

УДК 618.145-006:577.175.14-07

© Коллектив авторов, 2012.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ, ИХ ИНГИБИТОРОВ И ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МАТОЧНЫХ СМЫВАХ ЖЕНЩИН С ГИПЕРПЛАЗИЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ НА ФОНЕ АДЕНОМИОЗА

Т.Ф.Татарчук¹, Е.П. Коваленко², Н.Ф. Захаренко¹, А.В. Кубышкин², И.И. Фомочкина²

¹Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМНУ, г.Киев;

²ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского МОЗ Украины, г.Симферополь.

CHANGES IN THE ACTIVITY OF NON-SPECIFIC PROTEASES, THEIR INHIBITORS AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE UTERINE LAVAGE FLUID OF WOMEN WITH ENDOMETRIAL HYPERPLASIA AND ADENOMYOSIS

T.F.Tatarchuk, Ye.P. Kovalenko, N.F. Zaharenko, A.V. Kubyshkin, I.I. Fomochkina

SUMMARY

Level of pro-inflammatory cytokines, non-specific proteases and their inhibitors in uterine lavage fluid of women with endometrial hyperplasia and adenomyosis it was studied. Formation of endometrial hyperplasia accompanied by increased levels of pro-inflammatory cytokines and the development of imbalance in the local non-specific proteases and their inhibitors. Imbalance shows the growth of trypsin like and elastase like activity and reduced level of acid stable proteinase inhibitors. The presence of adenomyosis showed little effect on the local changes in the studied parameters, which primarily reflect the nature of the changes in endometrial hyperplasia, but may indicate the possible presence of an inflammatory component in the both ectopic and eutopic endometrium.

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ, ЇХ ІНГІБІТОРІВ І ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ В МАТКОВИХ ЗМИВАХ ЖІНОК З ГІПЕРПЛАЗІЄЮ ЕНДОМЕТРІЯ НА ТЛІ АДЕНОМІОЗУ

Т.Ф. Татарчук, Є.П. Коваленко, Н.Ф. Захаренко, А.В. Кубишкін, І.І. Фомочкіна

РЕЗЮМЕ

Проведено вивчення змін активності прозапальних цитокінів, неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів у маткових змивах у жінок з гіперплазією ендометрія на тлі аденоміозу. Встановлено, що формування гіперплазії ендометрію супроводжується зростанням рівня прозапальних цитокінів та розвитком дисбалансу в стані місцевих неспецифічних протеїназ та їх інгібіторів, який проявляється зростанням трипсино- і еластазоподобних протеїназ і зниженням рівня містносінтезуємих кіслотостабільних інгібіторів протеїназ. Наявність аденоміоза незначно впливає на місцеві зміни вивчених показників, які в першу чергу відображають характер змін в ендометрії при гіперплазії, але можуть свідчити про можливу присутність запального компонента у вогнищах як ектопічного, так і еутопічного ендометрію.

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

Несмотря на большое число исследований, посвященных вопросам изучения этиологии и патогенеза различных форм пролиферативных процессов репродуктивной системы женщин, таких как аденомиоз, наружный эндометриоз, гиперплазия эндометрия (ГЭ), миома матки, многие вопросы развития этих заболеваний остаются невыясненными. Однако тот факт, что в большинстве случаев данные заболевания встречаются не изолировано, а в различных сочетаниях, свидетельствует о некоторых общих закономерностях развития этих патологических процессов [2]. Одним из наиболее частых сочетаний является развитие гиперплазии эндометрия на фоне аденомиоза, встречающееся по данным ряда авторов от 16 до 90% случаев [3,8].

