

УДК 618.145.–007

© Коллектив авторов, 2013.

ЗНАЧЕНИЕ НАРУШЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ И ЛИПИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

В. А. Линде, Н. В. Ермолова, Л. В. Колесникова, А. В. Ширинг, К. В. Слесарева, Н. Н. Скачков, И. В. Маркарян, Л. Р. Томай

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России (директор – профессор В. А. Линде); 344012, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43; E-mail: secretary@rniiar.ru

THE ROLE OF DISORDER IN PRODUCTION OF CYTOKINES AND LIPIDS IN FORMATION OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

V. A. Linde, N. V. Ermolova, L. V. Kolesnikova, A. V. Shiring, K. V. Slesareva, N. N. Skachkov, I. V. Markaryan, L. R. Tomay

SUMMARY

74 patients with external genital endometriosis (EGE) and 22 women without it were examined from 2010 to 2012 to study mechanisms of pathogenesis and improve methods of diagnosis, treatment and rehabilitation of patients with EGE. The research engaged ultrasound, endovideosurgery, histology, determination of growth factors, lipoproteins, endothelial factors in blood serum and in peritoneal fluid (PF). At stages I-II, EGE processes occur due to high content of TGF β 1, NO metabolites and HDL in blood serum, and the increase of free cholesterol concentration, high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL) in PF. At stages III-IV, EGE are characterized by high content of HDL and TNF α with anti-inflammatory properties in blood serum and by increased content of TGF β 1 and metabolites of NO and NO synthase in PF. The changes revealed in the lipid spectrum, growth factors and angiogenic substances interrelation could be a theoretical justification of additional medical actions to normalize metabolism in patients with EGE.

ЗНАЧЕННЯ ПОРУШЕННЯ ПРОДУКЦІЇ ЦИТОКІНІВ І ЛІПІДІВ У ФОРМУВАННІ ЗОВНІШНЬОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРИОЗУ

В. А. Лінде, Н. В. Єрмолова, Л. В. Колесникова, О. В. Ширінг, К. В. Слесарева, М. М. Скачков, І. В. Маркарян, Л. Р. Томай

РЕЗЮМЕ

Було перевірено 74 хворих із зовнішнім генітальним ендометріозом (ЗГЕ) і 22 жінки без нього з 2010 по 2012 рр. для вивчення механізмів патогенезу і вдосконалення методів діагностики, лікування та реабілітації хворих з ЗГЕ. Було використано ультразвукове дослідження, ендовідеохірургія, гістологія, визначення факторів зростання, ліпопротеїни, ендотеліальні фактори у сироватці крові і в перитонеальній рідині (ПР). У стадії I-II ЗГЕ процеси відбуваються через високий вміст TGF β 1, NO метаболітів і ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) у сироватці крові та збільшення концентрації вільного холестерину, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) у ПР. Етапи III-IV ЗГЕ характеризуються високим вмістом ЛПВЩ і TNF α з протизапальними властивостями в сироватці крові та підвищеним вмістом TGF β 1 і метаболітів NO і NO-синтази в ПФ. Виявлено зміни в ліпідному спектрі, факторах росту і ангіогенних субстанціях, взаємозв'язок цих речовин може служити теоретичним обґрунтуванням додаткових лікувальних заходів для нормалізації обміну речовин у пацієнтів з ЗГЕ.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, липопротеины, оксид азота, трансформирующий фактор роста бета 1, фактор некроза опухоли альфа.

Эндометриоз – хроническое гинекологическое заболевание, главными клиническими проявлениями которого являются персистирующая боль и бесплодие – представляет доброкачественное разрастание вне полости матки ткани, по морфологическим и функциональным свойствам подобной эндометрию [3, 9].

15,0-70,0% менструирующих женщин репродуктивного возраста страдают этим заболеванием [3, 7] и до 50,0% женщин обследуются по поводу бесплодия [6]. До настоящего времени нет четкого понимания этиологии и патофизиологии заболевания.

