

На правах рукописи

**СУВОРКИНА ЕЛЕНА ЕФИМОВНА**

**ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
В ПАТОГЕНЕЗЕ БЫСТРОРАСТУЩЕЙ  
ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ**

14.00.01. – акушерство и гинекология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Иваново – 2003

Работа выполнена в ГУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им.В.Н. Городкова» МЗ РФ

Научный руководитель – Заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор  
Посисеева Любовь Валентиновна

Научный консультант - доктор медицинских наук, профессор  
Сотникова Наталья Юрьевна

Официальные оппоненты: - член-корр. РАМН, доктор  
медицинских наук, профессор  
Вихляева Екатерина Михайловна  
-доктор медицинских наук, профессор  
Качалина Татьяна Симоновна

Ведущее учреждение – Московский государственный медико-стоматологический университет

Защита состоится *22* мая 2003 года в *11* часов на заседании диссертационного совета К.208.028.01 при ГУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ по адресу: 153731, г.Иваново, ул.Победы, д.20.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ

Автореферат разослан *24 апреля* 2003 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат медицинских наук

*Ласова* И.А.Панова

2003-А  
7111

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Актуальность проблемы лейомиомы матки определяется прежде всего высокой и продолжающейся увеличиваться частотой данного заболевания среди женщин (Е.М.Вихляева, 1997; Г.И.Брехман, 2000; А.Л.Тихомиров, 1998) Заболеваемость лейомиомой повышается с возрастом. Её пик приходится на период менопаузы, достигая апогея в 45 – 50 лет (P.Velebil et al, 1995). Средний возраст выявления лейомиомы матки составляет  $32,8 \pm 0,47$  года, а показания к оперативному вмешательству возникают в возрасте  $44,4 \pm 0,29$  года (Е.М.Вихляева и соавт., 1997). В последнее время все чаще говорят об омоложении этой патологии. При маточных кровотечениях у подростков и молодых женщин лейомиома матки обнаруживается в 5 – 7 % случаев (R.Fields, L.S.Neinstein, 1996). До 75% больных лейомиомой матки подвергаются оперативному лечению. Развитие современных хирургических технологий привело к тому, что у 8 – 9 из 10 женщин производится радикальная операция на матке (Г.А.Савицкий, 2000). Это приводит к утрате женщинами репродуктивной и менструальной функций, выраженным гормональным нарушениям в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системе, значительным вегетососудистым и психоэмоциональным расстройствам (Е.М.Вихляева и соавт., 1997). В структуре показаний к оперативному вмешательству до 54,8 % приходится на быстрый рост и большие размеры опухоли (Г.А.Савицкий, 2000). Поэтому проблема патогенеза быстрорастущей лейомиомы матки привлекает к себе внимание исследователей. Так, по данным Г.А.Савицкого (2000) гипертрофия миоцитов миомы является одним из основных процессов, влияющих на скорость увеличения массы опухоли. Быстрому росту опухоли способствуют изменения рецепторного аппарата, выраженные нарушения гемодинамики малого таза с развитием относительной ишемии матки, наличие очагов хронической инфекции, гормональные сдвиги, наследственная предрасположенность (Е.М. Вихляева и соавт., 1997). И все же многие аспекты остаются малоизученными. Интересным и перспективным представляется изучение роли иммунных механизмов в патогенезе быстрого темпа роста опухоли.



### **Цель работы:**

На основании определения особенностей функционального состояния иммунокомпетентных клеток и содержания цитокинов в периферической крови и перитонеальной жидкости больных с быстрорастущей лейомиомой матки установить роль иммунных механизмов в патогенезе быстрого темпа роста опухоли и с учетом полученных данных разработать новые способы прогнозирования данного заболевания.

### **Задачи исследования:**

1. Определить особенности соматического и репродуктивного здоровья женщин с быстрым темпом роста лейомиомы матки.
2. Оценить популяционный состав и функциональную активность лимфоцитов и нейтрофилов, а также содержание цитокинов в периферической крови больных с быстрорастущей лейомиомой матки.
3. Определить популяционный состав и функциональную активность лимфоцитов и макрофагов, а также содержание цитокинов в перитонеальной жидкости больных с быстрорастущей лейомиомой матки.
4. Установить влияние *in vitro* антигенов ткани быстрорастущей лейомиомы матки на параметры активации иммунокомпетентных клеток периферической крови и перитонеальной жидкости у здоровых женщин и больных с быстрорастущей лейомиомой матки.
5. На основании выявленных особенностей системного и локального иммунитета у больных с быстрорастущей лейомиомой матки разработать иммунологические критерии быстрого темпа роста опухоли

### **Научная новизна исследования**

Впервые установлены новые механизмы иммунного ответа женского организма в периферической крови и перитонеальной жидкости, обуславливающие быстрые темпы роста лейомиомы матки, реализуемые преимущественно на локальном уровне.

Выявлено повышение содержания незрелых лимфоцитов и ростовых факторов, снижение уровня цитотоксических лимфоцитов в периферической крови; снижение содержания Т-хелперов, повышение количества незрелых лимфоцитов, активация синтеза ростовых цитокинов, угнетение функциональной активности макрофагов в перитонеальной жидкости

В опытах *in vitro* установлено стимулирующее влияние антигенов ткани миоматозного узла на параметры активации иммунокомпетентных клеток здоровых женщин как в периферической крови, так и в перитонеальной жидкости. У больных с

быстрорастущей лейомиомой матки иммунный ответ клеток перитонеальной жидкости на миоматозные антигены отсутствует, а в периферической крови – выражен незначительно.

#### **Практическая значимость работы**

Гинекологической практике предлагается при диспансеризации больных с лейомиомой матки использовать новый способ прогнозирования быстрого темпа роста опухоли путем определения в периферической венозной крови содержания CD38+ лимфоцитов с целью выработки оптимальной тактики ведения больных, своевременного назначения адекватной консервативной терапии.

