

УДК 618.145:616-007.61:577.15+57.042.2:577.175.14

© Коллектив авторов, 2012.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТЕИНАЗ И ЦИТОКИНОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫРАЖЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ГИПЕРПЛАЗИЯХ ЭНДОМЕТРИЯ

С.В. Литвинова, Е.П. Коваленко, И.И. Фомочкина, А.В. Кубышкин

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И.Георгиевского», г.Симферополь.

**THE COMPARATIVE EFFICIENCY OF THE PROTEINASE-INHIBITOR ACTIVITY AND CYTOKINES FOR
DETERMINATION OF INFLAMMATION'S EXPRESSION UNDER ENDOMETRIAL HYPERPLASIA**
S.V. Litvinova, Y.P. Kovalenko, I.I. Fomochkina, A.V. Kubyshkin

SUMMARY

Here we have presented the results of comparative efficiency of the proteinase-inhibitor activity and cytokines for determination of inflammation's expression under endometrial hyperplasia. There was a strong correlation of an intensity of inflammatory changes with expression of CD45+, proinflammatory cytokines and non-specific proteinases and their inhibitors in cervico-vaginal washout fluids. We have found that development of endometrial hyperplasia accompanied by increase of interleukins, IL-1 β and IL-6, as well as TNF- α , elastase- and trypsin-like proteinases activity, but decrease of the acid-stable inhibitors. Note that dynamic of these factors depends on type of the hyperproliferative process, and meantime reflects the feature of endometrial inflammation. In patients with endometrial hyperplasia the increase of proteinases activity together with depression of local synthesized acid-stable inhibitors are often correlated with the severity of inflammation and might be useful as a local inflammation's markers.

**ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ПРОТЕЇНАЗ І ЦИТОКІНІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
ВИРАЖЕНОСТІ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ ГІПЕРПЛАЗІЯХ ЕНДОМЕТРІЯ**

С.В. Литвинова, Е.П. Коваленко, І.І. Фомочкина, А.В. Кубишкін

РЕЗЮМЕ

Проведена порівняльна ефективність використання протеїназ та цитокінів для визначення вираженості запального процесу при гіперплазіях ендометрія. Встановлено, що про характер і міру вираженості запальних змін в ендометрії можна судити, як по рівню експресії CD45+, так і по рівню прозапальних цитокінів, неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів в маткових змивах. При розвитку гіперплазії ендометрія відбувається підвищення рівнів ІЛ- 1 β , ІЛ- 6, ФНО- α , зростання ЕПА і ТПА і зниження рівня КСІ. Зростання активності протеїназ і пригноблення активності місцевосинтезуємих кіслотостабільних інгібіторів, при гіперплазії ендометрія найбільш специфічно відбиває ступінь тяжкості запального процесу і може бути використане в якості місцевих маркерів для оцінки характеру запалення в ендометрії.

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия, воспаление, протеиназы, ингибиторы протеиназ, цитокины.

В последнее время все больше внимания в развитии гиперплазии эндометрия придается воспалительному процессу [1, 11]. Это обусловлено тем, что теория гормонального дисбаланса с развитием абсолютной и относительной гиперэстрогении не в полной мере объясняет механизмы развития гиперпластического процесса эндометрия [8, 10]. Однако прослеживается четкая взаимосвязь между процессами ремоделирования эндометрия вследствие гормонального дисбаланса и развитием воспаления в эндометрии [13, 15], формирование которого сопровождается активацией лейкоцитов и высвобождением медиаторов воспаления. Среди медиаторов воспаления особое внимание привлекает изучение неспецифических протеиназ и цитокинов [4, 5]. В настоящее время в патогенезе развития гиперплазии эндометрия протеолитические ферменты рассматриваются в качестве основных эффекторов тканевого повреждения, способных разрушать компоненты

экстрацеллюлярного матрикса, высвободить из него растворимые факторы, тем самым нарушая гистоархитектонику тканей, что может привести к нарушению процессов пролиферации и дифференцировки эндометрия [1, 2].

