

ЛОКАЛЬНАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОК С НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ

**В статье представлены
собственные данные авторов,
полученные при исследовании
спектра и продукции некоторых
цитокинов эндометриозными
гетеротопиями в условиях
органотипического
культивирования,
в сопоставлении с секреторной
активностью клеток
перитонеального эксудата
и тканью эндометрия у женщин
с наружным генитальным
эндометриозом.
Выявленные соответствия
в изменении продукции
провоспалительных цитокинов
тканями эндометриозных
гетеротопий, эндометрия
и клетками перитонеального
эксудата могут
свидетельствовать о системных
изменениях регуляции
продукции цитокинов
в процессе развития НГЭ.**

Эндометриоз, по определению В. П. Баскакова [1], — опухолевидное гормонозависимое заболевание, сущность которого заключается в разрастании ткани, сходной по своему строению и функции с эндометрием, но находящейся за пределами границ нормального расположения слизистой оболочки матки, развивающееся на фоне нарушения иммунного гомеостаза.

По меткому выражению М. R. Cohen (1982) «Эндометриоз является почти эпидемией XX века от менархе до менопаузы».

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) не относится к классическим онкологическим заболеваниям, но представляет собой весьма удобную модель для изучения нарушений иммунитета при патологическом разрастании тканей, особенно эктопически расположенных.

Важная роль иммунитета в контроле пролиферации и дифференцировки клеток является одной из основных догм фундаментальной иммунологии. Это позволяет рассматривать неопластические процессы как результат «поломки» надзорных функций иммунной системы. Такие представления дают возможность не только улучшения диагностики, но и развития методов терапии, связанных с изменениями функций различных компонентов иммунной системы, определяющих противоопухолевый иммунитет. В этом плане большой интерес представляет изучение различных компонентов иммунной системы у больных эндометриозом. Исходя из предположения, что эндометриоз является заболеванием с нарушением «надзорных» функций иммунной системы [2], ранее нами были изучены изменения некоторых ос-

новных ее компонентов, определяющих противоопухолевый иммунитет. В частности было показано, что у больных НГЭ значительно снижены цитотоксическая активность НК-клеток и способность лимфоидных клеток к секретиции б/в и г-интерферонов.

Однако несмотря на несомненную важность определения системных изменений иммунитета, можно предполагать, что основное значение имеет местное взаимодействие компонентов иммунной системы и патологически измененных клеток. Именно в очаге локализации эндометриозных гетеротопий происходят те драматические события, которые определяют пути развития заболевания — или в сторону его прогрессирования, или в направлении регресса (лизирования имплантов). В этом плане огромное значение может иметь динамика и интенсивность продукции различных цитокинов в области разрастаний патологических очагов, а также клетками микроокружения.

Цитокины являются посредниками межклеточных взаимодействий, регулируют кроветворение, иммунный ответ, клеточный цикл в различных тканях, участвуют во многих физиологических и патологических процессах. Имеющиеся литературные данные относительно продукции цитокинов у больных НГЭ немногочисленны и противоречивы, что диктует необходимость дальнейшего изучения этой проблемы. Цитокины в первую очередь регулируют развитие местных компенсаторно-приспособительных реакций в тканях с участием различных клеток крови, эндотелия, соединительной ткани и эпителиев с формированием типичной воспалительной реакции [3].

Целью наших исследований было изучение спектра и интенсивности продукции некоторых цитокинов эндометриоидными гетеротопиями в условиях органо-типического культивирования, в сопоставлении с секреторной активностью клеток перитонеального экссудата и тканью эндометрия у женщин с наружным генитальным эндометриозом.

Материалы и методы исследований

Проведено обследование 34 пациенток с НГЭ в возрасте от 19 до 35 лет. Диагноз генитального эндометриоза у всех больных верифицирован при лапароскопии и подтвержден данными гистологического исследования. Степень распространения наружного генитального эндометриоза определялась в баллах по пересмотренной классификации Американского Общества Фертильности R-AFS [5], оценивающей

глубину инвазии, площадь эндометриоидных очагов и выраженность спаечного процесса.

Согласно этой классификации из 34 больных I степень НГЭ была диагностирована у 7 пациенток, II степень у 10, III степень у 8 и IV степень у 9 пациенток.

В контрольную группу вошли 15 здоровых женщин репродуктивного возраста, у которых была выполнена хирургическая стерилизация.

