
ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *IL2* И *IL4* КАК МАРКЕРЫ БЕСПЛОДИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩЕГО ГЕНИТАЛЬНЫЙ ЭНДОМЕТРИОЗ

**К.С. Кублинский, И.Д. Евтушенко,
И.О. Наследникова**

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации
Московский тракт, 2, Томск, Россия, 634050

Т.А. Агаркова

Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и перинатологии»
Томского научного центра Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук
ул. С. Лазо, 5, Томск, Россия, 634063

Проведено клиническое и молекулярно-генетическое обследование и лечение 92 больных с генитальным эндометриозом, страдающих бесплодием. Комплексное лечение включало применение хирургического лапароскопического метода и гормональных препаратов (агонисты гонадотропин-рилизинг-гормонов, комбинированные оральные контрацептивы). Наличие в генотипе женщины вариантов ТТ полиморфизма Т-330G гена *IL2* и СС полиморфизма С-590Т гена *IL4* позволяет повысить эффективность терапии и увеличить частоту наступления беременности. Низкая эффективность лечения инфертильности на фоне эндометриоза ассоциирована с носительством комбинации рискованных генотипов: GG полиморфизма Т-330G гена *IL2* и ТТ полиморфизма С-590Т гена *IL4*.

Ключевые слова: эндометриоз, бесплодие, интерлейкин-2, интерлейкин-4, полиморфизм генов цитокинов.

Эндометриоз — дисгормональное, иммунозависимое, генетически детерминированное заболевание, связанное с доброкачественным разрастанием ткани, морфологически и функционально подобной эндометрию, за пределами слизистой оболочки полости матки [1, 4, 8, 10]. В структуре гинекологической заболеваемости эндометриоз занимает 3-е место после воспалительных процессов и миомы матки, поражая до 50% женщин с сохраненной менструальной функцией. При этом истинную частоту заболевания установить довольно трудно, поскольку, с одной стороны, диагноз можно поставить только интраоперационно, а с другой, у многих женщин оно протекает бессимптомно [3, 4, 11].

Эндометриоз приводит к функциональным и структурным изменениям в репродуктивной системе, стойкому болевому синдрому и бесплодию [1, 12]. По данным отечественных и зарубежных исследователей бесплодие при эндометриозе встречается в 30—60% случаев и является одним из основных симптомов проявления данной патологии [2, 8, 9].

Как свидетельствуют результаты ранее проведенных исследований, раскрывающих основы этиологии, патогенеза и клинических проявлений эндометриоза, разработана концепция лечения этого заболевания, включающая хирургический метод и медикаментозную терапию [1, 3, 5]. Однако, несмотря на полученные

достижения, частота наступления беременности у женщин с бесплодием, больных эндометриозом, после проведения курса лечения не превышает 30—33% [2, 3, 5, 6], что требует углубления исследований и поиска новых стратегий, направленных на повышение эффективности лечения.

Не вызывает сомнения тот факт, что в патогенезе генитального эндометриоза важная роль принадлежит нарушениям иммунного гомеостаза, том числе и генетически обусловленным, предрасполагающим к определенному ответу иммунной системы на формирование эндометриоидных гетеротопий, их инвазию и распространение. В последние годы большое внимание уделяется изучению роли цитокинов в механизмах формирования эндометриоидных очагов [1, 4, 9, 10].

Методами молекулярной медицины было установлено, что гены цитокинов характеризуются наличием одного или нескольких структурных полиморфизмов, которые оказывают влияние на функциональную активность или уровень экспрессии кодируемых белков [5]. В связи с этим представляется актуальным анализ аллельного полиморфизма генов иммунорегуляторных цитокинов при эндометриозе в сочетании с бесплодием с целью оценки возможного вклада в патогенез заболевания и влияния на эффективность лечения.

Материал и методы исследования. В исследовании приняли участие 135 пациенток репродуктивного возраста от 19 до 43 лет (средний возраст $30,6 \pm 1,2$ года), которые были госпитализированы в гинекологическую клинику ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России в 2009—2010 гг. для выполнения лечебно-диагностической и оперативной лапароскопии и гистероскопии. Показанием к оперативному вмешательству явилось бесплодие. Основную группу составили 92 пациентки (68%) с эндометриозом, страдающие бесплодием. Диагноз эндометриоза был поставлен в результате осмотра брюшины и органов малого таза на наличие эндометриоидных очагов в ходе эндоскопических методов исследования, с последующим гистологическим подтверждением. Группа сравнения была сформирована из 43 пациенток (32%) с бесплодием различной этиологии, которым была выполнена диагностическая лапароскопия и исключен генитальный эндометриоз. Лапароскопию и гистероскопию выполняли по стандартной методике с использованием аппаратуры фирмы «Karl Storz» (Германия).

