

## РОЛЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ БЫСТРОГО РОСТА МИОМЫ МАТКИ

А. О. Лицова\*,  
А. И. Малышкина, доктор медицинских наук,  
Н. Ю. Сотникова, доктор медицинских наук,  
Л. П. Перетятко, доктор медицинских наук,  
Р. А. Кузнецов, кандидат медицинских наук,  
Д. Н. Воронин, кандидат биологических наук

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова»  
Минздрава России, 153045, Россия, г. Иваново, ул. Победы, д. 20.

**РЕЗЮМЕ** Целью исследования стало определение содержания естественных киллеров и продуцируемых ими цитокинов TGFβ1 и IFNγ, а также экспрессии VEGF-A на локальном уровне у женщин с миомой матки с различным темпом и типом роста. Установлено, что у женщин со стабильно малой миомой отмечается усиление продукции IFNγ естественными киллерами и лимфоцитами в эндометрии. У пациенток с быстро-растущей миомой и «истинным» типом роста опухоли отмечается увеличение содержания естественных киллеров, продукции TGFβ1 естественными киллерами и лимфоцитами в эндометрии. В ткани миоматозного узла с «истинным» типом роста повышается продукция TGFβ1 по сравнению с интактным миометрием и тканью миоматозных узлов с «ложным» типом роста. При «истинном» типе роста опухоли увеличена экспрессия VEGF-A в эндотелии капилляров и интрамуральных артерий миоматозных узлов.

**Ключевые слова:** миома матки, естественные киллеры, трансформирующий фактор роста бета, интерферон-гамма, сосудисто-эндотелиальный фактор роста

\* Ответственный за переписку (corresponding author): e-mail: litsova\_ao@mail.ru

Миома матки является одним из наиболее распространенных гинекологических патологий – она встречается у 25% женщин после 30 лет. Заболевание негативно влияет на репродуктивное здоровье, является причиной репродуктивных неудач у 12–20% пациенток с нарушением фертильности [2, 3, 4, 5].

Для разработки тактики ведения больных чрезвычайно важно установить новые механизмы формирования и роста доброкачественных опухолей матки. Известно, что изменения иммун-

ного ответа выступают в качестве триггерных механизмов в патогенезе миомы. В последние годы важная роль в регуляции процессов пролиферации миомы матки отводится естественным киллерам и продуцируемым ими цитокинам. Установлено, что мишенями для естественных киллеров служат быстро пролиферирующие и трансформированные клетки [2, 6, 12]. Контроль над процессами клеточной пролиферации осуществляют факторы роста и цитокины [2]. Одним из наиболее значимых факторов роста ми-

### THE ROLE OF NATURAL KILLERS IN THE PATHOGENESIS OF HYSTEROMYOMA RAPID GROWTH

Litsova A. O., Malyshkina A. I., Sotnikova N. Yu., Peretyatko L. P., Kuznetsov P. A., Voronin D. N.

**ABSTRACT** The aim of the study was the examination of the content of natural killers and TGFbeta1 and IFNγ cytokines produced by them, VEGF expression on the local level in women with hysteromyoma with different temp and type of its growth. It was determined that there was the increase of IFNγ production by natural killers and by lymphocytes in endometrium in women with stable small hysteromyoma. The increase of natural killers' content, production of TGFbeta1 by natural killers and by lymphocytes in endometrium was demonstrated in women with hysteromyoma rapid growth and "true" tumor growth. In myoma nodes' tissue with "true" type of its growth TGFbeta1 production was increased in comparison with intact endometrium and myoma nodes' tissue with false type of its growth. Heightened VEGFA expression was revealed in the endothelium of capillaries and intramural arteries of myoma nodes in "true" type of the tumor growth.

**Key words:** hysteromyoma, natural killers, transforming growth factor-beta, interferon gamma, vascular endothelial factor.