#### **Положения, выносимые на защиту**

Быстрый темп роста лейомиомы матки сопровождается разнонаправленными изменениями иммунного ответа женского организма, проявляющимися на системном уровне преимущественно угнетением цитотоксического звена, а на локальном уровне угнетением активности клеток фагоцитарного ряда.

Антигены ткани миоматозного узла стимулируют развитие иммунного ответа у здоровых женщин, в меньшей степени влияют на параметры функциональной активности иммунокомпетентных клеток периферической крови больных с быстрорастущей лейомиомой матки, не оказывая влияния на активацию иммунокомпетентных клеток перитонеальной жидкости.

#### **Внедрение результатов исследования в практику**

Разработанный «Способ прогнозирования роста лейомиомы матки» (приоритетная справка №2002119498 от 26.07.02.) внедрен в практику работы гинекологической клиники и консультативно-диагностической поликлиники ГУ «НИИ материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на VI-ой Всероссийской научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2002); итоговых научных сессиях ГУ «Ивановского НИИ материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ (2002, 2003).

#### **Личное участие автора**

Автором самостоятельно проводился набор материала по теме диссертации, систематизация и компьютерная обработка полученных результатов. Автор участвовала в проведении клинических и лабораторных исследований.

### Публикации

По теме диссертации опубликованы 13 печатных работ.

### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации.

Библиографический указатель включает 90 отечественных и 44 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 8 рисунками.

### Содержание работы

#### Материал и методы исследования.

Работа выполнена на базе ГУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н.Городкова» МЗ РФ (директор, з.д.н., д.м.н., профессор Л.В.Посисеева).

Обследование больных осуществлялось в 1 гинекологическом отделении (зав. И.А.Колганова), отделении эндоскопической хирургии (зав. В.Н.Романов), исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии (зав. лаб., д.м.н., профессор Н.Ю.Сотникова), инфекционного анализа (зав. лаб., к.м.н. А.В.Голубев), патоморфологии и электронной микроскопии (зав. лаб., д.м.н. Л.П.Перетятко).

Обследованы 146 женщин: 84 женщины с быстрорастущей лейомиомой матки (основная группа), 25 фертильных женщин, не имевших гинекологической патологии, поступивших на плановую хирургическую стерилизацию по социальным показаниям согласно приказа МЗ РФ № 303 от 1993 года (контрольная группа), 37 женщин с лейомиомой матки стабильных размеров (группа сравнения)

В схему обследования входили общеклинические (по общепринятой схеме предоперационного обследования), инструментальные (раздельное диагностическое выскабливание эндометрия и эндоцервикса), эндоскопические (гистероскопия – по показаниям), электрофизиологические (УЗИ, ЭКГ), патоморфологические, иммунологические, иммуноферментные исследования.

Материалом для исследования служили: периферическая венозная кровь, перитонеальная жидкость, биоптаты цервикального канала, эндометрия и миометрия, содержимое цервикального канала и уретры. Перитонеальную жидкость получали во время оперативного вмешательства при лапароскопии или лапаротомии.

#### Иммунологические методы:

- определение экспрессии CD-маркеров на поверхности лимфоцитов периферической крови и перитонеальной жидкости методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan («Becton Dickinson,» USA). Для исследования использовали следующие моноклональные антитела: анти-CD3, анти-CD8, анти-CD16, анти-CD20, анти-CD25, анти-CD71, анти-CD11b, анти-CD95, конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), и анти-HLA - DR, анти-CD38, анти-CD4, конъюгированные с фикоэритрином (PE) («МедБиоСпектр», Москва);
- определение основных классов иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM ) методом радиальной иммунодиффузии по Манчини;
- определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) нефелометрическим методом;
- определение спонтанной (НСТ) и стимулированной зимозаном (НСТз) бактерицидной активности нейтрофилов периферической крови и макрофагов перитонеальной жидкости в реакции восстановления нитротетразолиевого синего (НСТ-тест) с расчетом относительного количества НСТ-позитивных клеток и индекса активности восстановления красителя;
- определение индекса нейтрофильной активации (ИНА) по формуле:  $ИНА = \frac{НСТз - НСТ}{НСТ} \times 100\%$ ;
- определение спонтанной адгезионной активности нейтрофилов и макрофагов;
- определение выработки лимфоцитами миграцию ингибирующего фактора (МИФ) в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином (ФГА) в прямом капиллярном тесте (Difco, USA) с расчетом миграционного индекса (МИ).

Кроме того, был проведен эксперимент по изучению иммуногенных свойств ткани миоматозного узла. С этой целью из ткани быстрорастущей лейомиомы стандартным методом получали ассоциированные с опухолью антигены. Для выявления влияния опухолевых антигенов (ОАГ) на экспрессию активационных маркеров лимфоцитами периферической крови и перитонеальной жидкости и продукцию ими МИФ, а также на адгезионную и бактерицидную активность фагоцитов периферической крови и перитонеальной жидкости, к обогащенной популяции клеток добавляли равный объем антигенов и инкубировали, после чего оценивали соответствующие показатели

#### Имуноферментные методы

Определение содержания основного фактора роста фибробластов (оФРФ) в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости производилось методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием

набора фирмы Immunos (Albany, CA 94706) на приборе «Multiscan EX» (Labsystems, Finland) Чувствительность используемой системы – 0,488 ng/ml.

Определение содержания интерлейкина-2 (ИЛ-2) в сыворотке крови и в перитонеальной жидкости производилось методом твердофазного ИФА с использованием набора фирмы Diaclone (France) на приборе «Multiscan EX» (Labsystems, Finland) Чувствительность используемой системы – 10 ng/ml.

