**Иммунорегуляция содержания эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови женщин**

**в постменопаузе**

**Введение**

Стероидные гормоны, будучи низкомолекулярными химическими соединениями, не обладают иммуногенностью. Однако, в конъюгации с макромолекулярными носителями они становятся гаптенами и приобретают способность индуцировать синтез специфических антител (АТ). В многочисленных экспериментах, выполненных ещё в 1970-1980 гг., показано, что иммунизация животных белковыми конъюгатами стероидных гормонов приводила к образованию специфических АТ, значительным изменениям гормонального статуса и сопровождалась выраженными биологическими эффектами.

Так, при иммунизации против эстрадиола (Es) или эстрона наблюдали повышение в крови уровней не только эстрогенов, но и прогестерона (Pg), гонадотропина и лютеинизирующегогормона[19, 20], а также нарушения овуляции и фертилизации [22, 24]. Иммунизация мышей против Es приводила к замедлению возникновения и роста опухолей после имплантации Es-чувствительной аденокарциномы молочной железы [8]. Авторы объясняли этот эффект связыванием Es специфическими АТ.

Активная иммунизация животных коньюгатами Pg-белок сопровождалось повышением в циркулирующей крови уровней Pg, Es и лютеинизирующегогормона [17, 7, 13, 9] и нарушениями репродуктивных функций у самок [23, 10, 11].

Влияние специфических ауто-АТ на содержание стероидных гормонов у человека, в том числе, при различных гормонозависимых заболеваниях, изучено недостаточно. Описана роль сенсибилизации к Pg в клинике привычного невынашивания беременности [1]. Гиперчувствительность к Es и Pg обнаружена при астме, аутоиммунном дерматите, предменструальном синдроме, дисменорее и невынашиваемости беременности у женщин [21, 14, 16, 15]. Выявлены корреляционные взаимосвязи уровней Es и Pg со специфическими АТ у беременных женщин и их особенности при врождённых пороках развития плода [2]. Получены предварительные данные об ассоциациях ауто-АТ к Es и Pg с содержанием этих гормонов в сыворотке крови у больных раком молочной железы [5].

Результаты приведённых выше экспериментальных и клинических исследований позволяют предположить, что АТ к Es и Pg принимают участие в регуляции содержания этих гормонов в сыворотке крови человека.

Цель настоящего исследования – выявить предполагаемые корреляционные взаимосвязи между содержанием Es и Pg с уровнями специфических АТ в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ в постменопаузе.

**Материалы и методы**

В обследовании приняли участие 859 женщин в постменопаузе, в том числе 633 с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы, поступившие на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден морфологически. У большинства женщин была выявлена I и II стадии заболевания (36,2% и 46,7%), III и IV стадии составили 16,6% и 0,5% соответственно. Согласно рецепторному статусу опухоли молочной железы были выделены 3 подгруппы: 142 (22,4%) женщины с рецептор-негативными опухолями (ER–/PR–), 360 (56,9%) – с рецептор-положительными опухолями (ER+/PR+) и 123 (19,4%) – со смешанным типом опухолей (ER+/PR–). Информация о рецепторном статусе опухоли (ER+/–, PR+/–) у больных РМЖ была взята из протоколов патологоанатомического отделения. Медиана возраста женщин в исследуемой группе – 62 года (интерквартильный размах 57-69).

В группу сравнения были включены 226 условно здоровых женщин, проживающих на территории Кемеровской области, и доноры с Кемеровского центра крови, без патологии молочной железы. Медиана возраста женщин в группе сравнения – 57 лет (интерквартильный размах 42-80).

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все женщины, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ АТ к Es и Pg класса А (IgА-Es, IgА-Pg) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа, подробная методика описана в работе [3]. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Коньюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Иммунологические планшеты сенсибилизировали конъюгатами гаптен-BSA в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:20 вносили по 100 мкл. в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч. при 37°С на шейкере. Cвязавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgА человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (TMB, США), на фотометре (Униплан, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

IgА-X=(ODX-BSA-ODBSA)/ODBSA

где X=Es, Pg; ODX-BSA – связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA, ODBSA – фоновое связывание с BSA.

Концентрацию стероидных гормонов (Es, Pg) определяли с помощью коммерческих наборов «ИммуноФА-Эстрадиол», «ИммуноФА-ПГ» («Иммунотех», г.Москва) согласно инструкции по применению.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Ненормальный характер распределения показателей выявили с помощью критерия Шапиро-Уилка, и в дальнейшем для выявления различий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок. За критический уровень значимости принималось значение p<0,05. Взаимосвязи между уровнями специфичных АТ выявляли с помощью ранговой корреляции по Спирмену.