У всех женщин было получено добровольное информированное согласие на забор и использование крови для проведения исследований. Кровь для молекулярно-генетических методов исследования получали из кубитальной вены в стандартных условиях у всех пациенток утром в день операции. Стабилизированные образцы крови хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента исследования. Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Исследование полиморфных участков генов цитокинов проводили с использованием аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были исследованы два полиморфных варианта: Т-330G гена *IL2* и С-590Т гена, локализованных в промоторных участках генов и отвечающих за уровень экспрессии соответствующих цитокинов. Амплификацию осуществляли согласно инструкции,

прилагаемой к коммерческому набору «АмплиСенс-200-1» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эппендорф» путем ПЦР, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе при использовании амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия). После проведения ПЦР 8 мкл амплификата разделяли в 2% агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромид, при напряжении 150 В в течение нескольких минут для последующей визуализации в ультрафиолетовом свете, подтверждающей наличие продукта амплификации. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду рUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим», Россия).

Содержание цитокинов (IL-2 и IL-4) в сыворотке крови и перитонеальной жидкости оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями, прилагаемыми производителями тест-систем («Cytimmune», США; «Procon», Россия). Оптическую плотность растворов регистрировали на микропланшетном фотометре Multiskan EX («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию цитокинов рассчитывали по калибровочной кривой.

Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Колмогорова—Смирнова; равенство выборочных средних проверяли по *t*-критерию Стьюдента (в случае нормального распределения) и *U*-критерию Манна—Уитни (при отклонении распределения от нормального). Для анализа ассоциации маркеров исследуемых генов с эндометриозом сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах женщин, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Об ассоциации разных генотипов и аллелей с заболеванием судили по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

Результаты исследования и их обсуждение. Ассоциация эндометриоза с бесплодием отмечается многими исследователями, изучающими данную проблему. В то же время в обзорах, обобщающих данные о взаимоотношении бесплодия и эндометриоза за последние годы, так и не был дан ответ на вопрос: имеют ли эти состояния четкую причинно-следственную, патогенетически обусловленную связь между собой? Несмотря на важность проблемы и большое количество предположений, однозначного и удовлетворительного объяснения увеличения частоты бесплодия у пациенток с эндометриозом до сих пор не существует [2, 3, 7, 9].

В ходе проведенного нами исследования было установлено, что средняя продолжительность бесплодия у пациенток с эндометриозом составила $3,6 \pm 1,1$ лет, которое у 61 пациентки (66%) было первичным, а у 31 женщины (34%) оказалось вторичным. Кроме того, 68 женщин (74%) данной группы предъявляли жалобы на болевой синдром, 68 (74%) — на дисменорею, 35 (38%) — на диспареунию, 33 (36%) — на нарушение менструального цикла по типу мено- и метроррагии.

Наиболее часто, в 85% случаев (у 78 пациенток), во время лапароскопии диагностировались малые формы эндометриоза, в то время как эндометриоидные кисты — в 64% (59 пациенток), из них двусторонние в 30% случаев. Частота ретроцервикального эндометриоза не превышала 13% (12 пациенток). У 53 больных (58%) в малом тазу был выявлен спаечный процесс различной степени вы-

раженности. Чаще встречался умеренно выраженный спаечный процесс органов малого таза — I—II степень составила 78% (41 пациентка), III степень и IV степень составили соответственно 18% и 4% случаев.

Соответственно выявленной патологии, пациенткам проводилась лапароскопическая коррекция, направленная в первую очередь на максимальное удаление всех видимых и пальпируемых очагов эндометриоза и восстановление нормальных отношений органов малого таза — термокаутеризация очагов эндометриоза была выполнена 79 пациенткам (86%), разделение спаек — 55 (60%) и цистэктомия — 59 (64%).

В группе сравнения продолжительность бесплодия составила $2,5 \pm 1,1$ лет. Первичное бесплодие встречалось у 17 женщин (40%), вторичное — у 26 (60%). Основные жалобы, предъявляемые пациентками, распределились следующим образом: на наличие болевого синдрома указывали 9 пациенток (20%), дисменорею — 6 (13,3%), нарушение менструального цикла по типу мено- и метроррагии — 6 (13,3%). Объем оперативного вмешательства для всех пациенток данной группы был одинаков и представлен, как уже указывалось выше, гистероскопией и диагностической лапароскопией.

