

На правах рукописи

МЕНЬШИКОВА Наталья Сергеевна

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАРУЖНОГО
ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА**

14.03.03 – патологическая физиология

14.01. 01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Доктор медицинских наук Наследникова Ирина Олеговна

Доктор медицинских наук,
профессор Евтушенко Ирина Дмитриевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор, профессор кафедры биохимии
и молекулярной биологии ГБОУ ВПО
СибГМУ Минздрава России Степовая Елена Алексеевна

Доктор медицинских наук,
профессор, руководитель отделения
гинекологии ФГБУ «НИИ онкологии»
СО РАМН Коломиец Лариса Александровна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская Государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__»_____2013 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__»_____2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова И.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Несмотря на существенные достижения отечественной и зарубежной медицины и фармакологии, эндометриоз является одной из ведущих проблем современной медико-биологической науки. В структуре гинекологической заболеваемости эта патология занимает третье место после воспалительных заболеваний органов малого таза и миомы матки. Частота эндометриоза среди женщин репродуктивного возраста колеблется в пределах 7-59%. У женщин с бесплодием эндометриоз встречается в 12-30% случаев. Больные эндометриозом страдают дисменореей (45-60%), тазовой болью (30-50%), диспареунией (25-40%), нарушениями менструального цикла (10-20%), бесплодием (25-60%) [Адамян Л.В. и др., 2006; Сонова М. М., 2009; Стрижаков А.Н. и др., 2009; Ozkan S., 2009; Дамиров М.М., 2010; Линде В.А., Татарова Н.А., 2010; Chae S.J. et al., 2010; Taylor E., 2010; Fanta M., 2012; Koninckx P.R. et al., 2012; Wenger J.M. et al., 2012].

Многообразие локализаций очагов эндометриоза обусловило многократность гипотез о его происхождении. В последние годы получены убедительные данные, подтверждающие ведущую роль генетических факторов, а также уточняющие значение дисфункции иммунной и эндокринной систем в развитии этой патологии. Современные исследователи склонны расценивать рост очагов эндометриоза как результат отсутствия адекватного контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток гетеротопий со стороны организма женщины [Адамян и др., 2006; Ярмолинская М.И., 2007, Podgaec S. et al., 2007; Лысенко М.А., 2008; Huang H.Y., 2008; Сонова М.М., 2009; Dun E.C. et al., 2010; Конева О.А., 2011].

Накоплен определенный материал о роли цитокинов, контролирующих процессы апоптоза, пролиферации и дифференцировки, а также обеспечивающих благоприятные условия для внедрения и развития фрагментов эндометрия [Адамян Л.В. и др., 2006; Nisolle M., 2007; Ищенко А.И., Кудрина Е.А., 2008; Бурлев В.А. и др., 2010, Wenger J.M. et al., 2009, McLeod B.S. et al., 2010; Gidwaney R. et al., 2012]. Одной из возможных причин распространения, инвазии и гиперпролиферации эндометриоидных гетеротопий служит дисбаланс Th1- и Th2-цитокинов, особенно на ранних стадиях заболевания. В частности, показано, что генитальный эндометриоз с рецидивирующим течением сопровождается преимущественно гиперпродукцией цитокинов типа Th2 [Анциферова Ю.С., 2003; Wieser F. et al., 2003; Braundmeier A.G., Nowak R.A., 2006; Huang H.Y., 2008; Hou Z. et al., 2009; He K.L. et al., 2011; Mao T. Et al., 2012].

Установлено, что структурные особенности белковых продуктов полиморфных генов цитокинов ведут к различному качеству иммунного ответа и, соответственно, к различному течению и исходу болезни. Однако вопрос о том, имеется ли генетическая основа индивидуальных особенностей реагирования системы иммунитета при эндометриозе, изучен недостаточно, и имеющиеся на сегодняшний день данные весьма противоречивы

[Стрижаков А., Давыдов А., 2006; Nisolle M., 2007; Ищенко А.И., Кудрина Е.А., 2008; Chae S.J. et al., 2010; Peters V.A. et al., 2012; Veillat V. et al., 2012].