омы является трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ). Избыточная его продукция сопровождается ускоренной клеточной пролиферацией и увеличением синтеза экстрацеллюлярного матрикса [5]. Кроме того, TGF $\beta$ , относящийся к цитокинам супрессорного действия, угнетает противоопухолевый иммунитет [2, 6, 9]. В отличие от TGF $\beta$ , интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ) активирует клетки врожденного и приобретенного иммунитета, повышает цитотоксическую активность естественных киллеров против клеток-мишеней. IFN $\gamma$ , антагонист TGF $\beta$ , подавляет процессы пролиферации и ангиогенеза опухоли [6, 7]. Процесс новообразования зон роста в миометрии неразрывно связан с процессами ангиогенеза [1]. В процессах регуляции ангиогенеза наиболее важная роль из известных факторов роста принадлежит сосудисто-эндотелиальному фактору роста (VEGF) [1, 8, 10]. Фактор не только потенцирует рост эндотелиоцитов и ангиогенез, но и способен угнетать клетки иммунной системы, в том числе естественные киллеры [11].

Целью данной работы явился сравнительный анализ содержания естественных киллеров (CD56+) и продуцируемых ими цитокинов IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ 1 на локальном уровне, а также экспрессии VEGF-A в сосудах и гладкомышечных клетках лейомиом с различным темпом и типом роста опухоли для уточнения их роли в патогенезе данного заболевания.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России. Обследовано 75 женщин в возрасте от 24 до 45 лет.

Первую клиническую группу составили 19 женщин с миомой матки стабильно малых размеров, соответствующих 9-недельному или меньшему сроку беременности, отсутствовал рост миомы в течение 1 года, предшествующего наблюдению.

Вторую клиническую группу составили 45 женщин с быстрорастущей опухолью, у которых общие размеры матки превышали таковые при 12-недельной беременности, причем увеличение размера опухоли в течение предшествующего года соответствовало 4–5 неделям беременности и более.

В зависимости от морфологического типа роста миомы матки сформированы две подгруппы: 1) женщины с «истинным» типом роста опухоли, при котором увеличение размеров матки происходит преимущественно за счет пролиферации гладкомышечных клеток, и 2) пациентки с «лож-

ным» типом роста, при котором увеличение идет за счет дистрофических изменений в ткани узлов. Контрольную группу составили 11 здоровых женщин репродуктивного возраста. Сравнением для лейомиом служил миометрий вне зоны роста миоматозных узлов.

Материалом для исследования явились биоптаты эндометрия, фрагменты ткани миоматозных узлов и прилегающего к ним неизмененного миометрия. Лимфоциты из эндометриальной ткани выделялись механическим способом. Обогащенную популяцию лимфоцитов получали стандартным методом скоростного центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина (d 1,078). Количество лимфоцитов с фенотипом CD56+, CD56+IFN $\gamma$ +, IFN $\gamma$ +, CD56+TGF $\beta$ 1+ и TGF $\beta$ 1+ в эндометрии определяли методом проточной цитометрии с использованием коммерческих наборов моноклональных антител, меченных FITC, PE, PC5. Матричная РНК выделялась из ткани миоматозных узлов и миометрия стандартным методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Для оценки экспрессии м-РНК TGF $\beta$ 1 использовался количественный метод RT-PCR. Ткань лейомиом из центральных, парацентральных и краевых отделов окрашивали гематоксилином и эозином с последующей морфометрией сосудов по программе, прилагаемой к «ВидеоТесту Мастер Морфология 4», а также исследовали иммуногистохимически с применением первичных антител к сосудисто-эндотелиальному фактору роста (anti-VEGF-A, Dako, клон VG1, рабочее разведение 1 : 50). Реакцию проводили на парафиновых срезах после предварительной демаскировки антигена путем кипячения в трис-ЭДТА-буфере с pH = 9,0 в течение 15 минут. Использовали систему визуализации LSAB2 System HRP («Dako») по протоколу производителя. Оценку иммуногистохимической реакции осуществляли путем подсчета индекса экспрессии HistoScore в 5 полях зрения при увеличении в 400 раз. Коэффициент HistoScore равен сумме произведений  $P(i) \times i$ , где  $i$  – интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3,  $P(i)$  – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью. Определяли количество VEGF-положительных капилляров и интрамуральных артерий в 5 полях зрения (увеличение в 200 раз) каждого из отделов миоматозного узла, высчитывали плотность распределения сосудов в 1 мм<sup>2</sup>. Полученные результаты статистически обработаны с помощью программы Statistica 6.0. Достоверность различий между группами исследования оценена при помощи критерия Манна – Уитни и Стьюдента. Статистическая значимость различий внутри групп по зонам миоматозных узлов – при помощи дисперсионного анализа по методу Краскала – Уоллеса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что у больных с лейомиомой матки независимо от темпа роста опухоли в эндометрии содержание лимфоцитов CD56+ были статистически значимо выше, чем в контрольной группе ( $p = 0,000$  и  $p = 0,02$ ). Сравнительный анализ популяционного состава лимфоцитов в эндометрии женщин с миомой различных типов роста показал статистически значимое увеличение содержания эндометриальных лимфоцитов CD56+ у пациенток с «истинным» ростом опухоли по сравнению с таковым в контроле ( $p = 0,000$ ) и у больных с «ложным» типом ( $p = 0,001$ ).