Следует отметить, что механизмы инвазивного роста эктопического эндометрия как при аденомио-

зе, так и при эндометриозе изучены мало, а сведения носят противоречивый характер. Имеются данные, показывающие, что инвазивный рост эктопического эндометрия при аденомиозе осуществляется при активном участии протеолитических ферментов и компонентов калликреин-кининовой системы, приводя к воспалительным процессам, интенсивность которых сопряжена с глубиной эндометриоидных гетеротопий, и развитию болевого синдрома при этой патологии [1]. По данным M.H.Wu и соавт. [11], на процесс инвазии эндометриоидных клеток оказывает влияние экспрессия ими матриксных металлопротеиназ (ММР-2 и ММР-9), которые повышают способность эндометриоидных клеток к инвазии, являясь, таким образом, важным элементом патогенеза эндометриоза. Наши исследования, проведенные ранее, показали, что степень выраженности гиперп-

ластического процесса эндометрия находится в тесной зависимости от выраженности воспалительного компонента, а также степени активации и развития дисбаланса неспецифической протеиназ-ингибиторной системы [7,10].

В связи с этим целью нашей работы явилось сравнительное изучение роли неспецифических протеиназ, их ингибиторов и провоспалительных цитокинов в маточных смывах у женщин с гиперплазией эндометрия и гиперплазией эндометрия на фоне аденомиоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены у 129 женщины репродуктивного возраста с простой и комплексной гиперплазией эндометрия, развивающейся или изолированно, или в сочетании с аденомиозом. В соответствии с классификацией ВОЗ женщины были разделены на 4 группы. В первую группу вошла 41 женщина с простой ГЭ, во вторую – 23 женщины с простой гиперплазией на фоне аденомиоза, в третью группу 36 женщин с комплексной ГЭ и в четвертую группу 29 женщины с комплексной гиперплазией в сочетании с аденомиозом. 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. Смыв замораживали и хранили до проведения исследования при температуре -15 -18 °С.

Перед проведением исследований смывы размораживали и центрифугировали 15 мин 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. 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 [5]. 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-n-нитрофенилового эфира (BANPE). Определение антитриптической активности внутриматочного смыва осуществляли по торможению расщепления трипсином этилового эфира N- β -бензоил-L-аргинина (BAEE). 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 °С 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 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что в маточных смывах происходит увеличение уровня провоспалительных цитокинов, степень выраженности которого зависит в первую очередь от формы гиперпластического процесса в эндометрии (табл. 1).

Так, уровень ИЛ-1 β при простой ГЭ достоверно увеличивался в 3,5 раза, а при комплексной гиперплазии более чем в 20 раз. Прогрессивно увеличивался уровень ИЛ-6 и ФНО- α . Значения ИЛ-6 при простой гиперплазии превосходили контроль в 5 раз, а при комплексной - в 10 раз. При этом уровень ФНО- α был достоверно повышен почти в 2 раза при простой форме гиперплазии, и в 2,5 раза при комплексной ГЭ.

Анализ изменений уровня цитокинов в маточных смывах при гиперплазии эндометрия на фоне аденомиоза свидетельствует, что более существенное значение играет характер гиперпластического процесса. Причем, при простой гиперплазии наличие аденомиоза приводило к более выраженному росту уровня цитокинов. Так, ИЛ-1 β на фоне аденомиоза был в 2,5 раза выше, чем в группе с простой гиперплазией. Отмечена тенденция и к увеличению ИЛ-6 и ФНО- α . При комплексной гиперплазии на фоне аденомиоза напротив, уровень цитокинов был несколько ниже, чем при ГЭ без аденомиоза. Достоверно в 2 раза снижался уровень только ИЛ-1 β , но

при этом его значения были существенно выше, чем при простой форме гиперплазии на фоне аденомиоза. Также, более высокие цифры отмечались в уров-

нях ИЛ-6 и ФНО- α при комплексной ГЭ на фоне аденомиоза при сравнении с группой простой гиперплазии на фоне аденомиоза.

