

УДК 618.145-007.61:577.27:57.016.4

ПОТАПОВА Л.В., ЧЕХУНОВА А.А.

Харьковский национальный медицинский университет,
кафедра акушерства и гинекологии №1,
г. Харьков

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ И КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

В статье представлено изучение иммунопатогенетических механизмов развития заболевания, изучение регуляторных молекул и клеток, механизмов их действия при наружном генитальном эндометриозе.

Материалы и методы. *Обследовано 60 пациенток репродуктивного возраста с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ). Контрольную группу составили 30 здоровых фертильных женщин.*

Результаты исследования. *У больных НГЭ в популяции Т-лимфоцитов наблюдалось достоверное снижение содержания общих Т-лимфоцитов (CD3+) и достоверное содержание CD4+ лимфоцитов и ФГА-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов в сравнении с контрольной группой.*

В субпопуляциях лимфоцитов у больных НГЭ отмечалось достоверное повышение содержания Th2-клеток, тенденция к снижению содержания Th1-клеток, тенденция к повышению Treg-клеток. В этой группе больных отмечается дисбаланс в соотношении Th1/Th2-лимфоцитов и Th1/Treg-лимфоцитов, обусловленный повышением относительно содержания среди Th-лимфоцитов Th2-клеток и Treg и снижением Th1.

Выводы. *Полученные данные указывают на то, что у пациенток с НГЭ имеет место дисбаланс в субпопуляциях Т-хелперов, регулирующих и контролирующих развитие гуморальных и клеточных иммунных реакций.*

У больных НГЭ наблюдается дисбаланс в выработке основных регуляторных цитокинов, что, по-видимому, является одной из причин дисрегуляции иммунных реакций.

У больных эндометриозом имеются нарушения, включающие изменения регуляторных молекул и клеток их механизмов, приводящих к иммунологическим нарушениям

Ключевые слова: *Т-хелперы, Т-регуляторные клетки, наружный генитальный эндометриоз, цитокины.*

Эндометриоз занимает ведущее место среди пролиферативных заболеваний органов малого таза [4]. Частота встречаемости среди женщин репродуктивного возраста составляет 10 %, у 30-50% женщин с бесплодием и / или хронической тазовой болью.

В основе патофизиологии заболевания лежит воспалительный процесс, вызванный распространением эндометриоидных клеток за пределы слизистой оболочки матки, а также изменения в других физиологических процессах: повышение клеточной адгезии, пролиферации, ангиогенеза, нарушение апоптоза, увеличение окислительного стресса, повышение биосинтеза стероидных гормонов [1, 7].

В результате перечисленных патофизиологических изменений клетки эндометрия выживают и размножаются в экстраперитонеальных участках [1].

Несмотря на то, что в настоящее время активно изучаются вопросы рецепторной активности очагов эндометриоза, общий и локальный иммунитет, предложены биомаркеры эндометриоза, не один из них не показал диагностической значимости и возможности выявления рецидивов. Осложняет проблему диагностики эндометриоза отсутствие неинвазивных методов диагностики эндометриоза - «золотым» стандартом постановки диагноза является лапароскопия с последующим гистологическим исследованием удаленных биоптатов.

В соответствии с консенсусом Всемирного общества по эндометриозу (World Endometriosis Society), создание неинвазивной надежной диагностики нарушений генитального эндометриоза является одной из приоритетных задач научных исследований в области гинекологии [8].

Таким образом, представляется актуальным исследование иммунопатогенетических механизмов развития заболевания, изучение содержания регуляторных молекул и клеток, механизмов их действия при эндометриозе.

Несмотря на то, что научные взгляды последних лет поддерживают иммунологическую концепцию патогенеза эндометриоза, одним из важнейших и не решенных аспектов патогенеза эндометриоза является недостаточное понимание функционально различных Т-хелперов иммунорегуляторных (Th 1/Th 2 / Treg/Th17) клеток, что является необходимым для лучшего представления в иммунологических нарушениях патогенезе.

ЦЕЛЮ работы явилось определение характера и степени иммунных нарушений у больных наружным генитальным эндометриозом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследования включены 60 пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ). Средний возраст обследованных составил $32,3 \pm 6$ лет. Контрольную группу составили 30 здоровых фертильных женщин.