Особая роль в развитии наружного генитального эндометриоза (НГЭ) принадлежит процессам, происходящим в перитонеальной полости и приводящим к развитию или регрессу эндометриоидного очага. Известно, что количество перитонеальной жидкости (ПЖ) у женщин с эндометриоидной болезнью значительно увеличено [5]. У этих больных ПЖ характеризуется высоким содержанием активированных макрофагов [10], которые способствуют развитию эндометриоза, и продуцируемых ими цитокинов – фактор некроза опухоли α (ФНО- α) [5], высо-

ким содержанием трансформирующих факторов роста $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$) [1], стимулирующих ангиогенез [12], а также содержит большое количество липопротеинов, особенно низкой плотности, которые генерируют окисленные липидные компоненты в составе макрофагальной воспалительной среды [14]. Оксиданты усиливают рост гетеротопий путем активации факторов роста эндометриальных клеток. N. Santanam и соавт. (2002 г.) обнаружили наличие кислой среды в ПЖ у женщин с эндометриозом, так как липопротеины ПЖ у больных эндометриозом имеют большую способность к окислению по сравнению с липопротеинами плазмы крови. Если действительно окислительные свойства ПЖ являются важным медиатором роста гетеротопий, то перспективным в лечении эндометриоза является применение противовоспалительных препаратов и антиоксидантов [13]. В противоположность этому, Pretta et al. (2007) не выявили различий в липидных профилях женщин с эндометриозом. Необходимы продолжительные дополнительные исследования для определения того, принесет ли пользу таким пациентам ранний скрининг дислипидемии в качестве меры профилактики.

Цель исследования – определить значение нарушения продукции цитокинов и липидов в формировании наружного генитального эндометриоза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения патогенетических механизмов развития и совершенствования методов диагностики, лечения и реабилитации больных с НГЭ были обследованы 96 пациенток, из них 74 пациентки – с НГЭ и 22 женщины – без эндометриоза (контрольная группа), проходивших обследование и лечение в отделении гинекологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» с 2010 по 2012 гг.

В ходе проводимого нами исследования все больные были разделены на 3 клинические группы: I группу составили 28 больных с I-II стадиями НГЭ по классификации r-AFS (1985), II группу – 46 пациенток с III-IV стадиями заболевания. III контрольную группу составили 22 пациентки без эндометриоза,

проходившие обследование по поводу бесплодия.

Для реализации поставленных задач использовались следующие методы исследования: клинические (анамнез, осмотр), лабораторные, ультразвуковые исследования, эндоскопические (лапароскопия, гистероскопия, кольпоскопия), гистологическое исследование удаленных во время лапароскопии биоптатов. Липопротеины в сыворотке крови и ПЖ определяли наборами фирмы Randox (Германия) на биохимическом анализаторе Сапфир-400 (Япония). Эндогенный уровень оксида азота в форме нитрит-аниона (NO-) определяли с помощью реактива Грисса. Активность нитрооксидсинтазы (NOS) измеряли по увеличению продукции оксида азота из L-аргинина в присутствии NADPH. Факторы роста – цитокины, определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами фирмы «R&D Systems» (USA). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 5.1, фирмы Stat Soft). Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента и его аналогу для непараметрических распределений – критерию Манна-Уитни. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнения, что для наиболее успешного решения проблемы НГЭ необходимо привлечение современных методических подходов, в частности комплексное изучение молекулярных основ развития этого заболевания и взаимосвязи метаболических нарушений на местном и системном уровнях.

Полученные результаты у женщин с НГЭ I-II стадий представлены в таблице 1, из которой следует, что содержание ТФР- $\beta 1$ в сыворотке крови пациенток с НГЭ I-II стадий в 1,4 раза больше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,004$). Значение системного уровня регуляции метаболических процессов, контролирующих клеточный рост (ТФР- $\beta 1$), свидетельствует о наличии компенсаторных реакций с участием мелатонина, блокирующего эстрадиол-обусловленную стимуляцию гетеротопий.