Бесплодие при эндометриозе обусловлено нарушениями в иммунной системе, которые могут опосредоваться несколькими путями. Инфертильность может развиваться из-за повышенного фагоцитоза макрофагами сперматозоидов и яйцеклеток, в свою очередь повышенное содержание макрофагов в перитонеальной жидкости обусловлено развитием воспаления, вызванного присутствием самих гетеротопий, а активация фагоцитарной активности обусловлена наличием повышенного содержания ионов железа, попадающих в брюшную полость с ретроградной менструацией, наличием антител к фосфолипидам, эндометрию и сперматозоидам [2, 3, 7, 9].

Еще одна причина бесплодия при эндометриозе — количественные изменения в цитокиновой системе на локальном уровне. В перитонеальной жидкости у женщин с эндометриозом и бесплодием значительно повышен уровень ингибитора миграции макрофагов, что способствует росту гетеротопий. Сами гетеротопии секретируют специфические вещества, стимулирующие макрофагально-макроцитарную систему, в результате чего происходит изменение уровня интерлейкинов (IL), фактора некроза опухолей, факторов роста [2, 3].

В связи с этим на следующем этапе нашей работы всем обследованным женщинам был проведен анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных участков генов IL2 и IL4. Выбор цитокинов был не случаен, провоспалительный IL-2 играет ключевую роль иммунном ответе, что связано с его способностью направлять дифференцировку наивных CD4+ Т-лимфоцитов в Т-хелперы I типа (Th1) и регулировать интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа. Противовоспалительный IL-4, являясь продуктом Th2-лимфоцитов, выступает в качестве антагониста Т-активирующих цитокинов, тем самым способствуя поляризации иммунного ответа в направлении гуморального типа реагирования [6].

В промоторной зоне гена *IL2* известен полиморфизм T-330G, который относится к однонуклеотидным полиморфизмам и характеризуется заменой тиминового нуклеотида на гуаниновый [5]. В ходе иммуногенетического исследования

было установлено, что у женщин с эндометриозом (44%) и пациенток без данной патологии (47%) чаще встречался гомозиготный по аллелю Т генотип полиморфизма Т-330G гена *IL2*. Обращало на себя внимание статистически значимое увеличение частоты генотипа GG полиморфного участка Т-330G гена *IL2* среди женщин с эндометриозом ($\chi^2 = 1,46$; $p = 0,05$) относительно аналогичного показателя у женщин без эндометриоза. Кроме того, была показана положительная ассоциация генотипа GG (OR = 1,65) и аллеля G (OR = 1,30) полиморфного региона Т-330G гена *IL2* с эндометриозом (табл. 1).

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма Т-330G гена *IL2* (% , абс.) среди обследованных женщин

Регистрируемый показатель	Женщины без эндометриоза (n = 43)	Женщины с эндометриозом (n = 92)	χ^2	OR (95% CI)
ТТ	47 (20)	44 (40)	1,46 $p = 0,05$	0,88 (0,43—1,83)
TG	32 (14)	26 (24)		0,73 (0,33—1,61)
GG	21 (9)	30 (28)		1,65 (0,70—3,90)
Т	63 (54)	57 (104)	0,95 $p = 0,03$	0,77 (0,46—1,30)
G	37 (32)	43 (80)		1,30 (0,77—2,20)

Примечание. Здесь и в табл. 2: χ^2 — стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR — критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению с женщинами без эндометриоза с 95% доверительным интервалом.

Исходя из того, что исследуемый полиморфизм Т-330G гена *IL2* расположен в промоторной области, нами была предпринята попытка выяснить характер влияния данного полиморфизма на уровень продукции кодируемого цитокина. Была выявлена значимая ассоциация между сниженным содержанием ИЛ-2 в сыворотке крови (35,9 пг/мл, $p = 0,008$) и перитонеальной жидкости (29,6 пг/мл, $p = 0,032$) и генотипом GG полиморфизма Т-330G гена *IL2* у пациенток с эндометриозом. Таким образом, показано, что аллельный полиморфизм Т-330G гена *IL2* оказывает влияние на уровень секреции ИЛ-2. Наличие в генотипе женщины генотипа GG полиморфизма Т-330G гена *IL2* ведет к гипопродукции соответствующего белка, что способствует функциональному дефекту клеточного звена иммунной системы, что в свою очередь является фактором риска развития эндометриоза.