Включение пациенток в клиническое исследование проводилось после получения информированного согласия. Критериями включения были: фертильный возраст, гистологически подтвержденный диагноз НГЭ, для пациенток с миомой матки -отсутствие НГЭ по данным лапароскопии. Критерии исключения: прием гормональных препаратов в течении 6 месяцев до операции, воспалительные заболевания органов малого таза, наличие инфекции передающейся половым путем, тяжелой соматической, онкологической и эндокринной патологии.

Ведущей жалобой больных НГЭ были боли внизу живота как циклического, так и ациклического характера у 53 (88,3 %) больных. У 49 (81,7 %) больных встречалась дисменорея. Тазовые боли, не связанные с менструацией, отмечали 45 (75 %) больных, иррадиация боли в

крестец и поясницу имела место у 11 (18 %) пациенток. Жалобы на бесплодие предъявляли 43 (71,6 %) больных НГЭ, причем первичное бесплодие наблюдалось почти в 2 раза чаще у 29 (48,3 %), чем вторичное 14 (23,3%).

Диагноз НГЭ был выставлен на основании клиничко-инструментального обследования, диагностической лапароскопии и подтвержден гистологически. Эндометриоз яичников диагностированы в 39 (65%), ретроцервикальный эндометриоз у 17 (28,3 %), поверхностный эндометриоз яичников у 25 (41,7%). У 48 (80%) больных отмечалась сочетанная локализация эндометриозных очагов. Во время лапароскопической операции оценивали степень распространения патологического процесса, локализацию и размер эндометриозных гетеротопий, глубину инвазии, а также выраженность спаечного процесса. Стадию НГЭ определяли, используя классификацию Американского общества фертильности (r-AFS) 1996 г. Согласно данной классификации все пациентки были разделены на 2 клинических группы:

- I группа -30 больных с I-II стадией НГЭ
- II группа -30 больных с III- IV стадией НГЭ

Программа иммунологических исследований включала оценку системного иммунитета и цитокинового статуса.

Исследование фенотипического состава Th и Т-регуляторных клеток проводили методом проточной цитометрии на аппарате FACS-Calibur (США) с использованием моноклональных антител [3,5].

Для идентификации на клетках CD3, CD4, CD8, CD19,CD16 использовали соответствующие антитела меченные FITC. Для идентификации в цитоплазме Т-лимфоцитов маркерного белка Foxp3 (Treg - клетки), цитокинов ИЛ - 4 (Th2 - клетки), и ИНФ γ (Th1 - клетки) использовали моноклональные антитела Foxp3 - Alexa 488, ИЛ - 4 - PE, ИНФ γ - PC - 5 (Becton Dickinson, Becton Dickinson).

Пролиферативную активность лимфоцитов крови оценивали по урону спонтанной и ФГА индуцированной бласттрансформации клеток в культуре *in vitro* (РБТЛ) [6]. Определение цитокинов ИЛ - 1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ФНО- α , ИНФ- γ в культуральной среде определяли с помощью ИФА с использованием наборов ЗАТ «Вектор-Бест» (Россия).

Статическая обработка проведена с использованием программы Med Stat, соответственно рекомендаций С. Гланц [2].

При сравнении групп использовался критерий Манна-Уитни, различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

При изучении иммунитета у больных I клинической группы, не было выявлено каких либо существенных изменений в их иммунном статусе. У всех обследованных этих клинических групп в периферической крови определялось нормальное содержание Т-общих лимфоцитов ($CD3^+$) и

их субпопуляций Т-хелперов, в РБТЛ отмечался обычный ответ лимфоцитов на Т-клеточные митогены, что свидетельствует о высокой патентальной способности Т-лимфоцитов к развитию иммунных реакций.

У больных II клинической группы в популяции Т-лимфоцитов наблюдалось достоверное снижение содержания общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и достоверное снижение содержания $CD4^+$ лимфоцитов и ФГА-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов в сравнении с контрольной группой.