Определение маркеров возбудителей хламидийной, уреоплазменной, трихомонадной, кандидой, цитомегаловирусной и герпетической инфекций производилось методами ИФА с использованием реактивов и технологии фирмы “Labsystems”(Finland) на диагностическом комплексе “Labsystems iEMS Reader MF”. Определялись специфические IgM к возбудителям хламидийной, кандидной, цитомегаловирусной и герпетической инфекций. Для диагностики состояния уреоплазменной и трихомонадной инфекций исследовались специфические IgG. Кроме того, определялись антигены возбудителей хламидийной, уреоплазменной и трихомонадной инфекций.

#### Морфологические методы.

Производилась обзорная гистология полученных во время операции материалов. Для этого исследуемый материал фиксировался в 10%-ном нейтральном формалине в течение 72 часов. После стандартной парафиновой проводки готовились срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивались гематоксилином Эрлиха с докраской эозином и заключались в бальзам В обзорных препаратах изучалась межтучная ткань, сосудистое русло и мышечный компонент.

#### Программное обеспечение исследований.

Обработка результатов производилась с использованием пакета прикладных программ – “Statistica – 5.0.” в системе Windows 2000. Материалы исследований обрабатывались методом вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel из комплекта Microsoft Office 2000.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Клиническая характеристика женщин основной и контрольной групп выявила следующие особенности у больных с быстрорастущей лейомиомой матки. Возраст больных основной группы варьировал в пределах от 26 до 53 лет. Средневозрастные показатели составили  $44,01 \pm 0,55$  лет. Данные литературы о среднем возрасте, в котором возникают показания к оперативному вмешательству по поводу лейомиомы матки, согласуются с приводимыми в наших исследованиях (Е М Вихляева, 1997).



Поскольку более половины женщин в обеих группах были в возрасте 35-45 лет, это позволяет считать группы обследованных практически сопоставимыми по возрасту.

При анализе характера менструальной функции женщин с быстрорастущей лейомиомой матки достоверно чаще по сравнению с контролем отмечались нарушения по типу нерегулярных (13,1%), обильных и длительных (20%), болезненных (36,9%) менструаций, укорачивался менструальный цикл и увеличивалась средняя длительность менструального кровотечения. Репродуктивный анамнез больных с быстрорастущей лейомиомой матки отличался большей частотой невынашивания беременности (15,5%,  $p < 0,001$ ) и бесплодия (8,4%,  $p < 0,02$ ), что согласуется с данными литературы (Л.В.Посисеева, 1991). С целью предотвращения нежелательной беременности женщины основной группы значительно чаще по сравнению с контролем использовали ВМК (42,9%,  $p < 0,01$ ). Это, по-видимому, послужило неблагоприятным фоном для образования и роста лейомиомы матки (А.Л.Тихомиров, 1998).

Иммуноферментный анализ, проведенный в период предоперационного обследования, установил высокую частоту положительных результатов исследований на уреоплазмоз (87,5%), кандидоз (87,5%), трихомониаз (71,4%), хламидиоз (29,2%) как в группе больных с быстрорастущей лейомиомой матки, так и в группе женщин, поступивших на стерилизацию, в то время как показатель Ig M к ВПГ II типа в основной группе был достоверно выше, чем в контрольной ( $p < 0,001$ ).

Гинекологический анамнез больных с быстрорастущей лейомиомой матки характеризовался высокой частотой эрозии шейки матки, леченой методом диатермоили криодеструкции (23,8%,  $p < 0,01$ ). Данная патология была выявлена у женщин основной группы в 4,8% случаев и в период предоперационного обследования. Женщины контрольной группы гинекологической патологии не имели. Соматический анамнез пациенток с быстрорастущей миомой лейоматки был чаще по сравнению с контролем отягощен детскими бактериальными и вирусными инфекциями (9,5%,  $p < 0,01$ ). При клиническом обследовании в дооперационном периоде у 97,6% женщин основной группы была выявлена различная экстрагенитальная патология. В структуре ее преобладали: артериальная гипертензия – 71,4%, варикозное расширение вен нижних конечностей – 56%, вторичная анемия – 39,3%, миокардиодистрофия – 20,2%, ожирение – 16,7%, остеохондроз позвоночника – 15,5%, что согласуется с данными литературы (Г.И.Брехман, 2000).

В ходе анализа клинических проявлений в группе женщин с быстрорастущей лейомиомой матки нами отмечена триада симптомов – НМФ (57,1%), боли внизу

живота (27,4%), дизурические явления (23,8%) Каждая четвертая из всех обследованных предъявляла все три жалобы одновременно.

При гистологическом исследовании эндометрия, полученного путем диагностического выскабливания в первые дни менструального цикла у больных с быстрорастущей лейомиомой матки, секреторный эндометрий выявлен в 13,1% случаев, пролиферативный – в 26,2%, гиперпластический процесс эндометрия – в 36,9%, хронический эндометрит – в 13,1%. Эти данные свидетельствуют о нарушении рецепторной и секреторной функции эндометрия у большинства фертильных женщин позднего репродуктивного возраста с лейомиомой матки, что является одной из причин невынашивания беременности в анамнезе (Л.В.Посисеева, 1991)