В связи с этим в последние годы одним из приоритетных направлений медицины является поиск молекулярно-генетических маркеров различных заболеваний, в том числе эндометриоза, позволяющих формировать группы риска с использованием неинвазивных методов исследования. Формирование этих групп требует методологически правильного подхода, основанного на четком знании факторов, определяющих повышенный риск заболевания [Ищенко А.И., Кудрина Е.А., 2002, 2008; Huang H.Y., 2008; Hernández-Valencia M., Zárate A., 2009; Бурлев В.А. и др., 2010; McLeod B.S. et al., 2010]. Таким образом, идентификация иммунорегуляторных генов и их продуктов, участвующих в формировании и распространении эндометриозидных гетеротопий, позволит глубже проникнуть в фундаментальные механизмы данной патологии.

Цель исследования: выявить иммуногенетические особенности наружного генитального эндометриоза в зависимости от аллельного полиморфизма генов иммунорегуляторных цитокинов и степени распространения процесса.

Задачи исследования:

1. Оценить содержание иммунорегуляторных цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 β , TNF- α , TGF- β) в сыворотке крови у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.
2. Изучить распределение аллельных вариантов и генотипов генов *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IL12B*, *TNFA*, *TGFB* у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.
3. Определить ассоциацию полиморфных генов *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IL12B*, *TNFA*, *TGFB* с концентрацией соответствующих цитокинов в сыворотке крови у пациенток с наружным генитальным эндометриозом.
4. Выявить иммуногенетические критерии риска развития и неблагоприятного течения наружного генитального эндометриоза.

Научная новизна. С привлечением современных иммуногенетических методов исследования охарактеризована частота полиморфных вариантов генов про- и противовоспалительных цитокинов (*T-330G* гена *IL2* (rs2069762), *C-590T* гена *IL4* (rs2243250), *C-592A* гена *IL10* (rs1800872), *A-1188C* гена *IL12B* (rs3212227), *G-308A* гена *TNFA* (rs1800629), *C-509T* гена *TGFB* (rs1800469) у женщин с наружным генитальным эндометриозом разной степени распространения. Выделены генетические факторы цитокинового дисбаланса (повышение концентрации IL-4, IL-10, TNF- α , TGF- β при снижении содержания IL-2 и IL-12 β в крови). Показано, что генотипы *TT* (*C-590T*) гена *IL4*, *CC* (*C-592A*) гена *IL10*, *TT* (*C-509T*) гена *TGFB* ассоциированы с повышенной концентрацией, а *GG* (*T-330G*) гена *IL2* и *AA* (*A-1188C*) гена *IL12B* с низким уровнем соответствующих цитокинов в сыворотке крови у женщин с наружным генитальным эндометриозом. Установлена связь аллельного полиморфизма генов иммунорегуляторных цитокинов с наружным генитальным эндометриозом, степенью его

распространения, характером течения заболевания. Тяжелое течение генитального эндометриоза (3-4 степень распространения) ассоциировано с аллелем *T* и генотипом *TT* полиморфизма *C-590T* гена *IL4*. Развитие наружного генитального эндометриоза определено носительством «рисковых» комбинаций полиморфных вариантов генов цитокинов, таких как: *IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGG*, *IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGA*, *IL2TT/IL4TT/IL10CA/TNFAGG*, *IL2TG/IL4TT/IL10CC/TNFAGG*, *IL2TG/IL4TT/IL10AC/TNFAGG*. Комбинация генотипов *TT(T-330G)IL2/TT(C-590T)IL4/CC(C-592A)IL10/GG(G-308A)TNFA* ассоциирована с рецидивирующим течением наружного генитального эндометриоза.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные фундаментального характера раскрывают новые иммуногенетические аспекты развития наружного генитального эндометриоза. Результаты исследования полиморфизма генов иммунорегуляторных цитокинов (*IL2*, *IL4*, *IL10*, *IL12B*, *TNFA*, *TGFB*) представляются важными для формирования новых знаний о генетически детерминированной предрасположенности или резистентности женщины к развитию эндометриоза, позволяют глубже проникнуть в молекулярные механизмы данной патологии. Практическая значимость исследования состоит в обосновании возможности использования выявленных рискованных сочетаний полиморфных генов иммунорегуляторных цитокинов в диагностике, характеристике распространения и рецидивирования наружного генитального эндометриоза. Основные положения исследования могут служить базисом для создания и внедрения панели иммуногенетических маркеров для эффективной диагностики и выбора рациональной тактики ведения больных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изменения в иммунной системе женщин с наружным генитальным эндометриозом характеризуются повышением концентрации ИЛ-4, ИЛ-10, TNF- α и TGF- β и снижением уровня ИЛ-2 и ИЛ-12 β в сыворотке крови. При этом у пациенток с тяжелым течением генитального эндометриоза (3-4 степень распространения) содержание ИЛ-4, ИЛ-10, TNF- α и TGF- β в крови выше, чем у женщин с легким течением заболевания (1-2 степень распространения).
2. Генотипы *GG* полиморфизма *T-330G* гена *IL2*, *TT* полиморфного региона *C-590T* гена *IL4*, *AA* промоторного региона *C-592A* гена *IL10* и *AA G-308A* гена *TNFA* играют важную роль в этиологии и патогенезе наружного генитального эндометриоза, поскольку частота встречаемости данных вариантных генотипов у больных женщин статистически значимо превышает таковую у здоровых.
3. Повышенное содержание ИЛ-4 в сыворотке крови ассоциировано с генотипом *TT (C-590T)* гена *IL4*; ИЛ-10 – с *CC (C-592A)* гена *IL10*; TNF- α – с *AA (G-308A)* гена *TNFA*; TGF- β – с *TT (C-509T)* гена *TGFB*; низкая концентрация ИЛ-2 сопряжена с генотипом *GG* аллельного полиморфизма (*T-330G*) гена *IL2*, ИЛ-12 β с генотипом *AA (A-1188C)* гена *IL12B* у женщин с наружным генитальным эндометриозом.