Немаловажная роль в развитии гиперпластических процессов и рака эндометрия отводится и цитокинам [7]. Считается, что многие аспекты участия цитокинов в развитии новообразований также реализуются через воспалительную реакцию [9]. При этом происходит повышение локальной продукции провоспалительных цитокинов в эндометрии. Причем определение цитокинов в очаге воспаления может быть более значимым, чем в периферической крови [9, 14]. В связи с этим, в проведенной работе предпринята попытка установить диагностическую значимость определения локальных цитокинов и компонентов неспецифических протеиназ и их ингибиторов для оценки характера и степени

выраженности воспалительного процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены у 89 женщин репродуктивного возраста с различными видами гиперплазий эндометрия. В соответствии с классификацией ВОЗ женщины были разделены на 3 группы. В первую группу вошла 41 женщина с простой ГЭ, во вторую 36 женщин с комплексной ГЭ и в третью группу 12 женщин с комплексной гиперплазией с атипическими изменениями в эндометрии. Средний возраст обследованных женщин составлял $38,8 \pm 1,0$ лет. В качестве контрольной группы были отобраны 18 здоровых фертильных женщин, сопоставимых по возрасту, не имевших в анамнезе и в настоящем заболеваний эндометрия и давших согласие на включение в исследование.

Оценку воспалительных изменений в эндометрии проводили путем оценки морфологических изменений в эндометрии. Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с использованием моноклональных антител к рецепторам общего лейкоцитарного антигена CD45 (Clone 2B11 + PD7/26) и системы визуализации EnVision™ FLEX +, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus, по стандартной методике [12]). Результаты ИГХ исследования оценивали с учетом распределения трансмембранной экспрессии CD45+ иммунокомпетентных клеток в строме эндометрия. В качестве позитивного контроля использовали ткань миндалин, в качестве негативного контроля – ткань мозга. Морфометрическое исследование включало подсчет клеток с помощью программы Software DP-SOFT на микроскопе OLYMPUS CX 41.

Внутриматочный смыв получали непосредственно перед проведением гистероскопии путем введения в полость матки 3-4 мл подогретого физиологического раствора через педиатрический одноразовый катетер Фолея. Введенную жидкость аспирировали через 20-30 секунд. Биохимические определения проводили в надосадочной жидкости. Результаты пересчитывали на 1 мг белка внутриматочных смывов, что позволяло стандартизовать полученные данные. Белок во всех смывах определяли методом Лоури. Для определения

концентрации цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α твердофазным ИФА методом использовали наборы реагентов «Вектор-Бест» (Россия).

Определение протеолитических ферментов и их ингибиторов проводили с использованием специфических субстратов на основе энзиматических методов [6]. Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по измерению скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N- α -бензоил-L-аргинина (BAEE). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) осуществляли с использованием синтетического субстрата N-t-вос-аланил-p-нитрофенилового эфира (BANPE). Определение антитриптической активности внутриматочного смыва осуществляли по торможению расщепления трипсином этилового эфира N- α -бензоил-L-аргинина (BAEE). Для определения кислотостабильных ингибиторов в промывных водах, пробы вначале обрабатывали для осаждения кислотостабильных белков и выделения КСИ из комплекса с протеиназами, с последующим исследованием, как для антитриптической активности.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием параметрических методов с вычислением средних величин (M) и оценкой вероятности расхождений (m). В качестве критерия оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали t-критерий Стьюдента. Статистические расчеты выполняли в среде электронных таблиц Excel для Microsoft Office [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты гистологического исследования тканей эндометрия показали, что при морфологическом исследовании тканей эндометрия наличие хронического воспалительного процесса было выявлено у 67% женщин с гиперплазией эндометрия. Однако данные гистологического исследования не давали полного представления о степени выраженности воспаления и его активности. Поэтому, с целью определения степени выраженности воспалительного процесса нами проведено иммуногистохимическое исследование ткани эндометрия с определением экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45+ (табл. 1).

Таблица 1

Уровень экспрессии рецепторов CD45+ (%) в эндометрии с различными вариантами гиперплазий

Группы	n	CD45(%)
Контроль	18	$4,2 \pm 1,2$
Простая ГЭ	41	$19,9 \pm 0,9$ % ($p < 0,001$),
Комплексная ГЭ	36	$31,2 \pm 2,1$ % ($p < 0,001$)
Комплексная ГЭ с атипией	12	$57,8 \pm 2,4$ ($p < 0,001$),

Примечание: показана достоверность различий по отношению к контролю.