Во время лапароскопии были произведены заборы эндометриоидных гетеротопий, эндометрия и перитонеальной жидкости.

Для оценки локальной продукции цитокинов тканями проводилось органотипическое культивирование эндометриоидных гетеротопий и эндометрия. Использовалась методика J. Hirata [4] с нашими модификациями

Эндометриоидные гетеротопии и ткань эндометрия после получения незамедлительно поме-

щались в стерильный раствор Хэнкса, трижды отмывались стерильным раствором PBS и помещались в стерильную пробирку, содержащую 1 мл RPMI 1640 с 10% ЭТС и антибиотиками (100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Далее проводилась инкубация в CO₂ инкубаторе (при t = 37,0 °C, 5% CO₂) в течение 1,5 часов. Затем надосадочная жидкость удалялась, к ткани добавлялся 1 мл RPMI 1640 без ЭТС и помещался в CO₂-инкубатор на 24 часа. После этого супернатант отбирался и замораживался в стерильных полипропиленовых пробирках при t = -20 °C.

В полученных супернатантах эндометриоидных гетеротопий и эндометрия определяли содержание фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-1β (IL-1β), IL-2, IL-6 и IL-8. Концентрацию цитокинов в культуральных средах оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем для определения TNF («Biomar Diagnostic Systems»), IL-1β, IL-2, IL-6 и IL-8 («Протеиновый контур», Санкт-Петербург). Уровни указанных цитокинов также определены в перитонеальной жидкости, взятой во время проведения лапароскопии у больных НГЭ и для сравнения у женщин контрольной группы.

Результаты исследования

При анализе содержания цитокинов в супернатантах культур эндометриоидных гетеротопий были получены следующие результаты: наиболее высоким установлено содержание IL-8, которое составило в среднем 1360,7 пг/мг ткани. Значение IL-6 составило 326,6 пг/мг ткани. Содержание IL-1β, IL-2 и TNF в абсолютном выражении было невелико (рис. 1, 2).

Изменения содержания в зависимости от степени распространённости НГЭ выявлены в отношении IL-1β (рис. 3). Так, при I степени НГЭ уровень IL-1β составил 1,8 пг/мг, при НГЭ II сте-

Рисунок 1. Содержание IL-8 и IL-6 в супернатантах эндометриоидных гетеротопий

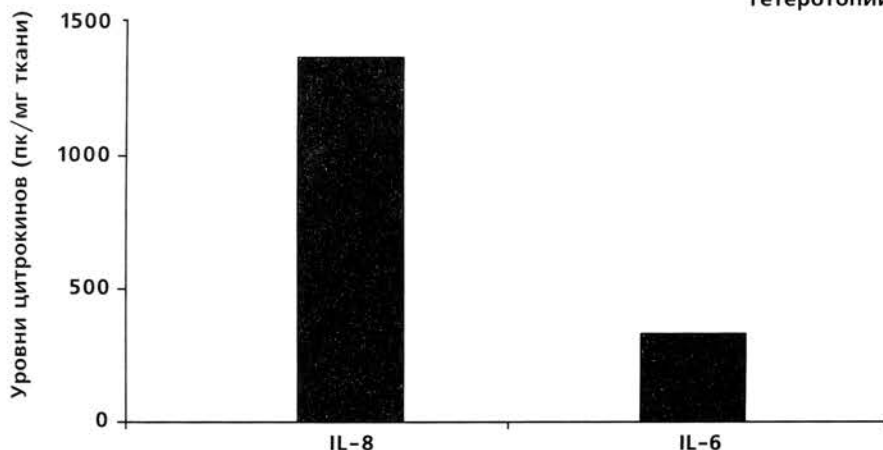
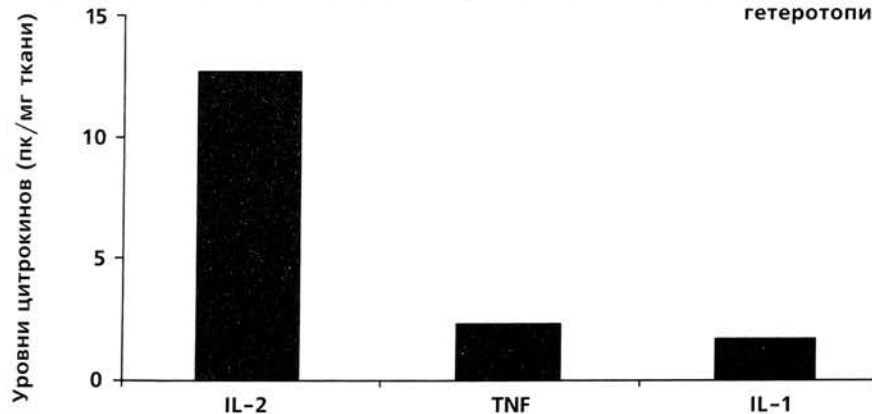