Изучение темпов роста общих размеров матки позволило отметить, что у каждой третьей обследованной матка увеличилась за год на 4-5 недель, у 66,7% – на 6 недель и более. Диагноз лейомиомы матки поставлен не позднее, чем за год до оперативного вмешательства, у 41,7% больных с быстрорастущей лейомиомой матки, более года – у 58,3%. К моменту оперативного вмешательства общие размеры лейомиомы матки в основной группе соответствовали 10-11 недельному сроку беременности у 23,8 %, у остальных 76,2% были более 12 недель. У подавляющего большинства больных с быстрорастущей лейомиомой матки выявлена субсерозно-интрамуральная локализация узлов (90,5%), интрамурально-субмукозная – у 9,5 %. Показанием к оперативному лечению служил быстрый рост лейомиомы матки и сопровождающие его нарушения менструальной функции, приводящие к анемии, выраженные боли в результате отека узлов, нарушения функции смежных органов за счет сдавления их маткой больших размеров, что является общепризнанным основанием для оперативного лечения (Г.А.Савицкий, 2000). Больным с быстрорастущей лейомиомой матки была выполнена в 82,5% случаев надвлагалищная ампутация матки, в 15% – экстирпация матки, в 2,5% – консервативная миомэктомия ввиду молодого возраста и нереализованной репродуктивной функции. Результат исследования операционного материала – лейомиома матки, которая сочеталась с гиалинозом в 53,75%, с отеком в 22,5 %, с некрозом в 6,25 %. При исследовании удалённых маточных труб (у 92,5 % больных) обнаружены явления хронического сальпингита в 40,5%, мелкокистозные перерождения яичников диагностированы в 36,25% случаев при их резекции или полном удалении у женщин старшей возрастной группы, что соответствует литературным данным (Е.М.Вихляева, 1997).

Сравнение иммунологических параметров производилось у всех трех групп обследованных женщин (основная, контрольная и группа сравнения). При этом

отмечено, что быстрый темп роста лейомиомы сопровождался иммунными нарушениями, причем ряд этих нарушений был характерен в целом для лейомиомы матки, а определенные иммунологические изменения отмечались только у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки.

При сравнении особенностей популяционного состава и активации лимфоцитов периферической крови женщин трех групп нами было установлено, что высокое содержание ЕК и повышенная экспрессия маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов были характерны в целом для женщин с лейомиомой матки, а не являлись отличительным признаком быстрорастущей лейомиомы. Как известно, основной функцией естественных киллеров является лизис трансформированных, инфицированных или пролиферирующих клеток. Это определяет важную роль ЕК в противоопухолевом и противинфекционном иммунитете (А.А.Ярилин, 1999). В литературе имеются данные, указывающие на то, что одним из факторов, индуцирующих развитие лейомиомы матки, может быть инфекция (С.Е.Visser et al., 1995). По-видимому, повышенное содержание ЕК в периферической крови больных с лейомиомой матки может быть непосредственно связано с высокой частотой выявленных нами маркеров вирусной инфекции, что может свидетельствовать об особой роли этих возбудителей в процессе быстрого роста лейомиомы матки. Отмечаемый нами высокий уровень активации лимфоцитов, проявляющийся увеличением маркеров ранней и поздней стадий активации клеток (CD25+ и HLA-DR+), также может быть обусловлен стимуляцией клеток инфекционным агентом. Таким образом, высокое содержание активированных лимфоцитов и естественных киллеров в периферической крови женщин с лейомиомой матки независимо от темпа роста, по-видимому, можно расценивать как активацию системного иммунного ответа клеточного типа на стимуляцию инфекционным агентом.

У женщин с быстрорастущей лейомиомой отмечалось снижение экспрессии активационной молекулы CD71. Известно, что CD71-молекула представляет собой рецептор для трансферрина и экспрессируется на поверхности пролиферирующих клеток, являясь маркером более поздних этапов активации лимфоцитов (А.А.Ярилин, 1999). По-видимому, при быстрорастущей лейомиоме матки высокий уровень активации лимфоцитов периферической крови не сопровождается пролиферацией активированных клонов лимфоцитов, что свидетельствует о нарушении баланса между уровнем активированных и пролиферирующих клеток.

При изучении фенотипического профиля лимфоцитов периферической крови нами было выявлено два показателя, являющихся маркерами быстрого роста лейомиомы

матки, а именно – низкое содержание CD8+ лимфоцитов (ЦТЛ) и высокий уровень CD38+ лимфоцитов. Функцией ЦТЛ является удаление мутантных, трансформированных, инфицированных вирусом клеток собственного организма (А.А.Ярилин, 1999). По-видимому, снижение содержания данной популяции цитотоксических клеток при лейомиоме матки ведет к нарушению своевременной элиминации трансформированных клеток и может быть одним из механизмов, обуславливающих быстрый рост лейомиомы CD38-молекула, уровень экспрессии которой повышается при быстром темпе роста лейомиомы, экспрессируется сначала на самых ранних стадиях дифференциации лимфоцитов, являясь маркером незрелых клеток, затем на промежуточных этапах созревания клетки теряют ее, но на зрелых лимфоцитах, находящихся на поздних стадиях активации, экспрессия CD38-молекулы вновь возрастает (Т.Ф. Tedder et al., 1985) В нашем случае увеличение содержания CD38+ клеток в периферической крови женщин с быстрорастущей лейомиомой матки происходит именно за счет пула незрелых клеток.

Полученные нами данные о повышении сывороточного уровня ЦИК позволяют говорить об активации реакций гуморального звена иммунитета у женщин с лейомиомой матки независимо от темпа роста.

Снижение продукции МИФ в ответ на стимуляцию ФГА у женщин с лейомиомой матки свидетельствует о нарушении выработки Т-лимфоцитами медиаторов иммунного ответа МИФ участвует в мобилизации фагоцитирующих клеток в очаг инфекции (В.С.Смирнов, И С Фрейдлин, 2000). Таким образом, угнетение продукции МИФ периферическими лимфоцитами в ответ на стимуляцию митогеном позволяет говорить о нарушении развития эффекторных стадий специфического иммунного ответа у женщин с лейомиомой матки независимо от темпов роста.