Полученные результаты показали, что у всех женщин с гиперплазиями эндометрия определялись клетки с экспрессией CD45+. Количество клеток воспаления увеличивалось при переходе гиперплазии от простой к комплексной с атипией. Так, в группе с простой ГЭ процент клеток, экспрессирующих CD45+, достоверно увеличился в 4,5 раз, а при комплексной и атипической ГЭ он был выше в 7,4 и 13,8 раз по отношению к контролю. Следовательно, существует определенная зависимость уровня экспрессии CD45+ от характера гиперпластического процесса.

В дальнейшем, учитывая накопление клеток CD45+ в тканях эндометрия, нами проведено сопоставление результатов иммуногистохимического исследования с содержанием уровня местных протеолитических

ферментов и их ингибиторов и локального уровня провоспалительных цитокинов в маточных смывах. Проведенное исследование показало, что местные гуморальные факторы еще более специфично отражают характер воспалительного процесса. Наличие воспаления приводило к росту протеолитической активности и к повышению уровня провоспалительных цитокинов в маточных смывах. Причем изменения в состоянии показателей протеиназ –ингибиторной системе и уровня цитокинов зависело от типа гиперпластического процесса.

Анализ состояния компонентов протеиназ-ингибиторной системы показал резкое повышение активности протеолитических ферментов и угнетение их ингибиторов (рис.1).

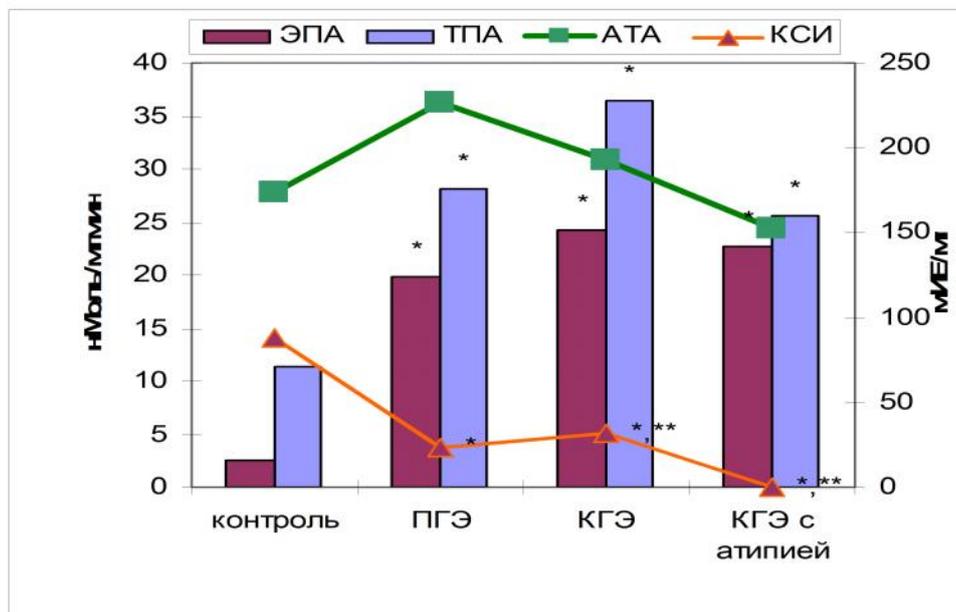


Рис.1. Активность неспецифических протеиназ и их ингибиторов в маточных смывах у женщин с различными видами гиперплазий эндометрия.

Примечание: звездочками показана достоверность различий ($p < 0,05$); * - по отношению к контролю, ** - по отношению к простой ГЭ.

Активность эластазоподобных протеиназ достоверно увеличивалась с $19,8 \pm 3,32$ при простой ГЭ до статистически значимых значений $24,3 \pm 5,5$ при комплексной гиперплазии по сравнению с контролем. Характерная динамика изменений наблюдалась и в отношении ТПА, показатели которой достоверно превысили значения контрольной группы на 148% при простой ГЭ, а в группе с комплексной ГЭ и комплексной ГЭ с атипией на 222% и 126% соответственно.