Рисунок 2. Содержание IL-2, TNF и IL-1β в супернатантах эндометриоидных гетеротопий



пени – 2,96 пг/мг, при НГЭ III степени – 8,4 пг/мг и при НГЭ IV степени – 6,18 пг/мг. IL-1 является одним из главных медиаторов, ответственных за развитие местной воспалительной реакции. Местная воспалительная реакция хотя и усиливается при переходе от «малых» форм НГЭ к более тяжелым, но, возможно, является недостаточной для регресса болезни.

Уровень IL-8 зависел от степени распространенности НГЭ и составил при I степени – 254,43 пг/мг, при II степени НГЭ – 910,7 пг/мг, при III степени НГЭ – 3059 пг/мг и при НГЭ IV степени – 789 пг/мг (рис. 4). Такое прогрессивное повышение выработки IL-8 от малых степеней НГЭ к более тяжелым, указывает на усиление пролиферативных процессов, так как именно IL-8 играет ключевую роль в пролиферативной активности эпителиальных клеток и ангиогенезе очага эндометриоза. В то же время снижение уровня IL-8 при IV степени НГЭ может свидетельствовать об уменьшении или истощении резервных секреторных возможностей иммунокомпетентных клеток.

Подобная динамика отмечалась и при определении уровня IL-6. Содержание IL-6 при НГЭ I степени составило 64 пг/мг, при НГЭ II степени – 311,8 пг/мг, при НГЭ III степени – 1029 пг/мг и при НГЭ IV степени – 613,2 пг/мг. На рис. 5 отражено, что наиболее высокие значения содержания IL-6 были отмечены при III и IV степенях НГЭ, что свидетельствует об усилении воспалительной реакции в эндометриоидном очаге при прогрессировании заболевания.

При определении содержания IL-2 показано его достоверное повышение, зависящее от степени тяжести заболевания (минимальное значение при I степени, максимальное при IV степени НГЭ). Так, значение IL-2 при НГЭ I степени составило 4,73 пг/мг, при НГЭ II степени – 6,8 пг/мг, при НГЭ III

Рисунок 3. Содержание интерлейкина-1 β в супернатантах эндометриоидных гетеротопий в зависимости от степени распространенности НГЭ

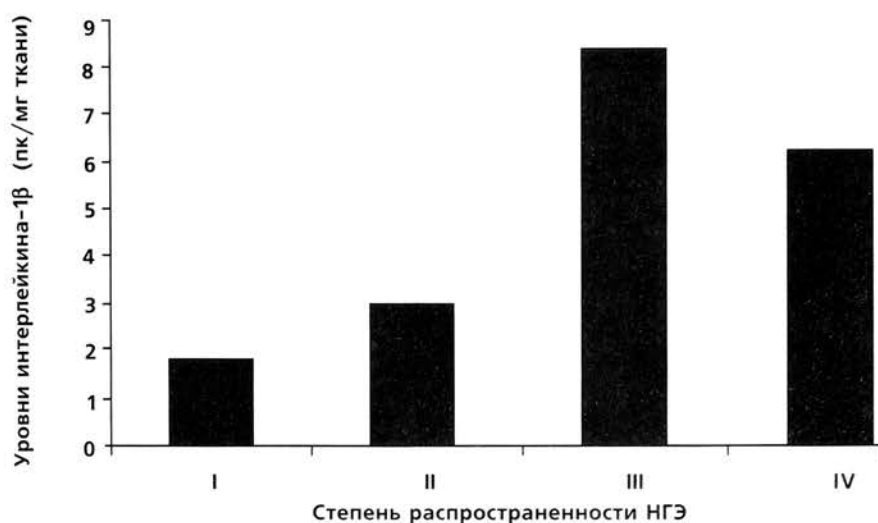


Рисунок 4. Содержание IL-8 в супернатантах эндометриоидных гетеротопий в зависимости от степени распространенности НГЭ