Состояние фагоцитарного звена иммунитета у женщин с лейомиомой матки оценивалось нами по данным спонтанного и стимулированного НСТ-теста, а также по уровню адгезионной активности периферических нейтрофилов. Как известно, НСТ-тест отражает активацию одного из ключевых ферментных каскадов с образованием свободных радикалов и перекиси водорода, обладающих сильным биоцидным действием, и поэтому он позволяет дифференцировать покоящиеся и активированные клетки (А.Н.Маянский, О.И.Пикуза, 1993). Стимулированный НСТ-тест рассматривают как цитохимический критерий готовности к завершённому фагоцитозу. По нашим данным, у женщин с лейомиомой матки снижался ответ нейтрофилов на нагрузку в стимулированном зимозаном НСТ-тесте. Кроме того, был значительно снижен резерв функциональной активности периферических нейтрофилов,

оцениваемый нами по ИНА. Низкие значения ИНА могут свидетельствовать о том, что фагоциты работают уже на пределе своих возможностей, и дополнительная стимуляция не приведет к развитию адекватного ответа. Имеются данные о том, что отсутствие ответа на стимуляцию является неблагоприятным показателем, чаще всего свидетельствующем о переходе воспалительного процесса в хроническую форму (А.Н. Маянский, О.И. Пикуча, 1993). Отсутствие ответа нейтрофилов на нагрузку у женщин с лейомиомой матки и сниженный резерв их функциональной активности, по-видимому, могут непосредственно обуславливать высокую частоту хронических воспалительных заболеваний у женщин с лейомиомой матки, о чем говорилось выше.

Важную информацию о состоянии иммунной системы дает нам изучение продукции цитокинов. Как известно, цитокины являются продуктами иммунокомпетентных клеток, и в то же время иммунокомпетентные клетки служат мишенями действия цитокинов. Цитокины являются медиаторами межклеточных взаимодействий при иммунном ответе и служат связующим звеном между иммунной и другими системами организма. Нами было изучено содержание в периферической крови и перитонеальной жидкости двух цитокинов – ИЛ-2 и оФРФ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение продукции ИЛ-2 на системном уровне является характерным в целом для лейомиомы матки. ИЛ-2, продуцируемый активированными Т-хелперами, представляет собой фактор роста и дифференцировки Т-лимфоцитов, ЦТЛ, ЕК, является важнейшим медиатором иммунитета, особенно клеточного, и участвует в регуляции иммунной защиты и противоопухолевой резистентности (А.А. Ярилин, 1999). Складывается впечатление, что ряд выявленных нарушений системного иммунитета у женщин основной группы, возможно, связан с угнетением продукции ИЛ-2. По-видимому, низкое содержание ИЛ-2 на системном уровне может обуславливать отмечаемое нами угнетение активности ЦТЛ у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки. Описанное нами снижение количества пролиферирующих лимфоцитов (CD71+) также могло происходить из-за недостатка активирующего сигнала со стороны ИЛ-2. Полученные нами данные об отсутствии продукции МИФ лимфоцитами женщин с лейомиомой матки согласуются с установленным низким содержанием ИЛ-2 и, вероятно, свидетельствуют о нарушении функциональной активности лимфоцитов периферической крови у женщин с лейомиомой матки, что проявляется в угнетении продукции ими цитокинов.

Нами также была изучена продукция одного из ростовых факторов – основного фактора роста фибробластов при лейомиоме матки. Отмечено значительное повышение данного параметра у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки

Известно, что оФРФ является митогеном для различных клеток нейроэктодермального и мезенхимального происхождения, а также обладает ангиогенным действием (M.Klagsbrun, 1989). В связи с этим повышение содержания оФРФ на системном уровне у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки может быть одним из ключевых механизмов, обуславливающих увеличение темпа роста лейомиомы. Учитывая важную роль половых стероидов в формировании и росте лейомиомы матки и установленный факт регуляции продукция оФРФ половыми гормонами (М.А.Пальцев, 1995), можно предположить, что нарушение синтеза оФРФ может играть роль триггера быстрого роста лейомиомы матки.

На локальном уровне иммунные механизмы, определяющие быстрый рост лейомиомы матки, имели некоторые отличия от таковых на системном уровне.

У женщин с лейомиомой матки независимо от темпов роста было достоверно увеличено содержание ЕК. Высокий уровень ЕК в перитонеальной жидкости, по-видимому, связан с теми же причинами, которые приводили к увеличению содержания ЕК в периферической крови женщин с лейомиомой матки, а именно – с инфекцией.

При изучении параметров активации перитонеальных лимфоцитов был выявлен у женщин с лейомиомой матки более высокий уровень экспрессии CD25-молекул в общей популяции лимфоцитов, а у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки – более низкое содержание в ПЖ активированных Т-хелперов с фенотипом CD25+ и Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR-молекулы. То есть на локальном уровне при быстром росте лейомиомы матки снижена активация Т-хелперов, чего не происходит у женщин с миомой матки стабильных размеров.

Заслуживает особого внимания факт повышения уровня CD38+ лимфоцитов у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки. Учитывая снижение содержания активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+), можно заключить, что повышение количества CD38+ лимфоцитов в ПЖ женщин с быстрорастущей лейомиомой матки происходит за счет пула незрелых клеток. Складывается впечатление, что в перитонеальной жидкости у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки нарушены процессы созревания и дифференцировки лимфоцитов, что ведет к формированию локальной иммунологической недостаточности, в результате чего иммунная система женщин данной группы не способна развивать адекватный ответ, направленный на элиминацию аутологичных клеток. Высокий уровень незрелых CD38+ клеток отмечался нами как в периферической крови, так и в перитонеальной жидкости женщин с быстрорастущей лейомиомой матки. Стабильное повышение данной клеточной популяции как на системном, так и на локальном уровне позволяет сделать

вывод о том, что это явление непосредственно связано с быстрым темпом роста лейомиомы. Исходя из полученных нами результатов, мы предложили использовать показатель содержания CD38<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови женщин с лейомиомой матки для прогнозирования быстрого темпа роста лейомиомы.