Для уточнения механизмов, контролирующих рост опухоли, оценивали характер локальной продукции TGF $\beta$ 1 и IFN $\gamma$  естественными киллерами и лимфоцитами в эндометрии. Продукция TGF $\beta$ 1 была выше у женщин с быстрорастущей мио-

мой матки, чем в контрольной группе ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,039$ ) и у пациенток с миомой стабильно малых размеров ( $p = 0,032$ ,  $p = 0,000$ ). Сравнительный анализ показателя в подгруппах женщин с быстрорастущей миомой матки показал, что «истинный» тип роста опухоли сопровождается увеличением продукции TGF $\beta$ 1 по сравнению с его значениями в контрольной группе ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,000$ ) и у больных с «ложным» типом роста ( $p = 0,041$ ,  $p = 0,044$ ) (табл. 1).

Установлено, что экспрессия мРНК TGF $\beta$ 1 в ткани миоматозного узла женщин с «истинным» типом роста опухоли был значительно больше, чем в подгруппе с «ложным» типом и быстрым ростом миомы ( $p = 0,004$ ). Следует отметить отсутствие его экспрессии в ткани миометрия (табл. 2). Продукция IFN $\gamma$  клетками эндометрия у пациенток с миомой матки стабильно малых размеров статистически значимо превышала таковую у здоровых женщин ( $p = 0,017$ ,  $p = 0,014$ ). Статистически зна-

**Таблица 1.** Характеристика содержания естественных киллеров и продукции ими цитокинов в эндометрии женщин с миомой матки различных темпов роста

Показатели	Содержание, %		
	Контрольная группа (n = 9)	Женщины с миомой матки малых размеров (n = 17)	Женщины с быстрорастущей миомой матки (n = 19)
CD56+	27,50 ± 2,19	37,00 ± 1,92 $p_1 = 0,000$	34,20 ± 1,36 $p_1 = 0,02$
CD56+CD158a+	4,86 ± 0,70	8,09 ± 0,79 $p_1 = 0,004$	8,18 ± 0,67 $p_1 = 0,002$
CD56+CD158i+	4,52 ± 0,66	8,09 ± 0,79 $p_1 = 0,004$	8,18 ± 0,67 $p_1 = 0,002$
TGF $\beta$ 1	12,30 ± 1,85	11,12 ± 0,88	17,13 ± 1,12 $p_1 = 0,039$ $p_2 = 0,000$
CD56+TGF $\beta$ 1	4,71 ± 0,61	5,93 ± 0,57	8,45 ± 0,95 $p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,032$
IFN $\gamma$	9,23 ± 0,95	13,89 ± 1,52 $p_1 = 0,014$	10,78 ± 1,00
CD56+IFN $\gamma$	4,10 ± 0,72	6,96 ± 0,87 $p_1 = 0,017$	5,15 ± 0,54

*Примечание.* Статистическая значимость различий:  $p_1$  – по сравнению с контрольной группой;  $p_2$  – в группах с миомой матки.