4. Носительство аллеля *T* и генотипа *TT* полиморфизма *C-590T* гена *IL4* ассоциировано с тяжелым течением наружного генитального эндометриоза (3-4 степень распространения).
5. Суммарный предрасполагающий эффект полиморфных генов иммунорегуляторных цитокинов оказывает влияние на формирование предрасположенности к развитию и характеру течения наружного генитального эндометриоза:
- носительство комбинаций *IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGG*, *IL2TT/IL4TT/IL10CA/TNFAGG*, *IL2TG/IL4TT/IL10CC/TNFAGG*, *IL2TG/IL4TT/IL10AC/TNFAGG* увеличивает риск развития генитального эндометриоза;
 - рецидивирующее течение генитального эндометриоза характерно для носителей комбинации генотипов *TT(T-330G)IL2/TT(C-590T)IL4/CC(C-592A)IL10/GG(G-308A)TNFA*.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XI Российском конгрессе с международным участием молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2010, 2011), на 15-ой международной научно-практической конференции «Клинические и фундаментальные аспекты репродуктивных проблем и здоровья женщины» (Кемерово, 2011), на Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии в перинатологии, репродуктивной медицине и педиатрии» (Новосибирск, 2011), на Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы репродукции: от планирования беременности до вспомогательных репродуктивных технологий» (Томск, 2011), на VII международной научно-практической конференции «Образование и наука на XXI век-2011» (София, 2011), на Межрегиональной научно-практической конференции «Амбулаторно-поликлиническая помощь в акушерстве и гинекологии» (Томск, 2011, 2012), на Общероссийском научно-практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: сибирские чтения. Здоровье женщин как национальное достояние» (Новосибирск, 2012), на конференции молодых учёных в рамках международной конференции «Тромбофилические аномалии и акушерские кровотечения» (Томск, 2012), на 8-ой международной научно-практической конференции «Динамика на съвременната наука» (София, 2012), на II-ой Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты репродуктологии» (Иркутск, 2012), на III ежегодной конференции молодых учёных и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых учёных и специалистов» (Санкт-Петербург, 2012), на VII Międzynarodowej naukowí-praktycznej konferencji «Dynamika naukowych badañ - 2012» (Przemyśl, 2012), на заседании Томского регионального отделения Всероссийского общества акушеров-гинекологов, на научных семинарах кафедр патофизиологии и акушерства и гинекологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Томск, 2010-2012).

Результаты исследований используются в лекционном курсе по патофизиологии в разделах «Патофизиология клетки», «Патофизиология иммунитета», «Роль наследственности в патологии» и по гинекологии в разделе «Генитальный эндометриоз».