При изучении показателей фагоцитарного звена иммунитета на локальном уровне нами было выявлено снижение адгезионной активности, которым характеризовались женщины с лейомиомой матки в целом. Известно, что процессы адгезии играют основную роль при миграции фагоцитов в очаг воспаления (А.А.Ярилин, 1999). Угнетение адгезионной активности перитонеальных макрофагов у женщин с лейомиомой матки, по-видимому, приводит к нарушению взаимодействия макрофагов с объектами фагоцитоза, что может быть одним из факторов, определяющих развитие лейомиомы, но не темпа ее роста. У женщин с быстрорастущей лейомиомой матки резко снижался ответ перитонеальных макрофагов на стимуляцию зимозаном и практически отсутствовал резерв функциональной активности. Эти результаты согласуются с нашим предположением о формировании локальной иммунологической недостаточности у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки. По-видимому, неспособность перитонеальных макрофагов к адекватному ответу на стимуляцию приводит к нарушению своевременной элиминации трансформированных клеток на локальном уровне. Срыв цитотоксических реакций, обусловленных фагоцитами, может быть одним из факторов, провоцирующих быстрый рост лейомиомы матки.

В перитонеальной жидкости женщин с быстрорастущей лейомиомой матки было достоверно повышено содержание ИЛ-2 (на системном уровне оно снижалось). По-видимому, локальная продукция ИЛ-2 у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки регулируется иными механизмами, отличными от таковых на системном уровне. Известно, что регуляция синтеза цитокинов осуществляется по сетевому принципу, и увеличение продукции одного цитокина может приводить к усилению или угнетению синтеза другого цитокина (В.С.Смирнов, И.С.Фрейдлин, 2000), поэтому высокий локальный уровень ИЛ-2 может приводить к усилению синтеза других цитокинов, в частности оФРФ. И действительно, содержание оФРФ в ПЖ больных с быстрорастущей лейомиомой матки было таким же высоким, как и в ПК.

Складывается впечатление, что именно на локальном уровне формируется комплекс причин, приводящих к усилению продукции различных факторов с митогенной активностью. Это предположение согласуется с имеющимися литературными данными о повышении продукции ряда ростовых факторов в

миометрии и ткани лейомиомы, что может вести к усилению процессов ангиогенеза и обуславливать усиление темпов роста лейомиомы матки (Г. А. Савицкий, 2000).

Однако пока еще не известно, что является триггером данных иммунологических изменений в перитонеальной жидкости у женщин с лейомиомой матки. С одной стороны, возможной причиной данных нарушений может быть вирусное инфицирование, так как известно, что вирусы могут индуцировать выработку ростовых факторов и усиливать процессы клеточного роста. Это подтверждается и нашими данными о высокой частоте выявления герпетической инфекции по результатам ИФА. С другой стороны, возможно, что иммунологические изменения обусловлены причинами эндогенного характера. В частности, можно предположить, что сама лейомиома оказывает негативное влияние на иммунную систему, регулируя собственный рост по принципу аутокринной регуляции.

В связи с этим нами было проведено изучение влияния антигенов, ассоциированных с тканью лейомиомы, на параметры активации и функциональной активности иммунокомпетентных клеток периферической крови и перитонеальной жидкости у здоровых женщин и у больных с быстрорастущей лейомиомой матки.

Результаты наших экспериментов *in vitro* свидетельствуют о том, что антигены ткани лейомиомы влияют на параметры активации иммунокомпетентных клеток, причем характер этого влияния определяется изначальным функциональным состоянием клеток. Так, инкубация лимфоцитов периферической крови здоровых женщин с ОАГ усиливала экспрессию лимфоцитами CD25-, CD71- и CD11b-молекул, а инкубация лимфоцитов перитонеальной жидкости здоровых женщин приводила к достоверному увеличению содержания CD25+ и CD71+ лимфоцитов. Кроме того, ОАГ стимулировал продукцию МИФ периферическими лимфоцитами здоровых женщин. Таким образом, в норме лимфоциты как периферической крови, так и перитонеальной жидкости отвечают на воздействие ОАГ, что проявляется в повышении уровня их активации и усилении продукции медиаторов иммунного ответа.

Характеризуя функциональную активность фагоцитарных клеток здоровых женщин, необходимо отметить, что ОАГ действовал одинаково и в отношении нейтрофилов периферической крови, и в отношении макрофагов перитонеальной жидкости: приводил к значительному усилению спонтанной НСТ-активности нейтрофилов и макрофагов, при этом резерв их функциональной активности и адгезионные свойства клеток резко снижались. Таким образом, клетки фагоцитарного ряда в норме реагируют на воздействие антигена, ассоциированного с тканью лейомиомы, что проявляется усилением продукции ими биоцидных форм кислорода.



Отмечаемое при этом снижение значений ИНА, по-видимому, связано с тем, что вследствие усиления спонтанного уровня активации клетки работают практически на пределе своих возможностей. Снижение адгезионной активности фагоцитов крови и перитонеальной жидкости здоровых женщин могло происходить вследствие того, что ОАГ блокировал специфические рецепторные структуры на поверхности фагоцитов, которые обуславливают адгезионную способность клеток. По-видимому, в норме иммунная система распознает антигены ткани лейомиомы и реагирует на них усилением активации лимфоцитов и повышением биоцидного действия фагоцитарных клеток как на системном, так и на локальном уровне

Характер ответа иммунокомпетентных клеток периферической крови и перитонеальной жидкости женщин с быстрорастущей лейомиомой матки на воздействие ОАГ отличался от такового у здоровых женщин. Так, инкубация лимфоцитов периферической крови женщин основной группы с ОАГ приводила к усилению экспрессии CD25- и CD11b-молекул, однако при этом ОАГ не стимулировал экспрессию CD71 и продукцию лимфоцитами МИФ, как у здоровых женщин. По-видимому, особенности ответа клеток на стимуляцию ОАГ в данном случае определяются их изначально сниженной функциональной активностью. При инкубации нейтрофилов периферической крови с ОАГ нами отмечалось лишь снижение показателей ИНА и адгезионной активности клеток. Показатели спонтанной НСТ-активности в данном случае не изменялись. Складывается впечатление, что стимуляция ОАГ не приводит к усилению продукции периферическими нейтрофилами бактерицидных ферментов и снижает функциональный резерв нейтрофилов.