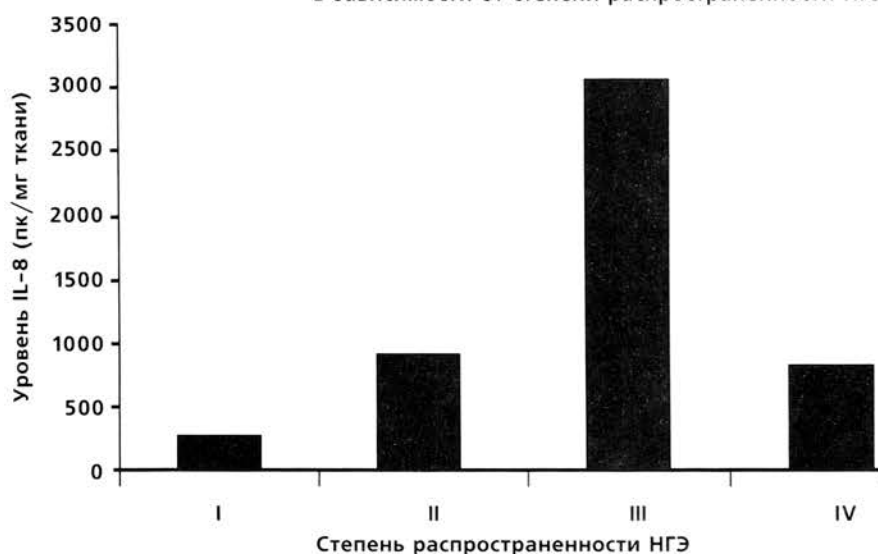


Рисунок 5. Содержание IL-6 в супернатантах эндометриоидных гетеротопий в зависимости от степени распространенности НГЭ

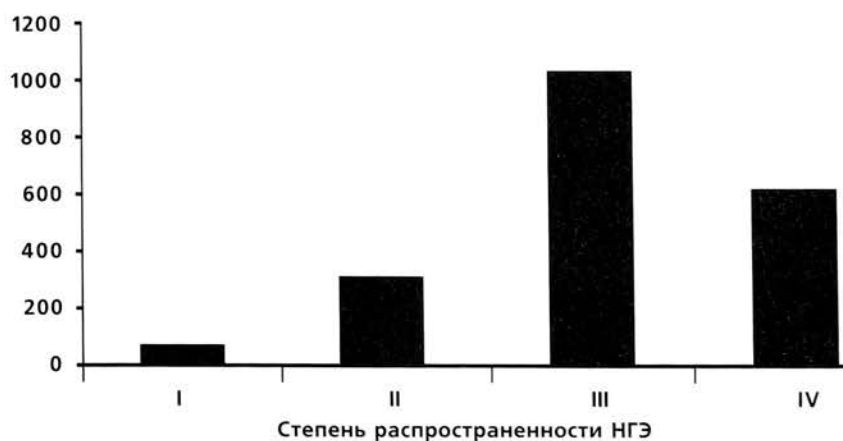


Рисунок 6. Содержание IL-2 в супернатантах эндометриоидных гетеротопий в зависимости от степени распространенности НГЭ