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в разработке идеи и планировании исследования, анализировал литературу. В исследование включено 300 пациенток. Во всех случаях было проведено хирургическое лечение с участием автора. При проведении данного исследования автором самостоятельно выполнены лабораторные методы: иммуноферментный анализ, аллель-специфическая полимеразная цепная реакция. Статистическая обработка полученных данных, обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены автором лично.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 1 рисунком и 42 таблицами. Библиографический указатель включает 219 источника, из них 79 отечественных и 140 зарубежных.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели исследования и решения задач было обследовано 300 женщин в возрасте от 18 до 40 лет, находившихся на стационарном лечении в гинекологической клинике Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (зав. – канд. мед. наук Ткачев В.Н.) с 2010 по 2012 гг., подписавших информированное согласие на участие в исследовании.

В программу исследования были включены женщины европеоидного происхождения, проживающие на территории г. Томска и Томской области, поскольку существуют значительные межрасовые различия в распределении исследуемых генотипов и аллелей.

Все обследованные нами женщины были разделены на 2 группы: основную и группу контроля. В основную группу были включены 200 пациенток, страдающих наружным генитальным эндометриозом.

Критерии включения:

- репродуктивный возраст 18-40 лет;
- подтверждённый диагноз «наружный генитальный эндометриоз» (лапароскопически и гистологически);
- согласие на участие в исследовании.

Согласно классификации американского общества фертильности (R-AFS, 1985г.), обследованные женщины были распределены на две подгруппы в зависимости от степени распространения ГЭ:

- женщины с I-II степенью распространения – 107 пациенток;
- женщины с III-IV степенью распространения – 93 пациентки.

Контрольная группа состояла из 100 женщин, которым проводилась диагностическая лапароскопия, при проведении которой не было выявлено органической патологии. Показания: хроническая тазовая боль, хирургическая стерилизация женщин с реализованной репродуктивной функцией и бесплодие.

Критерии исключения были общими для двух групп:

- возраст до 18 и после 40 лет;
- другая патология органов малого таза (воспалительные заболевания, миома матки, врождённая аномалия);
- экстрагенитальные заболевания в стадии декомпенсации;
- онкологические заболевания;
- участие в другом клиническом исследовании;
- отказ от участия в данном исследовании.

У всех женщин изучали анамнез, проводили общее и гинекологическое (бимануальное) обследование, ультразвуковое исследование органов малого таза на 5-6 день менструального цикла. Выясняли клинические проявления генитального эндометриоза и проводили оценку интенсивности болей согласно шкале MacLavery C.M., Shaw R.W. [1995].

Всем женщинам была проведена лапароскопия с последующим гистологическим исследованием операционного материала. Информация по обследованию женщин (протокол исследования, информированное согласие) и о возможных последствиях методов обследования (лапароскопии, взятие крови из локтевой вены утром натощак) были представлены в этический комитет Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. По представленной документации замечаний не было, работа соответствовала требованиям этической экспертизы.

Для оценки уровня IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 β , TNF- α и TGF- β в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA), который проводили по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Cytimmune», США). Выделение ДНК из периферической крови проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Исследование полиморфных участков генов цитокинов проводили с использованием аллель-специфической амплификации специфических участков генома [Кофиади И.А., 2006].

Аmplification осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к набору «АмплиСенс-200-1» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эпшендорф» путём полимеразной цепной реакции, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе с применением амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия) [Howell W.M. et al., 2003; Кофиади И.А., Ребриков Д.В., 2006; Hollegaard M.V., Bidwell J.L., 2006; Абрамов Д.Д. и др., 2011]. Были исследованы полиморфные варианты генов цитокинов *T-330G* гена *IL2* (rs2069762), *C-590T* гена *IL-4* (rs2243250), *C-592A* гена *IL10* (rs1800872), *A-1188C* гена *IL12B* (rs3212227), *G-308A* гена *TNFA* (rs1800629), *C-509T* гена *TGFB* (rs1800469).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных алгоритмов биометрии с помощью программы Microsoft Excel (2007), стандартного пакета программ SPSS® 17.0 for Windows. Для определения соответствия распределения количественных признаков нормальному закону использовали критерий Шапиро-Уилка. Проверку статистической значимости равенства выборочных средних, имеющих ненормальный закон распределения, осуществляли с помощью U-критерия Манна-Уитни для двух групп и с помощью критерия Крускала-Уолиса для трех групп. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ и $p < 0,001$. Для анализа качественных независимых данных использовали хи-квадрат Пирсона, точный критерий Фишера [Гланц С., 1998; Гмурман В.Е., 2006]. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера [Вейр Б., 1995]. Для анализа ассоциации маркеров исследуемых генов с эндометриозом сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых индивидов, используя критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. При численностях генотипов менее пяти использовали точный тест Фишера. В дополнение к этому об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с заболеванием судили по величине отношения шансов (OR) [Флейс Дж., 1989].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эндометриоз – генетически детерминированное, хроническое, дисгормональное, иммунозависимое заболевание с доброкачественным разрастанием ткани, идентичной по морфологическому строению и функции эндометрию, за пределами слизистой оболочки матки [Адамян Л.В. и др., 2006; Цвелёв Ю.В. и др., 2007; Nisolle M. et al., 2007; Ищенко А.И., Кудрина Е.А., 2008; Дамиров М.М., 2010; Koninckx P.R. et al., 2012; Wenger J.M. et al., 2012].

