

УДК 618.14-002:616-007.61:577.175.14:577.152.34:612.621.31

© Е. П. Коваленко, 2011.

## СОСТОЯНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, ПРОЦЕССОВ ПРОТЕОЛИЗА И УРОВЕНЬ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В МАТОЧНЫХ СМЫВАХ ПРИ ГИПЕРПЛАЗИЯХ ЭНДОМЕТРИЯ

**Е. П. Коваленко**

Кафедра акушерства, гинекологии и перинатологии ФПО (зав. кафедрой – проф. А. Н. Рыбалка),  
ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского», г. Симферополь.  
Отделение эндокринной гинекологии (зав. отделением – проф. Т. Ф. Татарчук)  
ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», г. Киев.

### PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES, PROTEOLYTIC PROCESSES AND ESTROGEN-PROGESTERONE LEVEL IN UTERINE LAVAGE FLUID IN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

**Ye. P. Kovalenko**

#### SUMMARY

Level of estrogens and progesterone, pro-inflammatory cytokines and proteases-inhibitor components in women with different endometrial hyperplasia variants in the uterine lavage fluid it was studied. It is shown that the study of sex hormones in uterine lavage fluid may be more informative for diagnostic hyperestrogenia than their determination in blood. Levels of pro-inflammatory cytokines and elastase- and trypsinlike proteases is increased in women with simple hyperplasia and maximum increased in complex hyperplasia with atypia patients. The level of inhibitor capacity in the endometrium is reduced and acidstable inhibitors are not detected in women with hyperplasia with atypia. Role of the studied systems in the endometrial hyperplasia pathogenesis and the potential diagnostic value of the studied components it was discussed.

### СТАН ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ, ПРОЦЕСІВ ПРОТЕОЛІЗУ І РІВЕНЬ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ В МАТКОВИХ ЗМИВАХ ПРИ ГІПЕРПЛАЗІЯХ ЕНДОМЕТРІУ

**Є. П. Коваленко**

#### РЕЗЮМЕ

Проведено вивчення в маткових змивах рівня статевих гормонів, прозапальних цитокінів та показників протеїназ-інгібіторної системи у жінок з різними варіантами гіперплазій ендометрію. Показано, що дослідження статевих гормонів в маткових змивах може бути більш інформативним, ніж їх визначення в крові для оцінки характеру гіперестрогенії. Рівень прозапальних цитокінів і еластазо- і тріпсіноподібних протеїназ збільшується у жінок з простою гіперплазією і досягає максимальних значень у хворих з комплексною гіперплазією з атипією. Рівень інгібіторного потенціалу в ендометрії знижується і кислотоустойчиві інгібітори не визначаються у змивах жінок з гіперплазією з атипією. Обговорюється участь показників вивчених систем в патогенезі гіперплазій ендометрію і потенційна діагностична цінність показників.

**Ключевые слова:** гиперплазия эндометрия, провоспалительные цитокины, протеолиз, половые гормоны.

Современная концепция формирования гиперплазии эндометрия (ГЭ) в качестве ведущего фактора выделяет избыточную эстрогенную стимуляцию, которая сочетается с недостаточностью прогестеронового влияния [12, 13]. Однако, по мнению ряда авторов, развитие гиперпластических процессов в эндометрии далеко не всегда происходит на фоне гиперестрогенемии [4, 11], а, следовательно, существуют и другие механизмы, лежащие в основе патогенеза данной патологии. В связи с этим все больший интерес исследователей привлекает изучение разнообразных молекулярно-биологических механизмов, вовлеченных в развитие гиперплазии эндометрия.

Среди факторов, которые могут принимать участие в развитии гиперпластических процессов,

особое внимание привлекают механизмы, связанные с воспалительными изменениями эндометрия [3, 7]. Так, выявлено генотоксическое и мутагенное действия продуктов свободнорадикального окисления тканей, образующихся в зоне воспаления [8, 10], снижение эффективности противоопухолевого иммунитета [1]. Протеолитические ферменты в зоне воспаления, в первую очередь, матриксные металлопротеиназы, способны разрушать матрикс соединительной ткани и базальной мембраны эпителия, нарушая гистоархитектонику тканей, что, в свою очередь, может способствовать нарушению процессов пролиферации и дифференцировки эндометрия [3, 9]. Исследованиями последних лет показано, что и уровень локальной секреции цитокинов зависит от степени выражен-

ности ГЭ [2, 14]. О значении воспалительного процесса в развитии ГЭ косвенно может свидетельствовать эффективность противовоспалительной терапии в комплексном лечении гиперплазии эндометрия [6].