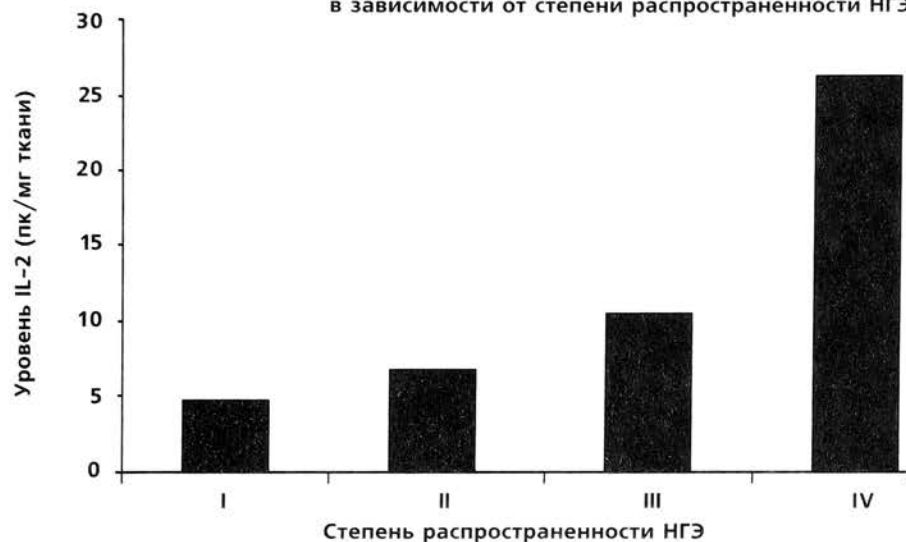


Рисунок 7. Содержание IL-8 и IL-6 в супернатантах эндометрия больных НГЭ

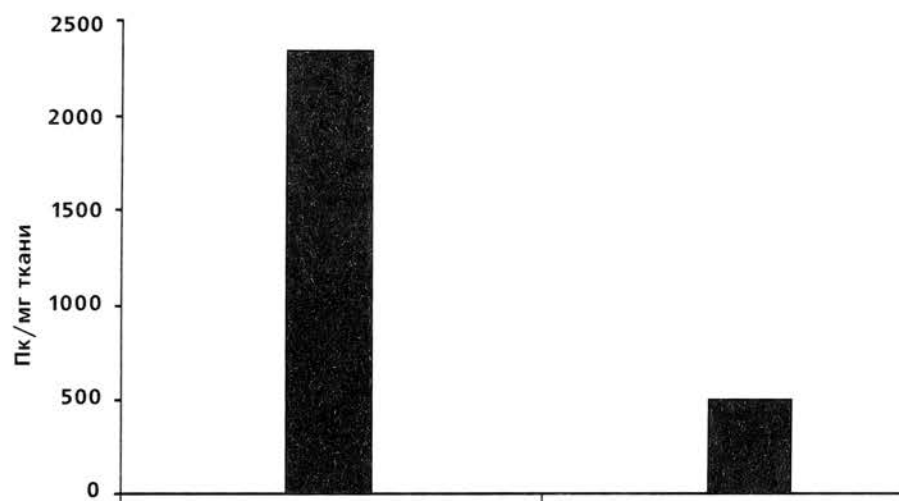
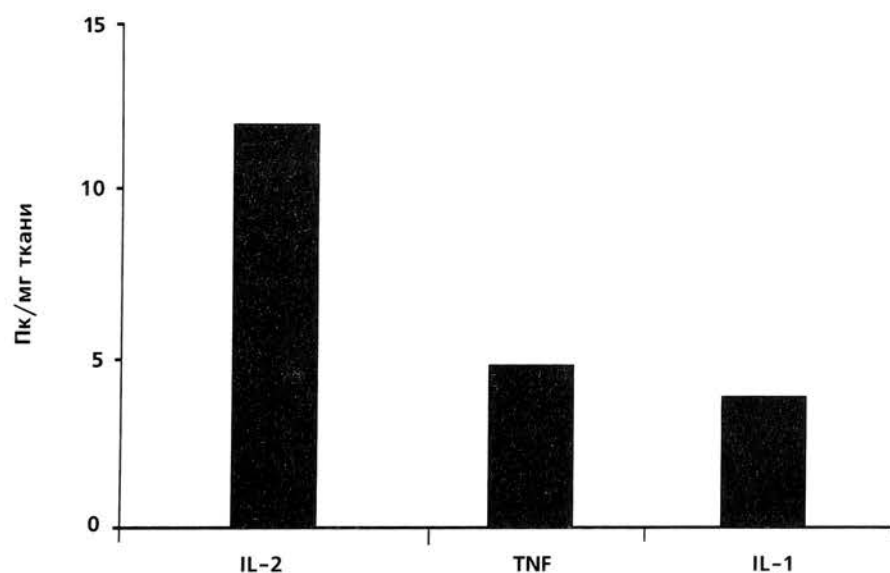


Рисунок 8. Содержание IL-2, TNF и IL-1 β в супернатантах эндометрия больных НГЭ



степени – 10,47 пг/мг и при НГЭ IV степени – 26,3 пг/мг. Прогрессивное возрастание продукции IL-2 в зависимости от степени распространенности НГЭ можно расценивать как защитную реакцию иммунной системы, так как основной биологический эффект IL-2 заключается в стимуляции лимфоцитов, обладающих цитотоксической активностью, усиление продукции IFN- γ и противоопухолевой активности.

Достоверных различий в содержании TNF у пациенток с различной степенью эндометриоза нами обнаружено не было. В среднем его содержание составило 2,31 пг/мг ткани.