Клинические проявления эндометриоза чрезвычайно вариабельны и зависят от возраста больных, длительности течения заболевания, психо-эмоционального состояния женщины, локализации патологического процесса, площади поражения, наличия сопутствующих заболеваний.

Основную массу обследованных нами пациенток составили социально активные, работающие женщины. По данным литературы, отмечается

повсеместный рост ГЭ среди населения всего мира, причём, как правило, это «болезнь интеллектуальных, активных и деловых женщин» [Баскаков В.П. и др., 2003; Дамиров М.М., 2010].

Кроме того, 4,5% женщин, страдающих генитальным эндометриозом, имели отягощённую наследственность по данной патологии. Было обнаружено, что у женщин с эндометриозом 3-4 степени рецидив заболевания встречалась чаще (19,4%), чем у женщин с 1-2 степенью распространения процесса (6,5%).

В нашем исследовании больные эндометриозом женщины предъявляли жалобы на тазовую боль, дисменорею, диспареунию и бесплодие. Так, на тазовую боль жаловались 27,1% пациенток с 1-2 степенью и 64,5% - с 3-4 степенью распространения процесса. При этом боль была слабой у 13,1 и, соответственно, у 21,5% женщин; умеренной – у 11,2 и 34,4%; сильной – у 2,8 и 8,6%. На дисменорею жаловалось 28,9% женщин с 1-2 степенью распространения эндометриоза, при этом у 27,1% дисменорея оценивалась как слабая и у 1,9% – умеренная. У женщин с 3-4 степенью распространения процесса дисменорея встречалась у 50%; у 41,9% – зарегистрирована слабая и у 7,5% – умеренная дисменорея. Частота встречаемости такого симптома, как диспареуния, составила 17,7% среди женщин с 1-2 степенью распространения заболевания и 26,8% - среди женщин с тяжёлым течением ГЭ. 141 женщина предъявляла жалобы на бесплодие. Первичное бесплодие практически одинаково часто встречалось у женщин с разной степенью распространения заболевания (48,6 и 45,2% соответственно). Вторичное бесплодие у женщин с 1-2 степенью распространения ГЭ встречалось у 29,9%, а с 3-4 степенью распространения процесса – у 16,1% случаев.

Проанализировав многообразие теорий возникновения эндометриоза, вынуждены признать, что причины заболевания до настоящего момента окончательно не выявлены. Важную роль в этиопатогенезе эндометриоза имеют иммуногенетические факторы. Вместе с тем следует признать, что на сегодняшний день данные литературы, касающиеся изучения иммунных и генетических аспектов эндометриоза, немногочисленны и дают противоречивую информацию [Адамян и др., 2006; Баранов В.С. и др., 2009, Dun E.C. et al., 2010, Lakshmi K.V. et al., 2010].

В последние годы большое внимание уделяется изучению роли цитокинов в патогенезе генитального эндометриоза [Адамян и др., 2006; Ярмолинская М.И., 2007, Podgaec S. et al., 2007; Лысенко М.А., 2008; Dun E.C. et al., 2010]. Значительная роль в генезе эндометриозной болезни отводится так же генетической предрасположенности [Адамян Л.В. и др., 2006, Ищенко А.И., Кудрина Е.А., 2007; Wenger J.M. et al., 2009; Бурлев В.А. и др., 2010; McLeod B.S. et al., 2010].

