаемых факторов роста с существенным превалированием VEGF и EGF у женщин с бесплодием, ассоциированным с наружным генитальным эндометриозом.

При сопоставлении содержания EGF в сыворотке крови и перитонеальной жидкости в каждой из групп пациенток четко выявляется более высокое содержание данного фактора роста на локальном уровне, в перитонеуме. Уровень эпидермального фактора роста в перитонеальной жидкости в 1-й группе превышал уровень сывороточного EGF семикратно и составило 455 пг/мл против 65 пг/мл в сыворотке крови. Во 2-й группе это превышение было всего трехкратным (98 и 32 пг/мл соответственно).

Анализ количества IL-12 в биологических жидкостях пациенток с бесплодием был предпринят нами в связи с предполагаемым значением данного цитокина в инициации клеточного иммунного ответа на эктопическое развитие эндометриальной ткани. Как следует из табл. 1, никаких различий в уровне этого цитокина, определяющего Th1 поляризацию иммунного ответа, между 1-й и 2-й группами не установлено, не выявлено также различий по содержанию этого интерлейкина в сыворотке крови у женщин контрольной группы. Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии усиления продукции IL-12 антиген-представляющими клетками крови и перитонеальной полости на эктопический рост эндометрия, что свидетельствует об отсутствии условий не только для Th1-поляризации иммунного ответа, но и для эффекта понижающей регуляции IL-12 в отношении факторов неопластического ангиогенеза.

Уровень цитокинов в биологических жидкостях у обследованных женщин (М ± m)

Показатель		1	2	3	p
		Группа с НГЭ	Группа сравнения	Группа здоровых	
VEGF	Сыворотка	32,67 ± 7,06	15,4 ± 2,44	10,46 ± 0,46	p ₁₋₂ = 0,02 p ₁₋₃ = 0,04
	Перитонеальная жидкость	43,80 ± 8,21	14,30 ± 1,72	–	p ₁₋₂ = 0,0003
EGF	Сыворотка	57,85 ± 7,93*	33,77 ± 4,87*	25,42 ± 4,39	p ₁₋₂ = 0,02 p ₁₋₃ = 0,0036
	Перитонеальная жидкость	459,72 ± 72,56*	102,15 ± 10,00*	–	p ₁₋₂ = 0,00008
IL-12	Сыворотка	63,17 ± 22,97	34,94 ± 7,38	33,41 ± 8,54	–
	Перитонеальная жидкость	50,40 ± 14,50	51,60 ± 11,78	–	–
NOx	Сыворотка	27,53 ± 2,26	32,21 ± 4,46	16,66 ± 2,80	p ₁₋₃ = 0,035 p ₂₋₃ = 0,05
	Перитонеальная жидкость	27,66 ± 3,25	25,67 ± 2,68	–	–

Примечание: p₁₋₂, p₂₋₃, p₁₋₃ – достоверность различий между сравниваемыми группами; * – достоверность различий между уровнем фактора в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости.

При определении содержания терминальных стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови у пациенток 1-й и 2-й групп выявлено увеличение уровня суммарного количества метаболитов в обеих группах в сравнении со здоровыми женщинами. Достоверных различий по содержанию NOx в перитонеальной жидкости между 1-й и 2-й группами не выявлено, что позволяет рассматривать существенный и одинаково выраженный рост уровня конечных метаболитов азота в крови у пациенток в сопоставлении с контрольной группой здоровых женщин и одинаковый уровень NOx в перитонеальной жидкости у пациенток 1-й и 2-й групп с бесплодием как результат нарушения процессов нитроксидергической регуляции при неактивном хроническом воспалении, выявленном в обеих группах.

Для определения патогенетической роли нарушений цитокин- и нитроксидергической регуляции при бесплодии, ассоциированном с НГЭ и без проявлений эндометриоза, проведен анализ корреляционных взаимосвязей между уровнями отдельных изучаемых регуляторных молекул у пациенток с НГЭ 1-2 ст. и 3-4 степени, во 2-й и 3-й группах, результаты анализа приведены в табл. 2. Из таблицы следует, что у здоровых женщин и в группе сравнения (у женщин с бесплодием и хроническим неактивным воспалением в эндометрии без признаков НГЭ) достоверных положительных корреляционных связей между изучаемыми цитокинами и количеством NOx в крови не выявляется. У здоровых женщин установлена лишь одна отрицательная сильная достоверная корреляционная связь (–0,95)

между уровнями IL-12 и EGF, что позволяет предполагать в физиологических условиях понижающее регуляторное действие на продукцию эпидермального ростового фактора высоких концентраций IL-12 и повышающее действие низких концентраций цитокина. Не исключено, что, напротив, у здоровых женщин увеличение количества EGF тормозит продукцию IL-12 и тем самым инициацию клеточного иммунного ответа, а снижение уровня EGF оказывает противоположный, повышающий эффект на продукцию интерлейкина. Интерпретация полученного факта может быть различной, однако он однозначно свидетельствует о реципрокных отношениях в физиологических условиях между уровнями эпидермального фактора роста и интерлейкином, инициирующим Th1-зависимый иммунный ответ.