С целью выявления соответствия продукции цитокинов эндометриоидными гетеротопиями и ткани эндометрия, произведено изучение цитокинового профиля ткани эндометрия больных НГЭ.

У всех женщин исследование проводилось во второй фазе менструального цикла. Так, максимальные значения установлены в отношении содержания IL-8 – 2340,5 пг/мг ткани. Выявлены различия в количественном содержании исследуемых цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF) в образцах эндометрия (рис. 6). Уровень IL-6 составил 463,2 пг/мг ткани, IL-2 – 11,8 пг/мг ткани, IL-1 β – 3,85 пг/мг и TNF – 4,66 пг/мг ткани (рис. 7, 8).

Среднее содержание IL-8 в супернатантах эндометрия от женщин, больных НГЭ, составило 2340,5 пг/мг, тогда как в контрольной группе 1287,66.

Среднее содержание IL-6 в супернатантах эндометрия составило 463,16 пг/мг, а в контрольной группе 172,04 пг/мг ткани (рис. 9).

Существенных различий в содержании IL-1 β , IL-2 и TNF в супернатантах эндометрия больных НГЭ и здоровых женщин отмечено не было (рис. 10).

При анализе образцов перитонеальной жидкости больных НГЭ и женщин контрольной группы, выявлены достоверные отличия в содержании IL-1 β , TNF, IL-6,

в то же время при сравнении уровней IL-2 и IL-8 больных НГЭ с аналогичными показателями контрольной группы, достоверных отличий выявлено не было (рис. 11, 12).

Интересно отметить, что концентрация IL-1 β в перитонеальной жидкости больных эндометриозом более чем в два раза превышала концентрацию IL-1 β в перитонеальной жидкости здоровых женщин.

Уровень TNF в перитонеальной жидкости больных эндометриозом превышал в 7 раз, а IL-6 в два раза по сравнению с аналогичными показателями здоровых женщин.

Обсуждение результатов исследования

При анализе полученных данных выяснено, что при развитии эндометриоза повышен уровень провоспалительных цитокинов как в перитонеальной жидкости, так и в строме эндометрия.

Возможно, определенную роль в прогрессировании эндометриоза играет IL-8, как важный ангиогенный фактор, способствующий васкуляризации эктопических эндометриальных внедрений.

При изучении зависимости концентрации IL-8 от степени распространенности процесса, выявлено его максимальное значение при III-ей степени заболевания, т. е. при переходе от начальной стадии в более тяжелую, при которой усиливаются пролиферативные процессы. В то же время снижение уровня IL-8 при IV степени НГЭ может свидетельствовать о снижении или истощении резервных секреторных возможностей иммунокомпетентных клеток.

При изучении уровня IL-8 в супернатантах эндометрия выявлено увеличение его концентрации в 2 раза в эндометрии женщин с генитальным эндометриозом по сравнению с эндометрием здоровых женщин. Возможно, именно стимулирующее действие IL-8 на адгезию клеток эндометрия к брюшине вносит вклад в возникновение эктопических очагов эн-

Рисунок 9. Содержание IL-8 и IL-6 в супернатантах эндометрия больных НГЭ и контрольной группы

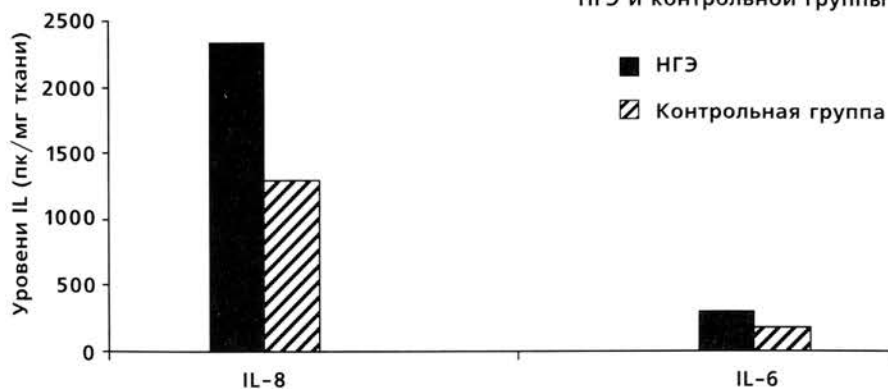


Рисунок 10. Содержание IL-1 β , IL-2 и TNF в супернатантах эндометрия больных НГЭ и контрольной группы