К вышеизложенному следует добавить, что в настоящей работе нами была определена концентрация провоспалительных (IL-2, IL-12 β и TNF- α) и противовоспалительных (IL-4, IL-10 и TGF- β) цитокинов в сыворотке крови женщин с эндометриозом. Так, у женщин с ГЭ было выявлено снижение в 2,5 раза уровня IL-2 по сравнению с аналогичным показателем у женщин без

заболевания. Содержание IL-4 оказалось в 4 раза, а IL-10 – в 2 раза выше соответствующих показателей у здоровых женщин. Концентрация TNF- α и TGF- β была почти в 2 раза выше таковых показателей у женщин без заболевания ($p < 0,001$) (рис. 1).

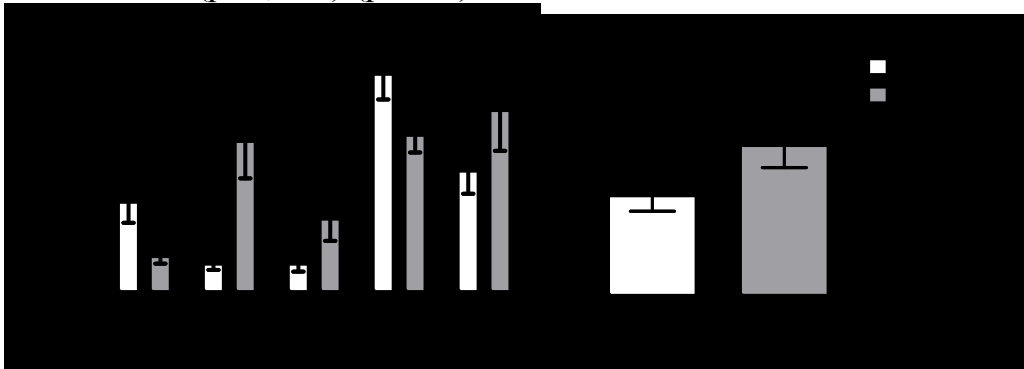
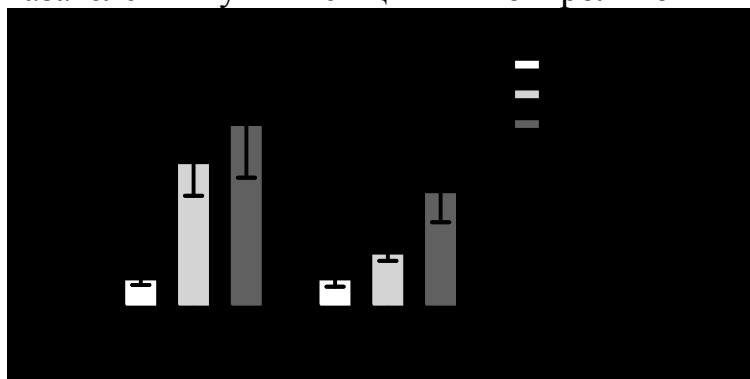


Рисунок 1. Содержание цитокинов в сыворотке крови (пг/мл) у женщин с эндометриозом (Me(Q₁-Q₃)), * - статистически значимая разница

Было установлено, что у женщин с 1-2 степенью распространения ГЭ концентрация IL-4 была в 5 раз выше, чем у женщин без эндометриоза ($p < 0,001$). У женщин с 3-4 степенью распространения ГЭ уровень IL-4 в сыворотке крови оказался в 7 раз, а IL-10 – в 4 раза выше соответствующих показателей у женщин контрольной группы ($p < 0,001$) (рис.



2).
Рисунок 2. Содержание цитокинов в сыворотке крови (пг/мл) у женщин с эндометриозом различной степени распространения (R-AFS, 1985 г.), (Me (Q₁-Q₃)), *, # - статистически значимая разница

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при НГЭ иммунный ответ развивается по Th2-пути, что и способствует снижению клеточно-опосредованных реакций, необходимых для эффективной элиминации атипично локализованных эндометриоидных элементов.

Исследования последних лет доказывают, что подверженность заболеванию зависит от определенных аллельных вариантов генов, формирующих неблагоприятный наследственный фон. Поиск маркеров предрасположенности к эндометриозу среди аллелей генов цитокинов – новый, перспективный раздел исследований.