Таблица 1

Показатели регуляторов клеточного метаболизма у пациенток с НГЭ (сыворотка крови)

Показатель	Стадии НГЭ	Контроль	p
I-II стадии НГЭ			
ТФР- $\beta 1$ (пг/мл)	12936,00 [7650,00-28050,00]	9332,00 [4736,00-21100,00]	0,004
ЛПВП (ммоль/л)	1,25 [0,77-2,20]	1,10 [0,56-1,80]	0,013
NOx (мкмоль/л)	16,50 [0,80-61,50]	2,39 [0,10-62,50]	0,041

Показатель	Стадии НГЭ	Контроль	p
III-IV стадии НГЭ			
ФНО-α (пг/мл)	15,56 [4,70-64,00]	8,04 [0,40-23,60]	0,014
ЛПВП (ммоль/л)	1,25 [0,91-2,30]	1,10 [0,56-1,80]	0,006
NOx (мкмоль/л)	32,00 [0,48-56,00]	2,39 [0,10-62,50]	0,001

Примечание: результаты представлены как медиана и межквартильный интервал; p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

В липидном спектре выявлены изменения в содержании ЛПВП в сыворотке крови данных пациенток, характеризующиеся их повышением в 1,1 раза ($p < 0,013$) (табл. 1). Такое увеличение ЛПВП обуславливает повышение содержания параоксоназы-1 (ПОН-1), входящей в состав данного комплекса липопротеинов, а, следовательно, и ее активности. Подтверждением этого положения служит результат изучения полиморфизма гена параоксоназы [4], которое показало отсутствие его различий по сравнению с показателями у пациенток контрольной группы. Модификация ЛПВП у женщин с I-II стадиями НГЭ на системном уровне носит компенсаторный характер, направленный на предупреждение формирования более «значимых» эндометриодных гетеротопий на местном уровне.

Содержание метаболитов оксида азота (NOx) в сыворотке крови пациенток с НГЭ I-II стадий оказалось повышенным по сравнению с контрольной группой в 6,9 раза ($p < 0,041$), тогда как активность NO-синтазы достоверно не изменялась и оставалась на уровне физиологических показателей (табл. 1). Можно полагать, что причиной повышения NO является активация нитритредуктазного пути его синтеза.

В данной ситуации гиперпродукция метаболитов NO способствует прогрессированию эндометриодных гетеротопий, что обусловлено вазодилатацией, с одной стороны, с другой – повышается продукция фактора, способного стимулировать миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, приводящего к образованию новых сосудов, в результате чего усиливается кровоснабжение, а, следовательно, и рост гетеротопий [2]. В третьих, NO известен как мощное антиапоптозное соединение [3, 11]. Известно, что высокая генерация NO играет важную роль в синтезе и отложении коллагена, способствующего образованию спаек.

Как видно из таблицы 1, содержание ФНО-α в сыворотке крови пациенток с НГЭ III-IV стадии оказалось в 1,9 раз больше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,014$), способствует

усилению индукции фосфолипазы A2 (ФЛА2), участвующей в запуске каскада арахидоновой кислоты, в результате чего обеспечивается синтез простагландинов, обуславливающих болевой синдром. По данным нашего исследования, у 68,9% (51) больных с НГЭ имели место периодические боли перед или во время менструации, диспареуния – у 8,1% (6).

Исходя из действия ФНО-α на пролиферирующие клетки, конечным результатом которого является апоптоз, можно полагать, что у данных женщин имеет место воспалительный процесс, так как синтез ФНО-α не наблюдается в нестимулированных клетках, что позволяет считать высокий уровень ФНО-α результатом действия инфекции. Наличие последней обнаружено нами у 14,4% (инфекции, передающиеся половым путём) и 78,3% (воспалительные заболевания органов малого таза) больных этой группы.

ФЛА2 является структурной единицей ЛПНП (уровень которых у данных пациенток с III-IV стадиями НГЭ соответствует контрольным значениям (табл. 1)). Можно полагать, что в данной ситуации на системном уровне это достигается повышенным содержанием ЛПВП, в состав которых входит фермент параоксоназа, защищающий от окисления ЛПНП и обеспечивающий расщепление и выведение окисленного холестерина. Представленные данные (табл. 1) позволяют констатировать, что достоверные изменения в содержании изученных липидных фракций касались только ЛПВП.

Содержание NOx в сыворотке крови пациенток с НГЭ III-IV стадий (табл. 1) в 13,4 раза повышен по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$).

Изучение липидного спектра в ПЖ у пациенток с I-II стадиями НГЭ показало, что имеет место повышенное содержание свободного холестерина в 1,4 раза, ЛПВП – в 1,7 раза и ЛПНП – в 1,6 раза ($p < 0,008$, $p < 0,004$, $p < 0,003$ соответственно) (табл. 2).