**Таблица 2.** Характеристика экспрессии мРНК TGF $\beta$ 1 у женщин с миомой матки различных темпов роста

Группа		TGF $\beta$ 1, количество копий пар, $\times 10^3$ /мкл
«Истинный» тип быстрого роста миомы матки (n = 13)	миометрий (n = 5)	Nd
	миоматозный узел (n = 8)	28,38 ± 8,83 $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,004$
«Ложный» тип быстрого роста миомы матки (n = 13)	миометрий (n = 8)	Nd
	миоматозный узел (n = 5)	6,95 ± 3,20 $p_1 = 0,003$

*Примечание.* Статистическая значимость различий:  $p_1$  – по сравнению с неизменным миометрием;  $p_2$  – в группах с миомой матки.

чимых отличий в продукции IFN $\gamma$  в эндометрии женщин с миомой матки в зависимости от типов роста опухоли не выявлено ( $p > 0,05$ ) (см. табл. 1).

Наибольший интерес представляет изучение экспрессии VEGF-A в ткани миоматозного узла. Выраженная экспрессия VEGF-A определяется в цитоплазме эндотелиальных клеток капилляров лейомиомы, а также интрамуральных артериях мышечного типа. Уровень экспрессии изучаемого фактора в центральных отделах опухоли статистически значимо не отличается от парацентральных и краевых зон в обеих группах исследования. Индекс экспрессии VEGF-A в вышеозначенных типах сосудов при истинном росте миоматозного узла статистически значимо превышает подобные значения группы сравнения (табл. 3). Количество VEGF-положительных капилляров и интрамуральных артерий в узлах пролиферирующей лейомиомы статистически значимо выше, чем в узлах с дистрофическими изменениями (табл. 4). Слабая экспрессия VEGF-A определяется в гладкомышечных клетках лейомиом как с истинным, так и ложным ростом узла без статистически значимых отличий индекса экспрессии между группами (табл. 3). Однако в зонах активного роста пролиферирующей лейомиомы иммуногистохимическая реакция с анти-VEGF антителами более выражена. Как правило, в строме пролиферирующих миоматозных узлов обнаруживаются группы или единичные VEGF-положительные гистиоциты.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, формирование и рост миомы матки в целом сопровождается увеличением CD56+ естественных киллеров на локальном

уровне. Поскольку мишенями для естественных киллеров служат трансформированные и быстро пролиферирующие клетки [2, 6, 9, 12], установленные изменения позволяют предположить существование постоянной антигенной стимуляции иммунной системы опухолевыми клетками.

Естественные киллеры, начиная уничтожать клетки-мишени, продуцируют широкий спектр цитокинов, одними из которых являются IFN $\gamma$  и TGF $\beta$ 1 [2].

Увеличение продукции IFN $\gamma$  естественными киллерами и эндометриальными лимфоцитами констатировано у женщин с миомой матки стабильно малых размеров. IFN $\gamma$ , подавляя пролиферацию и васкуляризацию опухоли и одновременно активируя естественные киллеры [6, 7], приводит к стабилизации размеров опухоли.

Увеличена продукция TGF $\beta$ 1 у женщин с быстрорастущей миомой матки. TGF $\beta$ 1, являясь цитокином супрессорного типа, подавляет активность естественных киллеров и способствует росту опухоли за счет васкуляризации [2, 5, 6, 9]. Непосредственным доказательством служит увеличение продукции TGF $\beta$ 1 в ткани миоматозного узла. Несмотря на то что быстрый рост пролиферирующей миомы матки сопровождается повышением содержания естественных киллеров, можно предположить, что их активность подавляется чрезмерной продукцией TGF $\beta$ 1.