Цель проведенного исследования состояла в изучении состояния провоспалительных цитокинов, активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в маточных смывах на фоне системных и локальных изменений уровня половых гормонов у женщин с гиперплазиями эндометрия.

#### МАТЕРИАЛ 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. 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.

Внутриматочный смыв получали непосредственно перед проведением гистероскопии путем введения в полость матки 3-4 мл подогретого физиологического раствора через педиатрический одноразовый катетер Фолея. Катетер Фолея вводился в полость матки без предварительного расширения цервикального канала до её инструментального выскабливания. К другому концу катетера присоединялся одноразовый 10-ти мл шприц. Введенную жидкость аспирировали через 20-30 секунд. Получали 3-4 мл внутриматочного смыва. У 12 женщин контрольной группы внутриматочный смыв проводился в I фазу менструального цикла непосредственно перед установкой внутриматочного контрацептива. У 6 женщин контрольной группы внутриматочный смыв проводился во II фазу на 23-24 день менструального цикла для выяснения характера секреторных процессов эндометрия при проведении прекоцепции. Смыв замораживали и хранили до проведения исследования при температуре  $-15 \div -18$  °C.

Перед проведением исследований смывы размораживали и центрифугировали 15 минут при 1500 g. 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.

Определение эстрадиола в сыворотке крови и маточных смывах проводили с использованием

твердофазных ИФА систем (фирма «DRG Diagnostics», Германия), а для определения прогестерона использовали наборы производства компании «Алькор Био» (Россия). В обеих системах использован принцип конкурентного связывания с поликлональными антителами эстрадиола или прогестерона в биологическом материале и связанного с пероксидазой хрена. Для определения концентрации цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  твердофазным ИФА методом использовали наборы реагентов «Вектор-Бест» (Россия).

Определение протеолитических ферментов и их ингибиторов проводили с использованием специфических субстратов на основе энзиматических методов [5]. Трипсиноподобную активность (ТПА) определяли по измерению скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина (БА) от синтетического субстрата этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal). Определение эластазоподобной активности (ЭПА) осуществляли с использованием синтетического субстрата N-t-вос-аланил-p-нитрофенилового эфира (БАНФЭ). Определение анти-триптической активности внутриматочного смыва осуществляли по торможению расщепления трипсином белковых и низкомолекулярных субстратов этилового эфира N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (Reanal). При определении активности кислотостабильных ингибиторов предварительная подготовка внутриматочного смыва заключалась в его прогревании при кислых значениях pH для полной инактивации лабильных ингибиторов. Для этого предварительно разбавленный в два раза 0,05 М (pH-4,1) ацетатным буфером внутриматочный смыв прогревали в течение 20 минут при температуре 60°C на водяной бане. Полученный экстракт нейтрализовали 0,05 М NaOH до нейтральных значений, центрифугировали и 0,5 мл супернатанта использовали для исследования. Дальнейшее определение соответствовало методике определения анти-триптической активности.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием параметрических методов с вычислением средних величин (M) и оценки 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.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с тем, что уровень половых гормонов в крови у женщин зависит от фазы менструального цикла, для анализа характера изменений гормонального фона обследованные женщины были разделены на группы в зависимости от фазы менструального цикла (табл. 1).

Таблица 1

## Сравнительное содержание гормонов в сыворотке крови и маточных смывах у женщин с различными видами гиперплазий эндометрия

Группы	Фаза цикла	n	Сыворотка крови		Маточные смывы	
			Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нМоль/л	Эстрадиол, пг/мг	Прогестерон, нМоль/г
Контроль (n=18)	I	12	66,4±8,4	5,31±0,81	6,38±0,81	0,42±0,08
	II	6	101,6±9,7	36,22±5,42	8,23±1,18	0,71±0,11
Простая ГЭ (n=41)	I	26	111,2±14,3*	6,17±0,92	19,87±4,32*	0,81±0,15*
	II	15	113,9±11,2	19,64±6,48**	43,69±12,67**	2,24±0,65**
Комплексная ГЭ (n=36)	I	21	118,5±12,7*	5,29±0,69	25,72±5,09*	1,26±0,34*
	II	15	129,1±11,8**	23,11±4,12**	27,82±4,23**	1,56±0,46
Комплексная ГЭ с атипией	I+II	12	130,5±9,3*,**	22,31±5,11*	20,70±4,99*,**	0,58±0,21

Примечание: звездочками показана достоверность различий ( $p < 0,05$ ); \* – по отношению к контролю I фазы менструального цикла, \*\* – по отношению к контролю II фазы менструального цикла.