Исследование антитриптической активности показало незначительное увеличение уровня АТА в группе с простой ГЭ, а при обеих формах комплексной гиперплазии отмечалось падение уровня АТА до значений контроля. При изучении показателей активности кислотостабильных

ингибиторов протеиназ в маточных смывах, зарегистрировано достоверное снижение уровня местносинтезируемых кислотостабильных ингибиторов при простой и комплексной ГЭ в 2-3 раза, а в группе с комплексной гиперплазией с атипией КСИ переставали определяться.

Таким образом, наличие воспалительного процесса сопровождалось развитием дисбаланса в состоянии неспецифических протеиназ и их ингибиторов, который проявлялся увеличением активности трипсино- и эластазоподобных протеиназ и снижением уровня ингибиторов протеаз. Установлено, что эти изменения отмечались уже при простой гиперплазии, а наиболее выражены при комплексной ГЭ.

При исследовании локального уровня цитокинов отмечался рост провоспалительных цитокинов в

зависимости от формы гиперпластического процесса (рис. 2).

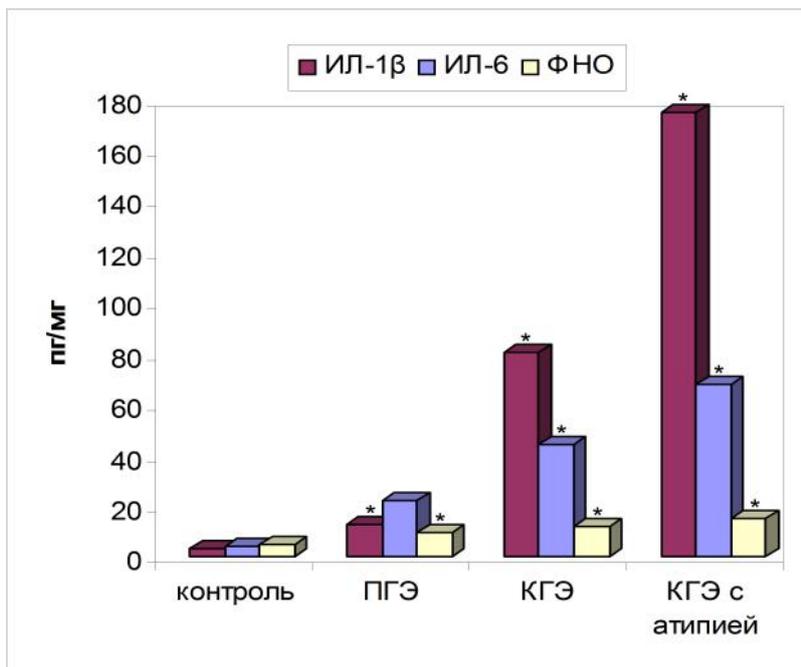


Рис.2 Содержание цитокинов в маточных смывах у женщин с различными видами гиперплазий эндометрия.

Примечание: звездочками показана достоверность различий ($p < 0,05$); * - по отношению к контролю.

Уровень ИЛ-1β при простой гиперплазии увеличивался и достигал максимальных значений при комплексной с атипией гиперплазии $174,7 \pm 15,1$. Сходная динамика изменений отмечается и в отношении уровня ИЛ-6, который при простой гиперплазии в 5 раз выше, при комплексной в 10 раз выше, а при комплексной с атипией в 15 раз выше значений контроля. Зависимость уровня ФНО-α от характера воспалительных изменений была не столь выражена. При простой ГЭ ФНО-α увеличивался почти в 2 раза, при комплексной ГЭ – в 2,5 раза, а при комплексной с атипией ГЭ в 3 раза выше значений контроля.