**Результаты**

*Содержание эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови женщин в постменопаузе*

Измерили содержание Es и Pg в сыворотке крови и рассчитали индивидуальные соотношения Pg/Es у женщин в постменопаузе, здоровых и больных РМЖ. В таблице 1 представлены результаты сопоставления сравниваемых групп по этим показателям. Медианы уровней Es оказались статистически значимо выше, а Pg – ниже у больных РМЖ. Соответственно и соотношение Pg/Es у больных РМЖ было ниже, чем в контроле.

Табл. 1

Таблица 1

Содержание эстрадиола (Es), прогестерона (Pg) и Pg/Es в сыворотке крови здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ)

Table 1

Blood serum levels of estradiol (Es), progesterone (Pg) and Pg/Es ratios in postmenopausal healthy women and breast cancer patients (BCP)

Содержание Es было одинаково низким в трёх основных подгруппах больных РМЖ по статусу гормональных рецепторов. Уровни Pg у больных РМЖ с ER+/PR+ оказалось статистически значимо выше, чем с ER–/PR– и ER+/PR– РМЖ, но ниже, чем у здоровых женщин. По соотношениям Pg/Es указанные подгруппы не различались, по-видимому, из-за очень низких уровней Es.

Не выявлено никаких различий по уровням Es и Pg, а также по соотношению Pg/Es между больными в разных стадиях РМЖ.

*Взаимосвязи уровней эстрадиола и прогестерона и специфических антител у женщин в постменопаузе*

Измерили уровни АТ класса А, специфичных Es и Pg, рассчитали индивидуальные соотношения IgA-Pg/IgA-Es и исследовали предполагаемые взаимосвязи с содержанием Es и Pg в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ с помощью корреляционного анализа. Результаты представлены в таблице 2.

Табл. 2

Таблица 2

Взаимосвязи уровней стероидных гормонов (*y*) и специфических антител (*x*) в сыворотке крови здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ)

Table 2

Correlations of steroids levels (*y*) and specific antibodies levels (*x*) in the blood serum of the healthy women and breast cancer patients

У здоровых женщин содержание Es слабо коррелировало с уровнями IgA-Es (положительно) и с соотношением Pg/Es (отрицательно), но не с IgA-Pg. Содержание Pg оказалось взаимосвязанным с уровнями IgA-Pg и с IgA-Pg/IgA-Es (положительная, статистически высоко достоверная корреляция), но не с IgA-Es. Взаимосвязь Pg/Es с IgA-Es оказалась слабой отрицательной, а с IgA-Pg/IgA-Es положительной, статистически высоко значимой.

У больных РМЖ выявили отрицательные взаимосвязи Es с IgA-Pg (слабые) и IgA-Pg/IgA-Es (статистически высоко значимые), но не с IgA-Es. Содержание Pg слабо коррелировало с IgA-Pg и с IgA-Pg/IgA-Es (положительно), но не с IgA-Es. Положительные корреляционные связи Pg/Es проявились с IgA-Pg и с IgA-Pg/IgA-Es (высоко значимые), но не с IgA-Es.

У здоровых женщин коэффициент *a* в уравнениях регрессии, описывающих взаимосвязи уровней исследуемых гормонов с соотношением IgA-Pg/IgA-Es, оказались в 2 раза ниже для Es и в 4 раза выше для Pg и Pg/Es, чем у больных РМЖ. Обнаруженные различия наглядно изображены на рисунке 1.

Рис. 1

Рисунок 1

Зависимости уровней Es (A) и Pg (B), а также соотношения Pg/Es (C) от соотношения уровней IgA-Pg/IgA-Es в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ

Figure 1

Correlations of Es (A) and Pg (B) levels and Pg/Es ratio with IgA-Pg/IgA-Es ratio

(C) in the blood serum of healthy women (HW) and breast cancer patients (BCP)

*Взаимосвязи уровней эстрадиола и прогестерона со специфичными антителами у больных раком молочной железы с различным статусом гормональных рецепторов в опухоли*

Описанные выше взаимосвязи, выявленные в общей группе больных РМЖ, имели характерные особенности в зависимости от наличия/отсутствия рецепторов Es и Pg в трёх основных подгруппах (табл.3).