У женщин с простой ГЭ уровень эстрогенов в крови повышался, но достигал достоверного изменения по сравнению с референсными значениями только при сравнении с I фазой цикла. При комплексной гиперплазии эндометрия уровень эстрогенов был достоверно повышен и в I, и во II фазу цикла. При комплексной гиперплазии с атипией повышение эстрогенов было достоверно выше по сравнению с обоими контролями. Причем максимум повышения эстрогенов в крови при сравнении с контролем I фазы цикла был в почти в 2 раза, а при сравнении с контролем II фазы – на 28,00% выше соответствующего контроля. В отличие от эстрогенов, уровень прогестерона в крови или оставался на уровне контроля при сравнении с I фазой цикла, или достоверно был снижен как при простой, так и при комплексной ГЭ во II фазу цикла. При комплексной ГЭ с атипией показатель соответствовал уровню показателя у пациенток во вторую фазу менструального цикла, как с простой, так и с комплексной ГЭ.

Определение гормонов в маточных смывах показало более выраженные изменения уровня эстрогенов по сравнению с показателями сыворотки крови. Уже при простой гиперплазии при сравнении с первой фазой цикла отмечалось трехкратное увеличение эстрогенов, а при сравнении с II фазой цикла уровень эстрогенов достоверно увеличивался в 5 раз. При комплексной гиперплазии разница в уровне эстрогенов в I и во II фазу цикла выравнивалась, превышая в среднем соответствующие контроли в 3,5-4,0 раза. Такой же характер изменений отмечен и при ГЭ с атипией.

Следует отметить, что в маточных смывах отмечено и повышение уровня прогестерона, особенно выраженное при простой гиперплазии. По сравне-

нию с контролем I фазы цикла отмечено двукратное повышение прогестерона, а при сравнении со II фазой – более чем трехкратное повышение показателя. При комплексной гиперплазии показатели прогестерона, так же как и эстрогенов, практически выравниваются и превышают соответствующие контроли в 2-3 раза. Обращает на себя внимание тот факт, что при комплексной гиперплазии с атипией уровень прогестерона практически возвращается к уровню контрольных значений у здоровых обследованных, что свидетельствует о развитии относительной гиперэстрогении.

Анализируя изменения в уровне половых гормонов в сыворотке крови и маточных смывах, следует отметить, что нам не удалось выявить тесной корреляционной связи между системным и локальным содержанием гормонов. В тоже время, тенденции и направленность сдвигов показателей в крови и маточных смывах совпадают и проявляются формированием относительной гиперэстрогении, причем изменения в маточных смывах более выражены и показательны. Если выявленные изменения в крови хоть и показывают достоверные изменения, но часто не выходят за пределы обозначенных в качестве нормы значений показателей, то в маточных смывах изменения этих показателей более выражены. При комплексной гиперплазии эндометрия происходит нивелирование разницы показателей в зависимости от фазы цикла, что может свидетельствовать о превалирующем влиянии характера патологии на уровень изучаемых показателей.

В то же время, изучение локального уровня цитокинов и компонентов протеиназ-ингибиторной системы показало, что они еще более выражено отражают характер патологического процесса в эндо-

метрии. Причем, в состоянии этих показателей нам не удалось обнаружить их существенной зависимости от фаз менструального цикла и возраста пациенток. Но в зависимости от характера гиперплазии изменения основных показателей значительно отличаются от контрольных значений (табл. 2). При простой гиперплазии уровень ИЛ-1 $\beta$  превосходит контроль более чем в 3 раза, а при комплексной гиперплазии – более чем в 20 раз. При комплексной гиперплазии с атипией показатель ИЛ-1 $\beta$  более чем в 2 раза превышает показатель в группе комплексной ГЭ без ати-

пии. Сходная динамика изменений свойственна ИЛ-6, который при простой ГЭ в 5 раз выше, при комплексной ГЭ – в 10 раз выше, а при комплексной ГЭ с атипией – в 15 раз выше контроля. Менее выраженная динамика изменений отмечена в уровне ТНФ- $\alpha$ . У пациенток с простой ГЭ ТНФ- $\alpha$  увеличился почти в 2,0 раза, при комплексной – в 2,5 раза и при комплексной с атипией – в 3,0 раза по сравнению с контролем. Все показатели достоверно отличались при сравнении простой и комплексной гиперплазии эндометрия.