Таблица 1

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови в обследованных группах

Показатели	Контрольная группа	I группа	II группа
Лимфоциты %	28,0 ± 1,1 1,6 ± 0,1	30,1 ± 1,1 1,7 ± 0,2	29,6 ± 1,1 1,6 ± 0,1
CD3 ⁺ - кл., %	61,6 ± 1,8	59,8 ± 2,6	53,0 ± 1,7*
CD4 ⁺ - кл., %	39,1 ± 1,9	39,7 ± 1,94	35,4 ± 1,93*
CD8 ⁺ - кл., %	19,8 ± 1,1	17,2 ± 1,6	20,4 ± 1,6
CD19 ⁺ - кл., %	21,3 ± 1,09	23,8 ± 1,33	23,9 ± 1,32
CD16 ⁺ - кл., %	12,0 ± 1,19	11,8 ± 1,14	11,9 ± 1,13
РБТЛ на ФГА, %	58,8 ± 1,5	56,1 ± 1,4	20,1 ± 1,1*
Th1(ИНФγ), %	11,1 ± 1,17	9,7 ± 0,98	9,2 ± 0,94
Th2(ИЛ - 4), %	12,4 ± 1,43	14,3 ± 1,67	16,4 ± 1,78*
Treg(CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , Foxp3 ⁺), %	10,9 ± 1,04	10,8 ± 0,99	11,6 ± 0,93
Th1/Th2	0,89 ± 0,09	0,67 ± 0,07*	0,56 ± 0,06*
Th1/Treg	1,01 ± 0,11	0,89 ± 0,09	0,79 ± 0,10*
Th2/Treg	1,13 ± 0,14	1,32 ± 0,16*	1,41 ± 0,18

Примечание: * $p < 0,05$ - достоверность различий по отношению к контролю

В субпопуляциях лимфоцитов у больных II группы отмечалось достоверное повышение содержания Th2-клеток, тенденция к снижению содержания Th1-клеток, тенденция к повышению Treg-клеток. В этой группе больных отмечается дисбаланс в соотношении Th1/Th2- лимфоцитов и Th1/Treg-лимфоцитов, обусловленный повышением относительно содержания среди Th- лимфоцитов, Th2- клеток и Treg и снижением Th1.

Полученные данные указывают на то, что у пациенток II клинической группы имеет место дисбаланс в субпопуляциях Т-хелперов, регулирующих и контролирующих развитие гуморальных и клеточных иммунных реакций.

У пациенток I клинической группы наблюдалась лишь тенденция к повышению в пери-

ферической крови Th2- лимфоцитов и достоверное повышение индекса Th2- клеток / Treg- клеток, а также снижение индекса Th1/Th2-клеток.

Таким образом, исходя из полученных данных можно сделать вывод, что прогрессирование эндометриоза может быть обусловлено изменениями транскрипционной программы на уровне одного из этапов сигнального пути дифференцировки Т-хелперов, что способствует нарушению механизмов иммунологического контроля над разрастанием эктопий.

При изучении спонтанной цитокинпродуцирующей активности иммунокомпетентных клеток у больных наружным генитальным эндометриозом наше внимание было сосредоточено на цитокинах: ИЛ-1β, ИЛ - 2, ИЛ - 4, ИЛ - 6, ФНО-α, ИНФ-γ (табл.2).

Установлено, що в I клінічeskої групі лімфоцити не проявляють якої-либo дефектності по порівнянню з контрольною групою в секретії ІНФ- γ , ФНО- α , котрі, як відомо, мають інгібуючу та цитотоксическу активність у відношенні опухолевих та чужеродних кліток, а також ІЛ - 1 β , ІЛ - 2, ІЛ - 4 та ІЛ - 6, котрі грають ключову роль у розвитку імунних реакцій як клітинного, так і гуморального типів.

Установлено, що в I клінічeskої групі лімфоцити не проявляють якої-либo дефектності по порівнянню з контрольною групою в секретії ІНФ- γ , ФНО- α , котрі, як відомо, мають інгібуючу та цитотоксическу активність у відношенні опухолевих та чужеродних кліток, а також ІЛ - 1 β , ІЛ - 2, ІЛ - 4 та ІЛ - 6, котрі грають ключову роль у розвитку імунних реакцій як клітинного, так і гуморального типів.

Таблиця 2

Спонтанна цитокинпродуцируюа активність іммунокомпетентних кліток

Цитокини пг/мл	Контрольна група	I група	II група
ІЛ - 1 β	89,4 \pm 10,2	146,3 \pm 15,4*	159,7 \pm 14,9***
ІЛ - 2	-	-	61,5 \pm 1,0
ІЛ - 4	10,3 \pm 1,12	11,9 \pm 1,21	17,4 \pm 1,68***
ІЛ - 6	78,3 \pm 8,6	108,2 \pm 11,3*	145,9 \pm 11,6*
ФНО- α	102,8 \pm 10,6	104,7 \pm 15,5	181,3 \pm 16,4*
ІНФ- γ	9,9 \pm 1,21	8,9 \pm 0,89	8,6 \pm 0,87
ІЛ - 4/ ІНФ- γ	1,04 \pm 0,9	1,34 \pm 0,7	2,02 \pm 0,5

Примечание: * $p < 0,05$ - достовірність різниць по відношенню до контрольної групи.