Особо следует отметить тот факт, что ОАГ не оказывал никакого влияния на иммунокомпетентные клетки перитонеальной жидкости у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки.

Обобщая полученные нами результаты, можно заключить, что у больных с быстрорастущей лейомиомой матки на локальном уровне отмечаются выраженные признаки иммунологической недостаточности. Они проявляются в угнетении активации регуляторных популяций лимфоцитов и функциональной активности фагоцитов перитонеальной жидкости, сопровождаются повышением уровня незрелых лимфоцитов и активацией локального цитокинового каскада с усилением выработки факторов роста. Изменения на системном уровне у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки менее выражены и связаны с существованием лейомиомы, а не с темпом ее роста. В периферической крови женщин с лейомиомой матки отмечается

повышенное содержание ЕК, сниженный уровень ЦТЛ, активация Т-хелперов и реакций гуморального звена иммунитета при сниженном ответе нейтрофилов на нагрузку и угнетении продукции цитокинов. На стимуляцию антигеном ткани лейомиомы иммунокомпетентные клетки периферической крови и перитонеальной жидкости в норме отвечают усилением активации и функциональной активности, а у женщин с быстрорастущей лейомиомой матки иммунный ответ на ОАГ подавлен. Нами были выявлены иммунологические маркеры быстрого роста лейомиомы матки, к которым как на системном уровне, так и на локальном уровне относятся высокие значения CD38+ лимфоцитов и оФРФ.

### ВЫВОДЫ

1. Особенности соматического и репродуктивного здоровья больных с быстрорастущей лейомиомой матки являются: высокая частота НМФ по типу гиперполименореи и дисменореи (57,1%), экстрагенитальной патологии (97,6%) с преобладанием сердечно-сосудистой и нейро-эндокринной, выявления маркеров возбудителей герпетической инфекции (62,5%), использования ВМК (42,9%), гиперпластических и воспалительных изменений в эндометрии по результатам гистологического исследования биоптатов (36,9% и 13,1%), хронического сальпингита и мелкокистозных перерождений яичников по данным морфологического исследования операционного материала (40,5% и 36,3%).

2. Иммунный ответ женщин с быстрорастущей лейомиомой матки на системном уровне отличается от такового у здоровых повышенным содержанием ЕК, активированных лимфоцитов (CD25+, HLA DR+), Т-хелперов, ЦИК на фоне снижения функциональной активности Т-лимфоцитов и фагоцитов; а от больных со стабильными размерами лейомиомы матки - высоким уровнем активированных лимфоцитов с фенотипом CD38+ и низким - ЦТЛ.

3. В перитонеальной жидкости больных с быстрорастущей лейомиомой матки в отличие от здоровых повышается содержание ЕК, лимфоцитов на ранних стадиях активации, угнетается адгезионная активность макрофагов. В то же время у этих женщин в отличие от больных с лейомиомой матки стабильных размеров отмечается высокое содержание активированных лимфоцитов с фенотипом CD38+, низкий уровень Т-хелперов, Т-лимфоцитов на поздних стадиях активации (CD3+HLA-DR+) и снижение функциональных резервов макрофагов.

4. Быстрый рост лейомиомы матки у больных сопровождается нарушением синтеза ростовых цитокинов на системном и локальном уровнях с повышением

содержания ИЛ-2 и оФРФ в перитонеальной жидкости и увеличением показателей оФРФ в периферической крови.

5. Антигены ткани быстрорастущей лейомиомы матки в опытах *in vitro* усиливают экспрессию периферическими лимфоцитами здоровых женщин CD25-, CD71-, CD11b-молекул, стимулируют продукцию МИФ, но снижают функциональную активность фагоцитов; на локальном уровне - усиливают экспрессию лимфоцитами CD25- и CD71-молекул, спонтанную НСТ-активность макрофагов, снижают резервы их функциональной активности и адгезионные свойства.

6. Инкубация иммунокомпетентных клеток периферической крови больных с быстрорастущей лейомиомы матки с антигенами ткани лейомиомы приводит к усилению экспрессии лимфоцитами CD25-, CD11b-молекул и снижению функциональной активности фагоцитов, при этом иммунный ответ клеток перитонеальной жидкости этих же больных на подобное воздействие опухолевого антигена отсутствует.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При диспансеризации больных с лейомиомой матки с целью повышения точности прогноза роста опухоли предлагается определять в периферической крови больных относительное содержание CD38+ лимфоцитов, при значении которого равно или больше 23,5% прогнозируется быстрый темп роста лейомиомы матки в течение года.

Полученные данные предлагаются для использования с целью выбора оптимальной тактики ведения больных с лейомиомой матки.

#### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Посисеева Л.В., Анциферова Ю.С., Суворкина Е.Е., Аревалде И.Э. Иммунологические маркеры темпа роста миомы матки // Журнал «Медицинская иммунология». Санкт-Петербург. - 2002. С.283-284.

2. Посисеева Л.В., Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Аревалде И.Э., Суворкина Е.Е. Некоторые особенности системного и локального иммунитета у женщин с миомой матки // Российский вестник акушера-гинеколога - 2002, № 3. С.11-14.