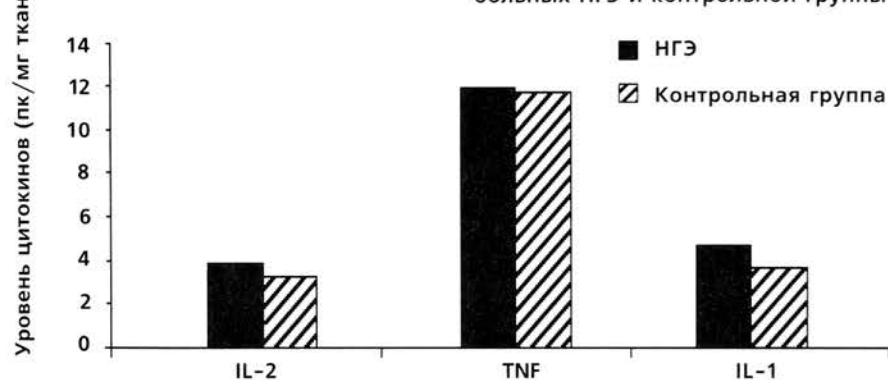


Рисунок 11. Содержание IL-1 β , IL-6 и IL-8 в перитонеальной жидкости больных НГЭ и контрольной группы

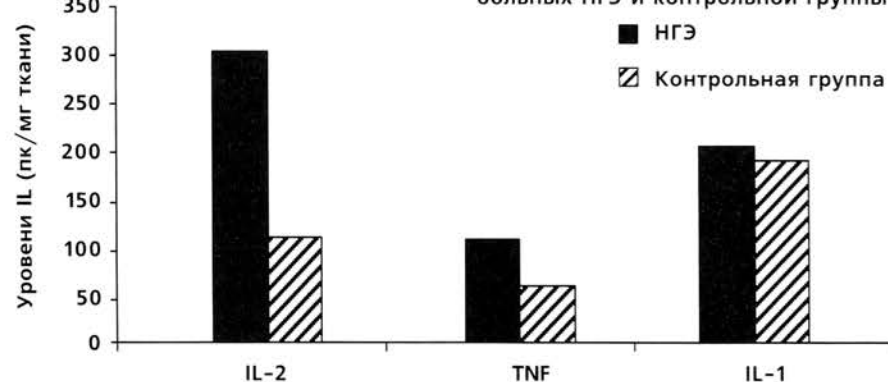
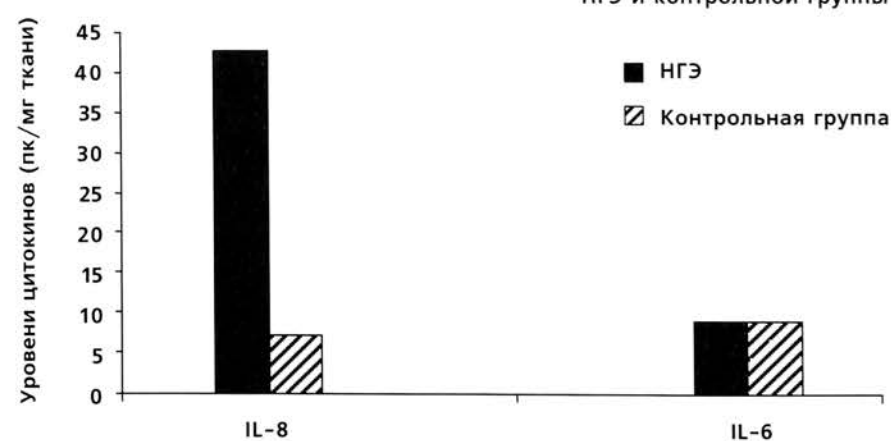


Рисунок 12. Содержание IL-2 и TNF в перитонеальной жидкости больных НГЭ и контрольной группы



дометрия, а изменение концентрации этого цитокина отражает выраженность пролиферативного процесса.

При анализе содержания IL-6 в супернатантах эндометриоидных гетеротопий также обращает на себя внимание его повышение в зависимости от степени распространения процесса. Известно, что IL-6 – мультифункциональный цитокин, регулирующий иммунный ответ, острофазную воспалительную реакцию. Этот цитокин отсутствует в сыворотке крови в нормальных физиологических условиях, но количество его резко повышается при многих иммунологических реакциях, воспалении или повреждении ткани. Максимальный уровень IL-6 установлен при III степени НГЭ. Можно предположить, что повышение IL-6 при переходе от «малых» форм (I и II степени НГЭ) к более тяжелым (III и IV степени) связано с усилением воспалительной реакции в ответ на повреждение. Парадоксальная реакция в отношении снижения продукции ИЛ-6 при переходе от III к IV степени распространения НГЭ также может быть объяснена достижением при III степени НГЭ максимальной активности клеток, продуцирующих IL-6, и истощением их компенсаторных возможностей при IV степени.