Таблица 2

Показатели регуляторов клеточного метаболизма у пациенток с НГЭ (перитонеальная жидкость)

Показатель	Стадии НГЭ	Контроль	p
I-II стадии НГЭ			
Холестерин (ммоль/л)	2,00 [1,07–3,09]	1,39 [1,21–1,81]	0,008
ЛПВП (ммоль/л)	0,78 [0,34–1,17]	0,45 [0,33–0,59]	0,004
ЛПНП (ммоль/л)	0,77 [0,30–1,21]	0,48 [0,01–0,70]	0,003
III-IV стадии НГЭ			
ФНО-α (пг/мл)	8,30 [0,02–29,86]	12,59 [4,00–31,20]	0,050
ТФР-β1 (пг/мл)	2480,00 [1513,60–5720,0]	1425,40 [1011,00–2200,40]	0,001
NOx (мкмоль/л)	24,00 [7,52–65,00]	7,25 [0,14–64,50]	0,039
NO-синтазы (мкмоль/л)	35,00 [28,60–67,40]	23,00 [0,79–57,60]	0,001

Примечание: результаты представлены как медиана и межквартильный интервал; p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Высокий уровень у этих пациенток в ПЖ холестерина ЛПВП (хЛПВП) направлен на подавление воспаления. Такое положение вытекает из ранее выявленного нами воспалительного процесса в ПЖ, подтвержденное повышенным содержанием в ней провоспалительных цитокинов (ФНО-α и ИЛ-1β) [1]. Однако установлено, что при воспалительном процессе ЛПВП изменяют свою функцию на провоспалительную, вследствие снижения концентрации основного аполипопротеина ЛПВП – АпоА, который обеспечивает обратный транспорт холестерина в печень и увеличивает активность параоксоназы. В ПЖ у женщин с НГЭ, в отличие от сыворотки крови, обнаружено увеличение уровня и ЛПНП (p<0,003) относительно контрольных данных, что может быть результатом компенсаторных реакций, направленных на увеличение активности ФЛА2 – структурной единицы ЛПНП. Содержание ФНО-α в ПЖ у пациенток с НГЭ III-IV стадиями в 1,5 раза меньше по сравнению с контрольной группой (p<0,050) (табл. 2). В то же время уровень ТФР-β1 у данных женщин был в 1,7 раза выше референтных показателей (p<0,001). Такие изменения в продукции ФНО-α дают основание полагать, что в ПЖ имеет место сниженная функция этого цитокина, как фактора ангиогенеза [11] и клеточной пролиферации. Регуляторные возможности ФНО-α в ПЖ, определяемые также, прежде всего, его способностью индуцировать апоптоз и осуществлять анти-бактериальный защитный эффект, резко снижены.

Что касается ТФР-β1, то в условиях НГЭ III-IV стадий в ПЖ высокий уровень данного фактора роста

может быть одним из метаболических соединений, результатом действия которого является развитие фиброза (основа спаечного процесса). Высокий уровень этого фактора роста, можно полагать, является результатом наличия воспалительного процесса, на что указывают исследования Н. В. Ермоловой (2008), которые подчеркивают, что воспаление считается ярким признаком эндометриозных образований и обладает одновременно локальными и системными последствиями.

Содержание NOx в ПЖ пациенток с НГЭ III-IV стадий – мощного фактора роста сосудов, вазодилатора и ингибитора апоптоза [8] – в 3,3 раза повышено по сравнению с контрольной группой (p<0,039) (табл. 2). Это обуславливает усиленное кровоснабжение эндометриозных гетеротопий. В ПЖ высокая генерация NOx обусловлена NO-синтазным путём, о чём свидетельствует высокая активность данного фермента, превышающая физиологические показатели почти в 1,5 раза (p<0,001). Избыток NOx сопровождается оксидантным стрессом и выступает как мутагенный и канцерогенный фактор или анти-апоптозный фактор [2, 3].