** $p < 0,05$ - достовірність різниць по відношенню до I групи.

В вивченій групі, по порівнянню з контрольною групою спостерігається тенденція до підвищення спонтанної продукції ФНО- α ($p > 0,05$), а також достовірне підвищення спонтанної продукції іммунокомпетентними клітками ІЛ - 1 β в 1,6 рази, ІЛ - 6 в 1,4 рази ($p < 0,05$).

Уровні ІЛ - 2, ІЛ - 4, ІНФ - γ достовірно не відрізнялись від показателів контрольної групи ($p > 0,05$).

При вивченні цитокинового статусу у хворих II клінічeskої групи були виявлені наступні характерні особливості. У хворих по порівнянню з контрольною групою спостерігається достовірне підвищення ($p < 0,05$) продукції ІЛ - 1 β , ІЛ - 6, ФНО- α , а також відзначається спонтанна продукція ІЛ - 2 по порівнянню з групою контролю. Також відзначался дисбаланс між ІНФ - γ та ІЛ - 4, котрі є факторами, регулюючими розвиток імунних реакцій по гуморальному або Т - клітинному типу. Во II клінічeskої групі співвідношення ІЛ - 4/ ІНФ - γ було 2,02 \pm 0,5, в контролі 1,04 \pm 0,9.

Слід відзначити, що во II клінічeskої групі рівень ІЛ - 4 достовірно вище, ніж во I клінічeskої групі ($p < 0,05$), а також достовірною була різниця між індексом ІЛ - 4/ ІНФ- γ .

У пацієнток I клінічeskої групи індекс співвідношення ІЛ - 4/ІНФ- γ був відповідно 1,34 \pm 0,7 (1,04 \pm 0,9)* (* $p < 0,05$ по порівнянню з контрольною групою).

Отримані дані свідчать про те, що во II клінічeskої групі спостерігається дисбаланс у вироботці основних регуляторних цитокинів, що, по видимому, є однією з причин дисрегуляції імунних реакцій, котра та відзначається у хворих з зовнішнім генітальним ендометріозом.

ВИВОДИ

У хворих з ендометріозом існують порушення, включаючи зміни регуляторних молекул, та їх механізмів, що призводять до іммунологічних порушень.

Дальніше вивчення іммунопатогенетических механізмів, регулюючих імплантацію та інвазію ендометріоїдних кліток може привести до створення нових прогностических стратегій та методів терапії зовнішнього генітального ендометріоза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлев В.А. Апоптоз та проліферативна активність у ендометрії при перитонеальному ендометріозі [текст] / Бурлев В.А., Павлович С.В., Ільясова Н.А. // Бюлетень експериментальної біології та медицини. 2016. - № 141/2. - с. 65-68.
2. Гланц С. Медико-біологічeskа статистика / С. Гланц. - М.: изд-во Практика, 1999. - 459с.
3. Дамбаева С.В. Оцінка основних параметрів імунної системи з допомогою проточної ла-

- зерной цитометрии [текст] / С. В. Дамбаева, Д.В. Мазуров, С.В. Климова // Аллергия и иммунология. 2002.- Т.3, № 3. -с. 311-379.
4. Аномалии развития матки и влагалища в сочетании с эндометриозом: тактика ведения и хирургическая коррекция [текст] / Фархат К.Н., Адамян Л.В. // Акушерство и гинекология. 2016. - № 5. - с. 96-102
 5. Ханунова Л.М. Определение Th-1 и Th-2 клеток в периферической крови больных с красным плоским лишаем и влияние на них иммуномодулятора ликопида [текст] / Л.И. Ханунова, О.Ф. Рабинович, Б.В. Пинегин // Аллергия и иммунология. -1999. - № 6.-с.3-6.
 6. Щютт Х. Реакция бласттрансформации лимфоцитов [Текст] / Х. Щютт // Иммунологические методы; под ред. Г. Фримеля.- М. : Медицина, 1987.- с. 294-302
 7. Burney R. O., Giudice L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. Fertil. Steril.2012.№ 98 (3) p. 511-519
 8. Jonson N.P., Hummelskoj J.Word Endometriosis Society Montpellier Consortium. Consensus on current management of endometriosis. Hum. Reprod. 2013,28(6) p. 1552-68.