Табл. 3

Таблица 3

Взаимосвязи уровней стероидных гормонов (*y*) и специфических антител (*x*) в сыворотке крови больных раком молочной железы (РМЖ) с разным статусом гормональных рецепторов (ER/PR)

Table 3

Correlations of steroids levels (*y*) and specific antibodies levels (*x*) in the blood serum of the breast cancer patients with the different status of steroids receptors (ER/PR)

У больных с отсутствием рецепторов Es и Pg (ER-/PR-) обнаружены только взаимосвязи IgA-Pg/IgA-Es с Es (отрицательная) и с Pg/Es (положительная). Однако, коэффициенты ***a*** в уравнениях регрессии оказались в 2 раза выше для Es и в 3,5 раза ниже для Pg/Es, чем у здоровых (сравнение с табл. 2).

Ни одной из искомых взаимосвязей не было обнаружено при наличии в опухоли ER и отсутствии PR (ER+/PR–).

При наличии в опухоли рецепторов и к Es, и к Pg (ER+/PR+) выявлены взаимосвязи IgA-Pg/IgA-Es с Es, Pg и Pg/Es, такие же, как и в общей группе больных РМЖ. Кроме того, для них было характерно наличие прямых взаимосвязей Pg и с IgA-Pg (статистически высоко достоверных), и с IgA-Es. IgA-Pg коррелировали с Pg/Es.

**Обсуждение**

Полученные результаты соответствуют известным представлениям о роли стероидных гормонов в возникновении РМЖ: проканцерогенных эффектов Es и антиканцерогенных – Pg [6, 12, 18]. У больных РМЖ содержание в сыворотке крови Es оказалось значительно выше, а Pg – ниже, чем у здоровых женщин в постменопаузе. Соотношение Pg/Es у больных также было ниже, чем в контроле. При этом содержание Pg в сыворотке у больных ER+/PR+ РМЖ оказалось выше, чем у больных ER-/PR- и ER+/PR-РМЖ, хотя и ниже, чем у здоровых. Содержание Eg в сыворотке крови было одинаково высоким, а соотношение Pg/Es одинаково низким у больных РМЖ независимо от наличия/отсутствие ER и PR. Это подтверждает ведущую роль Es в возникновении РМЖ и свидетельствует возможной роли Pg в отборе злокачественных клеток, содержащих PR.

Впервые у здоровых женщин были выявлены взаимосвязи между содержанием в сыворотке крови стероидных гормонов и соответствующих специфических АТ: уровни Es коррелировали с IgA-Es, а уровни Pg – с IgA-Рg. Наиболее значимые взаимосвязи обнаружены при анализе индивидуальных соотношений IgA-Pg/IgA-Es – с содержанием Pg и соотношением Pg/Es. Это подтверждает предположение о влиянии специфических АТ на содержание стероидных гормонов у человека в естественных условиях, а также свидетельствует о наличие взаимосвязи индивидуального иммунологического баланса между АТ к разным стероидам (IgA-Pg/IgA-Es) и индивидуального эндокринного баланса между разными стероидами (Pg/Es).

У больных РМЖ не обнаружили взаимосвязей между IgA-Es и Es. Корреляции Pg и Pg/Es с IgA-Pg и IgA-Pg/IgA-Es оказались значительно менее выраженными, чем у здоровых женщин. Это говорит об ослаблении иммунорегуляции содержание стероидных гормонов, т.е. об иммуно-гормональном дисбалансе при РМЖ.

Выявленные корреляции Pg и Pg/Es с IgA-Pg и IgA-Pg/IgA-Es оказались характерными только для больных с ER+/PR+ РМЖ, но не для ER–/PR– и ER+/PR–. Иными словами, при PR– РМЖ имело место полное отсутствие иммунорегуляция гормонального статуса, а при PR+ РМЖ иммунорегуляция сохранялась, но была значительно слабее, чем в норме.

Подобную трактовку полученных результатов нужно считать предварительной. Для понимания полной картины описанных явлений необходимо учитывать аффинность АТ, специфичных к Es и Pg, с помощью конкурентных методов иммуноанализа, а также влияние описанных ранее соответствующих антиидиотипических АТ [4] на взаимодействие гормонов и идиотипических АТ. Дальнейшее изучение выявленного феномена иммунорегуляции гормонального статуса в норме и при различных гормонозависимых заболеваниях у человека представляется весьма перспективными.

*Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос.задание № 0352-2018-0018).*