3. Малышкина А.И., Анциферова Ю.С., Сотникова Н.Ю., Посисеева Л.В., Суворкина Е.Е., Аревалде И.Э. Изменение содержания основного фактора роста фибробластов (оФРФ) в перитонеальной жидкости у женщин с миомой матки в зависимости от темпов роста миомы // Тез. 5 Конгресса РААКИ «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». Москва. - 2002. С.91.

4. Малышкина А.И., Посисеева Л.В., Анциферова Ю.С., Сотникова Н.Ю., Аревалде И.Э., Суворкина Е.Е. Особенности популяционного состава и активации

перитонеальных лимфоцитов у женщин с миомой матки // Материалы IV Российского форума «Мать и дитя». Тезисы докладов. - Москва, 2002. Ч II. - С 241-242.

5. Балапова М.О., Малышкина А.И., Суворкина Е.Е., Аревадзе И.Э., Перетятко Л.П. Патоморфология быстро- и медленно растущих миом. // Материалы IV Российского форума «Мать и дитя». Тезисы докладов.- Москва, 2002. Ч.П. - С.56-57.

6. Малышкина А.И., Анциферова Ю.С., Сотникова Н.Ю., Посисеева Л.В., Суворкина Е.Е., Аревадзе И.Э. Особенности продукции интерлейкина-2 и фактора роста фибробластов на локальном уровне у женщин с миомой матки.// Цитокины и воспаление. Материалы международной научно-практической конференции.- С.-Петербург, 2002. Т.1. № 2. С.151.

7. Суворкина Е.Е., Малышкина А.И., Анциферова Ю.С., Аревадзе И.Э. Изменение содержания интерлейкина-2 в перитонеальной жидкости у женщин с миомой матки в зависимости от темпа роста // Материалы научно-практической Всероссийской конференции «Актуальные проблемы лабораторной и функциональной диагностики в акушерстве, гинекологии и перинатологии».- Иваново, 2002. - С.191-192.

8. Малышкина А.И., Посисеева Л.В., Аревадзе И.Э., Суворкина Е.Е., Голубев А.В. Особенности репродуктивного здоровья женщин с миомой матки // Материалы научно-практической Всероссийской конференции «Актуальные проблемы лабораторной и функциональной диагностики в акушерстве, гинекологии и перинатологии».- Иваново, 2002. - С.173-174.

9. Аревадзе И.Э., Малышкина А.И., Посисеева Л.В., Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Суворкина Е.Е. Состояние локального иммунитета у женщин с миомой матки // Материалы научно-практической Всероссийской конференции «Актуальные проблемы лабораторной и функциональной диагностики в акушерстве, гинекологии и перинатологии».- Иваново, 2002. - С.132-134.

10. Малышкина А.И., Суворкина Е.Е., Аревадзе И.Э., Анциферова Ю.С. Особенности продукции интерлейкина-2 на системном и локальном уровнях у женщин с миомой матки.// Материалы III Российского форума «Мать и дитя». Тезисы докладов. – Москва - 2001. – С.406-407.

11. Малышкина А.И., Аревадзе И.Э., Анциферовой Ю.С., Суворкиной Е.Е. Функциональное состояние иммунокомпетентных клеток на системном и локальном уровне у женщин с миомой матки. // II Международная научно-практическая конференция «Здоровье и образование в XXI веке».- Москва. - 2001. - С.122.

12. Малышкина А.И., Суворкиной Е.Е., Анциферовой Ю.С. Особенности функционального состояния иммунокомпетентных клеток периферической крови и перитонеальной жидкости у женщин с быстрорастущей миомой матки.// Сб. Актуальные проблемы здоровья семьи, общественного здоровья и здравоохранения. – Иваново - 2001. - С.37-39.

13. Малышкина А.И., Аревадзе И.Э., Анциферова Ю.С., Суворкина Е.Е. Особенности функционального состояния иммунокомпетентных клеток периферической крови у женщин с малыми миомами матки. //Материалы 11 Российского форума «Мать и Дитя». Тезисы докладов - Москва -2000.-С.244.

**Перечень условных сокращений**

**ВМК** – внутриматочная контрацепция  
**ВПГ** – вирус простого герпеса  
**ЕК** – естественные киллеры  
**ИЛ-2** – интерлейкин 2  
**ИНА** – индекс нейтрофильной активации  
**ИФА** – иммуноферментный анализ  
**МИ** – миграционный индекс  
**МИФ** – миграции ингибирующий фактор  
**НСТ** – тест восстановления нитросинего тетразолия  
**НСТз** – стимулированный зимозаном тест восстановления нитросинего тетразолия  
**ОАГ** – опухолевые антигены  
**оФРФ** – основной фактор роста фибробластов  
**ПЖ** – перитонеальная жидкость  
**ПК** – периферическая кровь  
**УЗИ** – ультразвуковое исследование  
**ФГА** – фитогемагглютини  
**ЦИК** – циркулирующие иммунные комплексы  
**ЦТЛ** – цитотоксические лимфоциты  
**ЭКГ** – электрокардиограмма  
**CD** – cluster of differentiation  
**FITC** – флюоресценн изотиоционат  
**Ig A** – иммуноглобулин класса A  
**Ig G** – иммуноглобулин класса G  
**Ig M** – иммуноглобулин класса M  
**PE** – фикоэритрин

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Формат бумаги 60x84 1/16.  
Печать плоская.

Тираж 100 экз.  
Заказ 687

Отпечатано в ОМТ МИБФ  
153003, г. Иваново, ул. Рабфаковская, 34, оф. 101, тел. (0932) 38-37-36

Из фондов Российской национальной библиотеки

2003-A

7111

№ . 7 1 1 1

Из фондов Российской национальной библиотеки