ВЫВОДЫ

1. На системном уровне (сыворотка крови) у женщин с НГЭ I-II стадий обнаружено высокое содержание ТФР-β1 и ЛПВП, а также метаболитов NO. Модификация метаболических процессов на системном уровне может играть существенное значение в нарушении их на местном уровне. Однако модификация молекулярных взаимосвязей липид-

ного обмена (ЛПВП) с ангиогенными соединениями в эндотелиальных клетках увеличивает генерацию NO, обуславливая усиление кровоснабжения гетеротопий. Высокий уровень ТФР- β 1 ингибирует NO-синтазу, снижая одну из реакций образования NO, то есть на системном уровне имеют место развитие компенсаторных процессов (нитритредуктазный путь синтеза NO). В тоже время в ПЖ имело место повышение свободного холестерина, ЛПНП и увеличение показателей ЛПВП, что свидетельствует о наличии адаптивных реакций, способствующих снижению пролиферации и воспаления.

2. Обнаруженные закономерности у пациенток с III-IV стадиями НГЭ свидетельствуют о взаимосвязи ЛПВП и ФНО- α , обладающих противовоспалительными свойствами. В ПЖ у больных этой группы значительно увеличены показатели ТФР- β 1, метаболитов NO и NO-синтазы, что свидетельствует о NO-синтазном пути синтеза оксида азота.

3. Резюмируя полученные данные, можно заключить, что выявленные изменения во взаимосвязи липидного спектра, факторов роста и ангиогенных соединений являются теоретическим основанием для проведения дополнительных лечебных мероприятий, направленных на нормализацию обменных процессов при НГЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолова Н. В. Патогенетическая роль эндотелиальных факторов и половых гормонов в формировании наружного генитального эндометриоза / Н. В. Ермолова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2008. – Т. 8, № 3. – С. 29–32.
2. Коган А. Х. Модулированная роль CO₂ в действии активных форм кислорода / Коган А. Х., Грачев С. В., Елисеева С. В. – М. : ГЭОТАР-Медцина, 2006. – 224 с.
3. Медицинские и социальные аспекты генитального эндометриоза / Л. В. Адамян, М. М. Сонова, Е. С. Тихонова [и др.] // Проблемы репродукции. – 2011. – № 6. – С. 78–81.
4. Отсутствие негативного влияния полиморфизма гена параоксаназы в обмене липопротеинов при наружном генитальном эндометриозе / Л. В. Колесникова, Н. В. Ермолова, В. А. Линде [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, Спец. вып. – С. 28–29.
5. Участие макрофагов в патогенезе генитального эндометриоза / М. М. Сонова, Л. Ф. Диденко, С. А. Антонова [и др.] // Проблемы репродукции : материалы V международного конгресса по репродуктивной медицине, 8-21 января 2011 года, Москва, Россия / ФГУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова» Минздравсоцразвития России. – М., 2011. – С. 152–153.
6. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis / L. L. Amsterdam, W. Gentry, S. Jobanputra [et al.] // Fertil. Steril. – 2005. – Vol. 84, № 2. – P. 300–304.
7. Atherosclerosis in women with endometriosis / S. Pretta, V. Remorgida, L. H. Abbamonte [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2007. – Vol. 132. – P. 226–231.
8. Bryan N. S. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development / N. S. Bryan, K. Bian, F. Murad // Frontiers in Bioscience. – 2009. – Vol. 14. – P. 1–18.
9. Lee B. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium / B. Lee, H. Du, H. S. Taylor // Biol. Reprod. – 2009. – Vol. 80. – P. 79–85.
10. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis / M. Berbic, L. Shuike, R. Markham [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 94. – P. 623–631.
11. Pathogenesis of endometriosis / A. W. Nap, P. G. Groothuis, A. Y. Demir [et al.] // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 18, № 2. – P. 233–244.
12. Rich innervations of deep infiltrating endometriosis / G. Wang, N. Tokushige, R. Markham [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24. – P. 827–834.
13. Santanam N. Macrophages, oxidation and endometriosis / N. Santanam, A. A. Murphy, S. Parthasarathy // Ann NY Acad. Sci. – 2002. – Vol. 955. – P. 461–467.
14. Unfavorable lipid profile in women with endometriosis / Anderson Sanches Melo, Julio Cesar Rosa-e-Silva, Ana Carolina Japur de Sa Rosa-e-Silva [et al.] // Fertility and Sterility. – 2010. – Vol. 93, № 7. – P. 2433–2436.