Таблица 2

**Содержание цитокинов в маточных смывах у женщин с различными видами гиперплазий эндометрия**

Группы	n	ИЛ-1 $\beta$ , пг/мг	ИЛ-6, пг/мг	ТНФ- $\alpha$ , пг/мг
Контроль	18	3,56 $\pm$ 0,93	4,36 $\pm$ 1,19	5,04 $\pm$ 1,68
Простая ГЭ	41	12,80 $\pm$ 3,32*	22,55 $\pm$ 3,96	9,96 $\pm$ 1,52*
Комплексная ГЭ	36	80,30 $\pm$ 8,90*,**	44,32 $\pm$ 9,77*,**	12,41 $\pm$ 1,85*
Комплексная ГЭ с атипией	12	174,70 $\pm$ 15,10*,**	67,81 $\pm$ 16,39*,**	15,59 $\pm$ 2,66*,**

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

Изучение показателей протеолиза также довольно четко характеризовало форму патологии эндометрия, но функциональные различия показателей позволили выявить патогенетические особенности реакций изученных компонентов (табл. 3). Активность эластолитических ферментов уже при простой ГЭ достоверно увеличивалась в 7,5 раз и при обеих формах комплексной гиперплазии была в 8,0-9,0 раз выше контроля. Уровень ТПА был достоверно повышен в 2,5-3,0 раза при всех типах гиперплазий. С другой стороны, антитриптическая активность в маточных смывах существенно не менялась. После незначительного повышения при простой ГЭ происходило ее сни-

жение до контрольных значений при комплексной гиперплазии эндометрия. В то же время, кислотостабильные ингибиторы протеиназ, которые представлены местно секретируемыми ингибиторами, достоверно снижались при простой и комплексной гиперплазии в 2,0-3,0 раза и переставали определяться в маточных смывах при комплексной ГЭ с атипией. Оценивая в целом реакцию протеиназ-ингибиторной системы при гиперплазиях эндометрия, следует отметить развитие дисбаланса, который проявляется увеличением активности протеиназ при относительном или абсолютном дефиците ингибиторов протеиназ.

Таблица 3

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

Группы	n	ЭПА, нМоль/мг мин	ТПА, нМоль/мг мин	АТА, мИЕ/мг	КСИ, мИЕ/мг
Контроль	18	2,62 $\pm$ 0,41	11,3 $\pm$ 1,3	174,2 $\pm$ 14,5	88,1 $\pm$ 16,1
Простая ГЭ	41	19,80 $\pm$ 3,32*	28,12 $\pm$ 4,77*	226,9 $\pm$ 33,5	23,2 $\pm$ 4,9*
Комплексная ГЭ	36	24,3 $\pm$ 5,5*	36,41 $\pm$ 6,27*	192,70 $\pm$ 26,85	31,3 $\pm$ 13,0*
Комплексная ГЭ с атипией	12	22,71 $\pm$ 5,02*	25,57 $\pm$ 3,39*	152,7 $\pm$ 32,7	0*,**

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

Таким образом, проведенные исследования показали, что с точки зрения оценки патогенетических механизмов развития гиперплазий эндометрия, определение показателей внутриматочных смывов может дать ценную дополнительную информацию. В частности, определение внутриматочных половых гормонов более достоверно характеризует формирование гиперэстрогении при гиперплазиях эндометрия. Выраженное повышение уровня провоспалительных цитокинов свидетельствует о важном значении воспалительного компонента в формировании гиперплазий эндометрия, что требует дальнейшего изучения. С другой стороны, о значении воспалительных изменений в патогенезе ГЭ свидетельствует повышение активности эластазо- и трипсиноподобных протеиназ. Снижение активности ингибиторов протеиназ и, в первую очередь, местно секретируемых кислотостабильных ингибиторов, судя по полученным результатам, можно рассматривать в качестве фактора риска малигнизации эндометрия.