Таблица 1

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

Группы	n	ИЛ-1 β пг/мг	ИЛ-6 пг/мг	ФНО- α пг/мг
Контроль	18	3,56 \pm 0,93	4,36 \pm 1,19	5,04 \pm 1,68
Простая ГЭ	41	12,8 \pm 3,32*	22,55 \pm 3,96*	9,96 \pm 1,52*
Простая ГЭ + аденомиоз	23	29,4 \pm 7,3**	27,60 \pm 6,91*	10,72 \pm 1,76*
Комплексная ГЭ	36	80,3 \pm 8,9*	44,32 \pm 9,77*	12,41 \pm 1,85*
Комплексная ГЭ + аденомиоз	29	40,4 \pm 10,6***	41,52 \pm 10,32*	12,02 \pm 2,43*

Примечание: звездочками показана достоверность различий ($p < 0,05$); * - по отношению к контролю, ** - при сравнении групп с простой ГЭ без и на фоне аденомиоза, *** - при сравнении групп с комплексной ГЭ без и на фоне аденомиоза.

Характерные тенденции изменений отмечены и при исследовании неспецифических протеиназ и их ингибиторов в маточных смывах обследованных женщин (табл.2). Активность эластолитических ферментов при простой ГЭ достоверно уве-

личивалась в 7,5 раз и при комплексной гиперплазии была уже в 9 раз выше контроля. Уровень трипсиноподобных протеиназ был достоверно повышен в 2,5 раза при простой ГЭ, а при комплексной гиперплазии – в 3 раза.

Таблица 2

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	2,6 \pm 0,4	11,3 \pm 1,3	174,2 \pm 14,5	88,1 \pm 16,1
Простая ГЭ	41	19,8 \pm 3,3*	28,1 \pm 4,8*	226,9 \pm 33,5*	23,2 \pm 4,9*
Простая ГЭ + аденомиоз	23	21,4 \pm 6,3*	29,1 \pm 4,6*	162,4 \pm 29,1*	9,8 \pm 3,3*
Комплексная ГЭ	36	24,3 \pm 5,5*	36,4 \pm 6,3*	192,7 \pm 26,85*	31,3 \pm 13,0*
Комплексная ГЭ + аденомиоз	29	22,7 \pm 5,0*	33,4 \pm 3,4*	155,8 \pm 27,8*	27,3 \pm 11,8*

Примечание: звездочками показана достоверность различий ($p < 0,05$); * - по отношению к контролю, ** - при сравнении групп с простой ГЭ без и на фоне аденомиоза, *** - при сравнении групп с комплексной ГЭ без и на фоне аденомиоза.

Антитриптическая активность, характеризующая способность ингибировать трипсиноподобные протеиназы, в маточных смывах существенно не менялась. После некоторого повышения при простой ГЭ происходило ее снижение до значений контроля при комплексной гиперплазии эндометрия. В тоже время, кислотостабильные ингибиторы протеиназ, которые представлены местно секретируемыми ингибиторами, достоверно снижались при простой и комплексной гиперплазии в 2-3. Оценивая в целом реак-

цию протеиназ-ингибиторной системы при гиперплазиях эндометрия следует отметить развитие дисбаланса, который проявляется увеличением активности протеиназ при относительном или абсолютном дефиците ингибиторов протеиназ.

Развитие гиперплазии эндометрия на фоне аденомиоза не приводило к существенному изменению уровней изученных показателей протеиназ ингибиторной системы. Следует подчеркнуть, что наличие аденомиоза при сочетании с простой гиперплазией

эндометрия сопровождалось более выраженным снижением ингибиторного потенциала маточных смывов, а сочетание аденомиоза с комплексной ГЭ проявлялось тенденцией к снижению активности как протеиназ, так и их ингибиторов.

Анализируя полученные результаты следует отметить, что при аденомиозе меняются морфофункциональные свойства как эктопического, так и эутопического эндометрия [5]. Причем, на основании изучения и обобщения современных данных о механизмах формирования патологии эндометрия, аденомиоза и эндометриоза Brosens I. и Benagiano G. (2011) [9] выдвинута теория единых механизмов развития аденомиоза и эндометриоза “Endometrium and Inner Myometrium Dysfunction Syndrome” (EIMDS), согласно которой эти два состояния рассматриваются как фенотипы одного и того же нарушения. Причем ведущее значение в этой теории придается нарушениям локальных регуляторных механизмов в эндометрии, где кроме гормональных изменений большое внимание уделяется лейкоцитам и медиаторам воспалительного процесса. Эти результаты сочетаются с данными ряда других исследований, показывающих, что инвазивный рост эктопического эндометрия при аденомиозе осуществляется при активном участии протеолитических ферментов [1,11], и что протеиназы могут играть активную роль в развитии гиперплазии эндометрия [6].