РЕЗЮМЕ

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНИХ МОЛЕКУЛ І КЛІТИН В ПАТОГЕНЕЗІ ЗОВНІШНЬОГО ГЕНІТАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ

ПОТАПОВА Л.В., ЧЕХУНОВА А.О.

В статті представлено вивчення імунопатогенетичних механізмів розвитку захворювання, вивчення регуляторних молекул і клітин, механізмів їх дії при зовнішньому генітальному ендометріозі.

Матеріали та методи. Обстежено 60 пацієнток репродуктивного віку із зовнішнім генітальним ендометріозом. Контрольну групу склали 30 здорових фертильних жінок.

Результати дослідження. У хворих зовнішнім генітальним ендометріозом в популяції Т - лімфоцитів спостерігалася достовірне зниження вмісту загальних Т - лімфоцитів (CD3⁺) і CD4⁺ лімфоцитів і ФГА - індукованої проліферативної активності лімфоцитів порівняно з контрольною групою.

В субпопуляціях лімфоцитів у хворих з ендометріозом спостерігалася достовірне підвищення вмісту Th2-клітин, тенденція до зниження вмісту Th1-клітин, тенденція до підвищення

Treg-клітин. В цій групі хворих спостерігається дисбаланс в співвідношенні Th1/Th2-лімфоцитів і Th1/Treg-лімфоцитів, обумовлений підвищенням вмісту серед Th-лімфоцитів Th2- клітин і Treg-клітин і зниженням Th1.

Висновки. Одержані дані вказують на те, що у пацієнток з ендометріозом має місце дисбаланс в субпопуляціях Т-хелперів, регулюючих і контролюючих розвиток гуморальних і клітинних імунних реакцій.

У хворих на ендометріоз є зміни регуляторних молекул, і їх механізмів, що приводять до імунологічних порушень.

У хворих на ендометріоз спостерігається дисбаланс у виробленні основних регуляторних цитокінів, що, вірогідно є однією з причин дизрегуляції імунних реакцій, яка і має місце у хворих на зовнішній генітальний ендометріоз.

Ключові слова: Т-хелпери, Т-регуляторні клітини, зовнішній генітальний ендометріоз, цитокіни.

SUMMARY

THE ROLE OF REGULATORY MOLECULES AND CELLS IN THE PATHOGENESIS OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

POTAPOVA L.V., CHEKHUNOVA A.A.

In the article the study of immunopathogenetic mechanisms of the development of disease is represented, study of regulatory molecules and cells, mechanisms of their action at external genital endometriosis.

Materials and methods. 60 patients of reproductive age with external genital endometriosis were examined. The control group consisted of 30 healthy fertile women of the same age.

Results of investigation. In patients with EGE in the population T - lymphocytes there was significant decrease in content of general T - lymphocytes (SD3⁺) and reliable content of SD4⁺ lymphocytes and FGA - induced proliferative activity of lymphocytes in comparison with a control group.

In subpopulations of lymphocytes in patients of the II group the reliable increase of the content Th2-cell, there is tendency to the decline of the content Th1-cells, tendency, to the increase of the Treg- cells was marked. The disbalance in the correlation Th1/Th2-limfotsitov and Th1/Treg-lymphocytes, conditioned by the increase in relation to maintenance among Th- lymphocytes of the Th2-

cells and Treg and the decline Th1, registers in this group of patients.

Finding is specified on that at the patients of the II clinical group a disbalance in T-helpers subpopulation takes place, which regulate and control the development of hormonal and cellular immune responses.

Conclusions. In patients with endometriosis have been present violations, including the changes of regulatory molecules and cells and their mechanisms resulting in immunological violations.

Finding testify that in the II clinical group there is a imbalance in production of basic regulatory cytokines, that, on visible, is one of reasons of dysregulation of immune reactions, which is marked at patients with external genital endometriosis.

Keywords: T-helpers, T-regulators cells, external genital endometriosis cytokines.