Обнаруженное нами повышение уровня ИЛ-4 в сыворотке крови (77,8 пг/мл, $p = 0,047$) и перитонеальной жидкости (102,3 пг/мл, $p = 0,003$) у пациенток с эндометриозом позволило предположить влияние структуры промотора гена *IL4* на активность транскрипции и дальнейшего синтеза цитокина. По данным литературы, на роль иммуногенетического маркера претендует аллельный полиморфизм С-590Т гена *IL4* [5, 7, 9].

Исследование характера распределения аллелей и генотипов полиморфизма С-590Т промотора гена *IL4* показало, что большая часть обследованных женщин

являются носителями гомозиготного варианта СС полиморфного участка С-590Т гена *IL4*. Также было отмечено статистически значимое увеличение количества гомозигот по аллелю Т среди пациенток с эндометриозом ($\chi^2 = 8,18$; $p = 0,02$) по сравнению с женщинами без данной патологии. Выявлена положительная ассоциация эндометриоза с аллелем Т (OR = 2,14), а также с генотипом ТТ (OR = 3,79) полиморфизма С-590Т гена *IL4*. Показано также, что протективным эффектом обладает аллель С (OR = 0,47) (табл. 2).

Таблица 2

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма С-590Т гена *IL4* (% , абс.) среди обследованных женщин

Регистрируемый показатель	Женщины без эндометриоза (n = 43)	Женщины с эндометриозом (n = 92)	χ^2	OR (95% CI)
СС	51 (22)	39 (36)	8,18 $p = 0,02$	0,61 (0,30—1,27)
СТ	35 (15)	23 (21)		0,55 (0,25—1,22)
ТТ	14 (6)	38 (35)		3,79 (1,45—9,89)
С	69 (59)	51 (93)	7,77 $p = 0,005$	0,47 (0,27—0,80)
Т	31 (27)	49 (91)		2,14 (1,25—3,67)

Следует подчеркнуть, что полиморфизм С-590Т гена *IL4* также расположен в промоторном регионе и неоспоримым является факт влияния структуры промоторной области на уровень транскрипции гена, судить о котором можно по концентрации кодируемого этим геном продукта. В ходе проведенного исследования было установлено, что наличие в промоторном регионе аллельного варианта –590Т определяет более высокий уровень продукции IL-4 при эндометриозе. Таким образом, присутствие в генотипе женщины аллеля Т и генотипа ТТ полиморфизма С-590Т гена *IL4* обуславливает повышенный синтез IL-4, что вызывает поляризацию иммунного ответа и ингибирование Т-клеточной пролиферации, что способствует инвазии эндометриоидных гетеротопий.

Пожалуй, основной функцией иммунной системы организма является поддержание постоянства антигенной структуры, что подразумевает как защиту от чужеродных, так и от генетически измененных своих антигенов, в частности от эндометриоидных гетеротопий [8]. Взаимодействие участников иммунного ответа происходит путем обмена универсальными цитокиновыми сигналами. Нарушения в системе цитокинов необратимо влекут за собой невозможность кооперации и координации иммунной системы, что ведет к пролиферации и инвазии ткани, морфологически и функционально подобной эндометрию, за пределами слизистой оболочки полости матки [4]. Неоспоримым является тот факт, что особенности реагирования организма заложены в нуклеотидной последовательности молекул ДНК, находящихся в ядре клетки. Но нельзя забывать о том, что регуляция генома клетки — процесс очень сложный и в настоящее время недостаточно изученный.

Известно, что гены цитокинов, находящихся в антагонистических отношениях (как IL-2 и IL-4), способны оказывать ингибирующее влияние друг на друга. В связи с этим был проведен анализ распространенности ассоциаций аллельного полиморфизма T-330G гена *IL2* и C-590T гена *IL4* с эндометриозом. Как показало проведенное исследование, наибольший риск развития эндометриоза оказался ассоциирован с одновременным носительством варианта GG полиморфизма T-330G гена *IL2* (ответственного за низкую продукцию IL-2) и генотипа TT полиморфизма C-590T гена *IL4* (ассоциированного с высоким уровнем IL-4).