С точки зрения расширения диагностических возможностей для оценки характера гиперпластического процесса, прогноза его развития и эффективности лечения можно предположить диагностическую ценность определения внутриматочных половых гормонов, которые в комплексе с оценкой рецепторного аппарата эндометрия может быть более информативным для оценки степени эстрогенового и прогестеронового дисбаланса. Оценка показателей цитокинов и компонентов протеиназ-ингибиторной системы может быть эффективным диагностическим тестом для прогноза развития гиперплазии и риска развития аденокарциномы.

#### ВЫВОДЫ

1. Определение уровня эстрогенов и прогестерона в маточных смывах при гиперплазиях эндометрия может быть дополнительным эффективным критерием оценки характера гиперэстрогении.

2. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и TNF- $\alpha$  при всех гиперплазиях эндометрия свидетельствует о важной роли воспалительных изменений, которые могут иметь значение в процессах трансформации эндометрия.

3. Рост активности протеиназ при нормальных и сниженных значениях активности ингибиторов свидетельствует о развитии дисбаланса в протеиназ-ингибиторной системе эндометрия, что может являться фактором риска прогрессирования гиперплазии и формирования атипии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. Г. Патогенез онкологических заболеваний, цитоплазматические и молекулярно-генетические механизмы иммунной резистентности

малигнизированных клеток / В. Г. Антонов, В. К. Козлов // Цитокины и воспаление. – 204. – Т. 3., № 2. – С. 23–33.

2. Ахметова Е. С. Диагностическое значение цитокинов в аспирате из полости матки при заболеваниях эндометрия / Е. С. Ахметова, Т. Е. Белокриницкая, Ю. А. Витковский // Дальневосточный медицинский журнал. – 2008. – №1. – С. 72–74.

3. Воспалительный процесс в этиологии и патогенезе рака эндометрия / Л. В. Адамян, Д. С. Глякин, А. В. Самойлова [и др.] // Проблемы репродукции. – 2007. – № 1. – С. 21–25.

4. Гормональный статус женщин с гиперпластическими процессами эндометрия / О. В. Шарапова, А. А. Осипова, А. В. Самойлова [и др.] // Проблемы репродукции. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 31–36.

5. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах. Методичні рекомендації / [А. В. Кубишкін та ін.]. – К., 2010. – 28 с.

6. Татарчук Т. Ф. Протизапальна терапія як складового комплексу лікування рецидивуючої гіперплазії ендометрія / Т. Ф. Татарчук, С. І. Регада // Репродуктивне здоров'я жінки. – 2007. – № 3. – С. 75–76.

7. Чубей Г. В. Вплив запального процесу геніталій на перебіг аденоміозу у жінок репродуктивного віку / Г. В. Чубей // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2008. – № 1. – С. 88–91.

8. Bartsch H. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: Potential lead markers for chemoprevention of inflammation driven malignancies / H. Bartsch, J. Nair // Mutat. Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 47–52.

9. Bourbonliou D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion / D. Bourbonliou, W.G. Stetler-Stevenson // Semin Cancer Biol. – 2010. – Vol. 20, № 3. – P. 161–168.

10. Effect of vitamin E on gene expression changes in diet-related carcinogenesis / J. Lunec, E. Halligan, N. Mistry [et al.] // Ann. NY Acad. Sci. – 2004. – Vol. 1031. – P. 169–183.

11. Endometrial cancer / F. Amant, P. Moerman, P. Neven [et al.] // Lancet. – 2005. – Vol. 366. – P. 491–499.

12. Endometrial hyperplasia, endometrial cancer and prevention: gaps in existing research of modifiable risk factors / F. Linkov, R. Edwards, J. Balk [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2008. – Vol. 44 (12). – P. 1632–1644.

13. Lacey J. V. Jr. Endometrial hyperplasia and the risk of progression to carcinoma / J. V. Jr. Lacey, V. M/ Chia // Maturitas. – 2009. – Vol. 63 (1). – P. 39–44.

14. Mills A. M. Endometrial hyperplasia / A. M. Mills, T. A. Longacre // Semin. Diagn. Pathol. – 2010. – Vol. 27 (4). – P. 199–214.