На основании полученных нами результатов складывается представление, что при сочетании с простой гиперплазией эндометрия наличие аденомиоза может служить дополнительным фактором, потенцирующим изменения эндометрия, усиливающим процесс альтерации и как следствие воспалительные изменения. При комплексной гиперплазии сочетание с аденомиозом, напротив, в некоторой степени уменьшает внутриматочные изменения, что можно объяснить более интенсивным процессом повреждения миометрия.

ВЫВОДЫ

1. Формирование гиперплазии эндометрия сопровождается локальной активацией провоспалительных цитокинов и сопровождается развитием дисбаланса в состоянии местных протеиназ и их ингибиторов, который проявляется увеличением активности протеиназ и угнетением активности ингибиторов. Изменения более выражены при комплексной гиперплазии эндометрия.

2. При развитии гиперплазии на фоне аденомиоза местные изменения цитокинов и компонентов протеиназ-ингибиторной системы находятся на уровне показателей соответствующей формы гиперплазии эндометрия. Это может свидетельствовать о том, что наличие аденомиоза незначительно влияет на местные изменения изученных показателей, которые в первую очередь отражают характер изменений в эндометрии при гиперплазии.

3. Рост активности протеиназ, провоспалительных цитокинов и угнетение активности местно синте-

зируемых кислотостабильных ингибиторов протеиназ отражают характер воспалительного процесса в эндометрии и может свидетельствовать о возможном присутствии воспалительного компонента в очагах как эктопического, так и эутопического эндометрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамян Л. В. Система протеолиза в генезе аденомиоза / Адамян Л. В., Гаврилова Т. Ю., Степанян А. А., Яровая Г. А. // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 5. – С. 22-25.

2. Адамян Л.В. Изучение экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) при сочетанных доброкачественных заболеваниях эндометрия (миома матки, аденомиоз, гиперплазия эндометрия) / Адамян Л.В., Коваленко Н.А., Марченко И.А., Гусаева Х.З. // Проблемы репродукции, 2007. – № 4. – С.6-10.

3. Дамиров М.М. Аденомиоз: клиника, диагностика и лечение. // М.: ООО «Бином-Пресс», 2004, – 316 с.

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

5. Молекулярно-биологические особенности эктопического и эутопического эндометрия при генитальном эндометриозе / Зайратьянц О.В., Адамян Л.В., Андреева Е.Н. и соавт. // Архив патологии. – 2010. – № 5. – С.6-12.

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

7. Коваленко Е.П. Гиперплазия эндометрия и воспаление: оценка лейкоцитарной инфильтрации и уровня провоспалительных цитокинов / Е.П.Коваленко, Т.Ф. Татарчук, А.В.Кубышкин, Т.Г.Филоненко // Здоровье женщины. – 2011. – №7 (63). – С.142-145.

8. Сидорова, И. С. Клинико-морфологические параллели и молекулярные механизмы стромально-паренхиматозных взаимоотношений при миоме матки : научное издание / И. С. Сидорова, Е. А. Коган, А. Л. Унанян // Молекулярная медицина . – 2009 . – №1. – С. 9-15.

9. Brosens I, Benagiano G. Endometriosis, a modern syndrome // Indian J Med Res. – 2011. – v.133. – p.581-593.

10. Kovalenko Ye. Can inflammation take part in development and progression of endometrial hyperplasia? / Kovalenko Ye., T. Tatarchuk, A. Kubyshkin, T. Filonenko // 14-th World congress on controversies in obstetrics, gynecology & infertility (COGI).-Monduzzi Editoreale.-2012.-p.237-240.

11. Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis / Wu MH, Shoji Y, Wu MC. et al. // Am. J. Pathol. - 2005. -v.167(4).-p.1061-1069.