Повышение более чем в 2 раза продукции IL-1 β и TNF в перитонеальной жидкости больных НГЭ свидетельствует о высоком уровне активности моноклеарных фагоцитов (о достижении максимального уровня их активации).

Учитывая тот факт, что IL-6 является антагонистом IL-1 β и TNF, синхронное повышение продукции этих цитокинов можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на снижение уровня продукции провоспалительных цитокинов, попытку сохранения баланса в цитокиновой сети.

С нашей точки зрения, повышение продукции IL-6 иммуноком-

петентными клетками, участвующих в осуществлении воспалительной реакции и иммунного ответа в перитонеальной жидкости у больных НГЭ, можно расценивать как компенсаторную реакцию в ответ на повышение продукции TNF и IL-1 β .

Выявленные соответствия в изменении продукции провоспалительных цитокинов тканями эндометриоидных гетеротопий, эндометрия и клетками перитонеального экссудата могут свидетельствовать о системных изменениях регуляции продукции цитокинов в процессе развития НГЭ. Не совсем ясно, почему активированные макрофаги не фагоцитируют эндометриальные клетки, как в здоровом организме, а продолжают выделять интерлейкины, TNF, отсутствующие в таком большом количестве у здоровых женщин. По мнению Dmowski W.P. [6], «переключение» фагоцитарной активности на секреторную перитонеальных макрофагов зависит от «перегрузки» иммунной системы брюшной полости вследствие поступления большого количества эндометриальных клеток, или скорее является проявлением специфических нарушений клеточно-опосредованного иммунитета у больных эндометриозом.

При анализе содержания IL-2 в супернатантах эндометриоидных гетеротопий, отмечено прямое возрастание его концентрации в зависимости от тяжести заболевания. Такое повышение содержания IL-2 в очагах эндометриоза можно объяснить как защитную реакцию со стороны иммунной системы, направленную на стимуляцию главным образом функций Т-лимфоцитов и макрофагов, что приводит к развитию клеточного типа ответа. Однако отсутствие ожидаемого повышения уровня IL-2 в супернатантах эндометрия и перитонеальной жидкости больных НГЭ, может свидетельствовать о системных дефектах Т-клеточного звена иммунитета при эндометриозе.

Таким образом, изучение цитокинового профиля супернатантов эндометрия, эндометриоидных гетеротопий, а также перитонеальной жидкости больных НГЭ позволяет конкретизировать механизмы иммунных нарушений на локальном уровне при эндометриозе. Возможно, именно изменения местного иммунитета создают условия для возникновения и развития очагов эндометриоза.

Дальнейшие исследования в этой области позволят расширить диагностические возможности и выбрать необходимую патогенетически обоснованную терапию, в частности, с использованием генноинженерных аналогов естественных цитокинов.

Литература

1. Басаков В. П. Клиника и лечение эндометриоза. СПб., 1990.
2. Сельков С. А., Ярмолинская М. И., Григорьева В. В., Аникин В. Б., Ариненко Р. Ю., Селютин А. В. Состояние антипролиферативных механизмов иммунной системы при наружном генитальном эндометриозе. Вестник Росс. ассоциации акушеров-гинекологов. — 1997. — № 3. — С. 40–43.
3. Симбирцев А. С. Цитокины - новая система регуляции защитных функций организма // Цитокины и воспаление. — 2002. Том 1. — № 1. — С. 9.
4. Hirata J., Kikuchi Y., Imaizumi E. et al. Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors // gynecol. Obstet. Invest. — 1994. — Vol. 37. — P. 43–47.
5. The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis // Fertil. Steril. — 1985. — Vol. 43. — P. 351.
6. Dmowski W. P., Braun D. P., Gebel H. Manipulation of the immune system in endometriosis // The current status of endometriosis. Research and management / Ed. I. Brosens and J. Donnez. — N.-Y.: Parthenon Publishing Group Ltd., 1993. — P. 257–268.