В заключительной части исследования была проведена оценка эффективности лечения, которая осуществлялась по частоте наступления маточной беременности в течение года с момента проведения оперативного вмешательства. У пациенток с эндометриозом частота ее наступления не превышала 28% (26 пациенток), в то время, как в группе сравнения маточная беременность наступила в 57% случаев (25 пациенток). Среди пациенток с эндометриозом наиболее часто — в 43% случаев (13 пациенток) — маточная беременность наступала после приема агонистов гонадотропин-рилизинг гормона, реже — после лечения комбинированными оральными контрацептивами — 26% (11 пациенток), без лечения — не превышала 9% (2 пациентки). Небезынтересно отметить, что низкая частота наступления беременности после лечения эндометриоза была ассоциирована с носительством комбинации рискованных генотипов: GG полиморфизма T-330G гена *IL2* и TT полиморфизма C-590T гена *IL4* (OR = 8,63), практически не обнаруженной среди пациенток без эндометриоза. Наличие в генотипе женщины вариантов TT полиморфизма T-330G гена *IL2* и CC полиморфизма C-590T гена *IL4* (OR = 0,39) позволяет повысить эффективность терапии и увеличить частоту наступления беременности.

Таким образом, терапия бесплодия у пациенток с генитальным эндометриозом должна проводиться исключительно после подтверждения диагноза. Максимально эффективным является сочетание лапароскопической коррекции патологии органов малого таза с последующей медикаментозной терапией, направленной на длительное подавление овуляции и создание гипоестрогении. Однако поиск молекулярно-генетических маркеров может дать дополнительную информацию о биологическом поведении эндометриозных гетеротипий. В связи с этим идентификация генов и их аллелей, от экспрессии которых зависит предрасположенность или резистентность к эндометриозу, а также эффективность лечения бесплодия у данных пациенток, является актуальной и перспективной задачей.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. — М.: Медицина, 2006.
- [2] Акушерство: Национальное руководство / Под ред. Э.К. Айламазяна, В.И. Кулакова, В.Е. Радзинского, Г.М. Савельевой. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.
- [3] Герасимов А.М. Причины бесплодия при наружном эндометриозе // Вестник акуш. гин. — 2008. — № 1. — С. 31—35.
- [4] Ищенко А.И., Кудрина Е.А. Эндометриоз: диагностика и лечение. — М.: МИА, 2008.
- [5] Крутова В.А., Галустян С.А., Белкина Н.В. Комплексное лечение женщин, страдающих бесплодием, ассоциированным с генитальным эндометриозом // Вестник акуш. гин. — 2008. — № 2. — С. 46—49.

- [6] Куценко И.И., Лукошкина И.Н., Губанова М.А., Хорольская А.Е. Оптимизация подготовки к программе ЭКО пациенток с аденомиозом // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Медицина». — 2012. — № 5. — С. 160—166.
- [7] Макаров О.В., Романовская В.В., Кузнецов П.А., Магомедова А.М. Иммунологические аспекты преждевременных родов инфекционного генеза // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Медицина». — 2011. — № 6. — С. 373—379.
- [8] Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека. — Томск: Печатная мануфактура, 2007.
- [9] Радзинский В.Е., Ордяниц И.М., Оразмурадов А.А. Женская консультация. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2009.
- [10] Радзинский В.Е. Рук-во к практическим занятиям по гинекологии. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.
- [11] Репродуктивное здоровье: Учеб. пособ. / Под ред. В.Е. Радзинского. — М.: РУДН, 2011.
- [12] Allaire C. Endometriosis and infertility: a review // J. Reprod. Med. — 2006. — V. 51. — № 3. — P. 164—168.

POLYMORPHIC VARIANTS OF IL2 AND IL4 GENES AS MARKERS OF INFERTILITY IN CASE OF GENITAL ENDOMETRIOSIS

**K.S. Kublinsky, I.D. Evtushenko,
I.O. Naslednikova**

Medical Research Associate, clinical gynaecologist
at Siberian State Medical University,
Federal Institution of Higher Professional Education
controlled by Ministry of Health and Social Development of Russian Federation
Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, Russia, 634050

T.A. Agarkova

State Scientific Research Institution of Obstetrics, Gynaecology and Perinatology
Tomsk Scientific Centre,
Siberian Department of Russian Academy of Medical Science
S. Lazo str., 5, Tomsk, Russia, 634050

92 patients with genital endometriosis and diagnosed infertility were clinically examined and went through molecular-genetical testing and therapy. Complex therapy included laparoscopic surgery and the course of hormonal therapy (gonadotrophin releasing hormone agonists, combined oral contraceptives). The effect of the therapy increases as increases the possibility of pregnancy in the presence of IL2 gene T-330G TT polymorphism variant and IL4 gene C-590T CC polymorphism variant in the genotype of a woman. The decreased effect of infertility treatment with the diagnosed endometriosis is associated with the presence of the hazardous genotype combination: IL2 gene T-330G GG polymorphism and IL4 gene C-590T TT polymorphism.

Key words: endometriosis, infertility, interleukin-2, interleukin-4, cytokines genes polymorphism.