Пролиферирующие лейомиомы лучше васкуляризованы, чем дистрофически измененные узлы, о чем свидетельствует плотность распределения капилляров и артерий мышечного типа в опухолевых узлах. Одним из факторов, способ-

**Таблица 3.** Индекс экспрессии сосудисто-эндотелиального фактора роста в сосудах и гладкомышечных клетках лейомиом с различным типом роста, усл. ед., Ме [25–75%]

Локализация	Лейомиомы с «истинным» ростом (n = 9)	Лейомиомы с «ложным» ростом (n = 6)	p
Эндотелий капилляров	258 [236–272]	176 [150–210]	0,000
Эндотелий интрамуральных артерий	213 [191–241]	172 [146–188]	0,00015
Гладкомышечные клетки	92 [62–110]	77 [50–120]	0,23

**Таблица 4.** Плотность распределения сосудов в лейомиомах с различным типом роста, на 1 мм<sup>2</sup>, Ме [25–75%]

Тип сосудов	Лейомиомы с «истинным» ростом (n = 9)	Лейомиомы с «ложным» ростом (n = 6)	p
Капилляры	30 [25–40]	25 [17–27]	0,0048
Интрамуральные артерии	0,95 [0,85–1,06]	0,79 [0,53–0,96]	0,025

ствующих росту сосудов в миоматозных узлах, является высокая экспрессия VEGF эндотелиальными клетками. Кроме того, данный фактор роста, являясь супрессорным для клеток иммунной системы [11], угнетает активность естественных киллеров.

Полученные сведения о патогенезе миомы матки будут способствовать разработке новых методов диагностики и лечения данной патологии, что даст возможность оптимизировать лечебную тактику и тем самым сохранить репродуктивную функцию пациенток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлев, В. А. Локальный и системный ангиогенез у больных с миомой матки / В. А. Бурлев // Пробл. репродукции. – 2007. – № 1. – С. 26–33.
2. Иммунные механизмы быстрого роста миомы матки / А. И. Малышкина [и др.]. – Иваново, 2010. – 272 с.
3. Линде, В. А. Миома матки и миомэктомия / В. А. Линде, М. С. Добровольский, Н. Н. Волков. – М., 2010. – 96 с.
4. Опыт лечения пролиферативных процессов матки у женщин, страдающих бесплодием / Л. А. Щербакова [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. Маммология / онкогинекология. – 2012. – № 2. – С. 73–77.
5. Современное состояние вопроса о патогенезе, клинике, диагностике и лечении миомы матки у женщин репродуктивного возраста / И. С. Сидорова [и др.] // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2012. – № 4. – С. 22–28.
6. Ярилин, А. А. Иммунология / А. А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
7. Brady, J. The Interactions of Multiple Cytokines Control NK Cell Maturation / J. Brady, S. Carotta, R. Thong // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185. – P. 6679–6688.
8. Leiomyoma and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms: a systematic review / C. C. Chang [et al.] // Taiwan J. Obstet. Gynecol. – 2010. – Vol. 49, № 3. – P. 247–253.
9. Mamessier, E. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity / E. Mamessier, A. Sylvain, M. Thibult // J. Clin. Investigation. – 2011. – Vol. 121. – P. 3609–3622.
10. Serum vascular endothelial growth factor levels and uterine fibroid volume / D. C. Chen [et al.] // Acta Obstet. Gynecol. Scand. – 2005. – Vol. 84, № 4. – P. 317–321.
11. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies / T. Yaguchi [et al.] // J. Hematology. – 2011. – Vol. 93, № 3. – P. 294–300.
12. Zamai, L. NK Cells and Cancer / L. Zamai, C. Pontti, P. Mirandola // The J. of Immunology. – 2007. – Vol. 178. – P. 4011–4016.