Так как неспецифические протеиназы и их ингибиторы, провоспалительные цитокины характеризуют наличие воспалительных изменений, то полученные результаты позволили предположить, что формирование гиперплазии эндометрия сопровождается развитием хронического воспалительного процесса. Наиболее выраженные изменения отмечались при комплексной атипической гиперплазии, а наименее выраженные при простой ГЭ. Таким образом, о характере и степени тяжести воспалительных изменений в эндометрии можно судить, как по уровню активности протеолитических ферментов и их ингибиторов, так и по уровню провоспалительных цитокинов в маточных смывах. Но при оценке формирования воспалительных изменений в эндометрии

определение показателей протеиназно-ингибиторной системы является, на наш взгляд, более информативным. Это объясняется тем, что в нормальных тканях деструктивное действие протеаз контролируется мощной системой ингибиторов. В нашем исследовании установлено развитие дисбаланса в протеиназно-ингибиторной системе, который проявляется повышением активности трипсино- и эластазоподобных протеиназ на фоне отсутствия роста антитриптической активности и угнетением местносинтезируемых кислотостабильных ингибиторов. Это может способствовать дальнейшему прогрессированию патологии, сопровождающейся деструкцией ткани и рассматриваться в качестве фактора риска малигнизации.

ВЫВОДЫ

1. О характере и степени выраженности воспалительных изменений в эндометрии можно судить, как по уровню экспрессии CD45+, так и по уровню провоспалительных цитокинов, неспецифических протеиназ и их ингибиторов в маточных смывах.

2. При развитии гиперплазии эндометрия происходит повышение уровней ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α, рост эластазо- и трипсиноподобной активности и снижение уровня КСИ. Динамика изменений зависит от типа гиперпролиферативного процесса и отражает

характер воспалительного процесса в эндометрии.

3. Рост активности протеиназ и угнетение активности местно синтезируемых кислотостабильных ингибиторов при гиперплазии эндометрия наиболее специфично отражает степень тяжести воспалительного процесса, что может быть использовано в качестве местных маркеров для оценки характера воспаления в эндометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамян Л.В. Воспалительный процесс в этиологии и патогенезе рака эндометрия / Адамян Л.В., Глякин Д.С., Самойлова А.В., Гунин А.Г. // Проблемы репродукции.- 2007.-№1.-с.21-25.

2. Вовчук И.Л. Роль сериновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов при неопластической трансформации / Вовчук И.Л.// Лабораторна діагностика.-2010.-т.4(54).-С.52-54.

3. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкина В.И. Приклад-ная медицинская статистика. - Санкт-Петербург: Фолиант, - 2003.-432 с.

4. Коваленко Е.П., Татарчук Т.Ф., Кубышкин А.В. Т.Г. Филоненко Гиперплазия эндометрия и воспаление: оценка лейкоцитарной инфильтрации и уровня провоспалительных цитокинов // Здоровье женщины.-2011.-№7(68).-С.142-146.

5. Коваленко Е.П., Татарчук Т.Ф., Литвинова С.В., Кубышкин А.В. Изменения показателей активности местных неспецифических протеиназ и их ингибиторов при гиперплазиях эндометрия // Здоровье женщины.-2011.-№9(65).-С.118-123.

6. Кубишкін А.В, Харченко В.З., Семенець П.Ф. та інш. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у сироватці крові і

біологічних рідинах // Методичні рекомендації. - Київ. - 2010. – 27 с.

7. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление.- 2004.- № 4.- С. 38-51

8. Состояние процессов пролиферации в гиперплазированной ткани эндометрия у женщин репродуктивного возраста / Г.Е. Чернуха и соавт. // Проблемы репродукции.- 2004. №4. с.30-34.

9. Шаимова В.А. Роль провоспалительных цитокинов при воспалительных заболеваниях. // Цитокины и воспаление.- 2005.-№2.

10. Шарапова О.В. Гормональный статус женщины с гиперпластическими процессами эндометрия /О.В.Шарапова, А.А. Осипова, А.В. Самойлова, В.А. Матвеева, А.Г. Гунин/// Проблемы репродукции.- 2006. №3. – С.31-37.

11. Шешукова Н.А. Морфологические особенности эндометрия при гиперпластических процессах в сочетании с хроническим эндометритом / Шешукова Н.А., И.О.Макаров // Гинекология.-2011.- Т.13.-№5. С.56-61.

12. Dabbs D. J. Diagnostic immunohistochemistry / Dabbs D. J.// London: Churchill Livingstone, 2006. – 828 p.

13. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer // Nature.- 2002.-v.420.-P.860–867.

14. Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage // Ann Rheum Dis.- 2011.-v.70 (Suppl 1).-P.104-108.

15. Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. Nature.- 2008.-v.454.-P.436–444.