При эндометриозе 1-2 ст. и 3-4 ст. и наличии достоверного роста в крови уровней VEGF, EGF и NOx появляются иные, чем у здоровых женщин, достоверные и сильные связи между цитокинами. Так, какие-либо достоверные корреляционные связи между уровнями EGF и IL-12 в крови при 1-2 и 3-4 стадиях эндометриоза утрачиваются, что свидетельствует об отсутствии эффекта измененных концентраций эпидермального фактора роста в отношении запуска Th1-зависимого иммунного ответа при НГЭ, что было характерно для здоровых женщин. Результаты корреляционного анализа с большей долей вероятности дают основания для утверждения значимости для патогенеза развития НГЭ нарушения петли обратной связи между измененными концентрациями факторов роста и IL-12.

Таблица 2

Характер корреляционных связей между уровнями цитокинов и NOx в крови и перитонеальной жидкости при эндометриозе в группе сравнения и у здоровых женщин (метод Спирмена)

Корреляционная пара	Эндометриоз 1-2 ст.	Эндометриоз 3-4 ст.	Группа сравнения	Здоровые женщины
IL-12/ EGF (сыворотка)	–	–	–	–0,95 (метод Пирсона)
VEGF/ EGF (перитонеальная жидкость)	–	–0,90	–	–
NOx/EGF (перитонеальная жидкость)	0,90	–	–	–
NOx/VEGF (сыворотка)	0,86	–	–	–
NOx/IL-12 (перитонеальная жидкость)	–	0,90	–	–
Всего	2	2	0	0

При 3-4 ст. НГЭ обнаружена очень сильная отрицательная связь ($r = -0,9$) между двумя изучаемыми общими факторами роста: EGF и VEGF, что также подтверждает нарушение цитокинергической регуляции при тяжелых степенях эндометриоза на локальном уровне. Нарушение нитроксидазической регуляции при НГЭ отражает появление сильных позитивных связей при 1-2 ст. процесса между уровнем NOx, с одной стороны, и количеством VEGF и EGF – с другой, что делает правомочным предположение о повышающем регуляторном влиянии роста уровней оксида азота в отношении этих факторов. На этом основании можно также предполагать иницирующую роль повышения продукции оксида азота как универсального внутриклеточного мессенджера в нарушениях роста клеток эндометрия и эндотелия при НГЭ.

В 3-4 стадии НГЭ связи между уровнями NOx и изучаемыми факторами роста утрачиваются, но появляется сильная позитивная связь ($r = 0,9$) между уровнями NOx и IL-12 на локальном уровне, что в свете выявленной тенденции некоторого роста IL-12 при НГЭ, хотя и не достигающего степени статистической достоверности, позволяет предполагать, что при более выраженном распространении эктопического роста эндометрия продукция индуцибельного NOx усиливается, параллельно растет и продукция IL-12, что косвенно свидетельствует об усилении функции антигенпредставляющих клеток (в частности, макрофагов) при более тяжелых степенях НГЭ.

Таким образом, на основании исследований можно заключить, что формирование и эктопическое функционирование эндометриозидного «трансплантата» у женщин с бесплодием происходят на фоне существенных изменений характера цитокин- и нитроксидазической регуляции в организме пациенток в сопоставлении со здоровыми женщинами и пациентками с бесплодием, не имеющих признаков НГЭ.

Заключение. Для пациенток с бесплодием, ассоциированным с НГЭ, характерно достоверное повышение количества цитокинов (VEGF, EGF и IL-12) и повышение уровня конечных стабильных

метаболитов оксида азота в циркуляции. У пациенток с бесплодием, ассоциированным с НГЭ, в отличие от больных группы сравнения, не имеющих признаков эндометриоза, в перитонеальной жидкости выявлено трехкратное достоверное увеличение уровня факторов роста (VEGF, EGF) без существенного подъема количества IL-12. Проявлением нарушения цитокин- и нитроксидазической регуляции иммунного ответа при НГЭ является утрата негативной, сильной корреляционной связи между уровнями эпидермального фактора роста в крови и количеством IL-12, характерной для здоровых женщин, и появление корреляционных связей, отсутствующих в физиологических условиях.

Литература

1. Адамян, Л.В. Эндометриозы / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков // *Руководство для врачей.* – М.: Медицина. – 1998.
2. Баскаков, В.П. Эндометриозидная болезнь / В.П. Баскаков, Ю.В. Цвелев, Е.Ф. Кира. – СПб.: ООО «Издательство Н-Л», 2002.
3. Железнов, Б.И. Генитальный эндометриоз / Б.И. Железнов, А.Н. Стрижаков. – М.: Медицина. – 1985.
4. Иценко, А.И. Эндометриоз. Диагностика и лечение / А.И. Иценко, Е.А. Кудрина. – М.: Гэотар-Мед. – 2002.
5. Halme, J. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: Possible in the pathogenesis of endometriosis / J. Halme, S. Becker, S. Haskill // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1987. – V. 156, № 4. – P. 783–789.
6. Ho, H.W. Peritoneal cellular immunity and endometriosis / H.W. Ho, M.Y. Wu, Y.S. Yang // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1997. – V. 38, № 6. – P. 142.
7. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology / J.A. Kennan, T.T. Chen, N.L. Chadwell et al. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1994. – V. 32, № 3. – P. 180–183.
8. Immunobiology of endometriosis / J.A. Kennan, T.T. Chen, N.L. Chadwell et al. // *Ibid.* – 1995. – V. 34, № 6. – P. 381–385.

Поступила в редакцию 28 февраля 2009 г.