В исследовании мы провели анализ SNP в промоторах генов

кандидатов про- и противовоспалительных цитокинов, которые может быть связаны с развитием НГЭ. Данные литературы свидетельствуют о том, что изученные нами полиморфные маркеры могут влиять на уровень экспрессии гена соответствующих цитокинов [Smith A.J., Humphries S.E., 2009].

В связи с изложенным выше актуальным явилось изучение взаимосвязи аллельного полиморфизма генов *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IL12B*, *TNFA*, *TGFB* с развитием и тяжестью течения наружного генитального эндометриоза.

В ходе проведенного нами исследования было показано, что у женщин с эндометриозом распределение аллелей и генотипов исследуемых полиморфных сайтов генов цитокинов значимо отличался от такового группы контроля (табл.1).

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей T-330G гена *IL2*, C-590T гена *IL4*, C-592A гена *IL10*, A-1188C гена *IL12B*, C-509T гена *TGFB* и G-308A гена *TNFA* (% , абс.) у женщин с генитальным эндометриозом

Полиморфизм	Аллели и генотипы	Женщины без ГЭ, % (абс)	Женщины с ГЭ, % (абс)	χ^2	OR (95% CI)
T-330G гена <i>IL2</i>	<i>TT</i>	60 (60,00)	94* (47,00)	6,042 p<0,05	0,59 (0,36-0,96)
	<i>TG</i>	30 (30,00)	75 (37,50)		1,40 (0,84-2,34)
	<i>GG</i>	10 (10,00)	31 (15,50)		1,65 (0,77-3,52)
	<i>G</i>	25 (25,00)	69 (34,30)	5,32 p<0,05	1,56 (1,07 – 2,29)
C-590T гена <i>IL4</i>	<i>CC</i>	70 (70,00)	110* (55,00)	10,90 p<0,05	0,52 (0,31-0,87)
	<i>CT</i>	30 (30,00)	70 (35,00)		1,26 (0,75-2,11)
	<i>TT</i>	0 (0,00)	20* (10,00)		22,83 (1,37-381,47)
	<i>T</i>	15 (15,00)	55 (27,50)	11,65 p<0,05	2,50 (1,38-3,36)
C-592A гена <i>IL10</i>	<i>CC</i>	80 (80,00)	105* (52,50)	25,38 p<0,001	0,28 (0,16-0,49)
	<i>CA</i>	20 (20,00)	68* (34,00)		2,06 (1,16-3,65)
	<i>AA</i>	0 (0,00)	27* (13,50)		31,86 (1,92-527,96)
	<i>A</i>	10 (10,00)	61 (30,50)	31,02 p<0,001	3,95 (2,37 – 6,57)
A-1188C гена <i>IL12B</i>	<i>AA</i>	76 (76,00)	152 (76,00)	0,072 p>0,05	не определяется
	<i>AC</i>	21 (21,00)	43 (21,50)		
	<i>CC</i>	3 (3,00)	5 (2,50)		
	<i>C</i>	13 (13,00)	27 (13,30)	0,01 p>0,05	не определяется
G-308A гена <i>TNFA</i>	<i>GG</i>	75 (75,00)	125* (62,50)	8,12 p<0,05	0,56 (0,33-0,95)
	<i>GA</i>	23 (23,00)	55 (27,50)		1,27 (0,73-2,22)
	<i>AA</i>	2 (2,00)	20* (10,00)		5,44 (1,25-23,78)
	<i>A</i>	13 (13,00)	48 (23,80)	8,65 p<0,05	2,00 (1,25 – 3,18)
C-509T гена <i>TGFB</i>	<i>CC</i>	62 (62,00)	100 (50,00)	5,55 p>0,05	не определяется
	<i>CT</i>	31 (31,00)	70 (35,00)		
	<i>TT</i>	7 (7,00)	30 (15,00)		
	<i>T</i>	23 (23,0)	65 (32,50)	6,45 p<0,05	1,66 (1,12 – 2,46)

Примечание: n – количество человек в группе. Анализ качественных независимых данных проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. p – уровень статистической значимости различий между группами. * - статистически значимые различия по данному генотипу между группами. Статистически значимые различия считали при p<0,05. OR –

критерий отношения шансов с 95% доверительным интервалом.

Среди больных ГЭ чаще встречался гомозиготный аллель *G* ($\chi^2=5,32$, $p<0,05$) и генотип *GG* полиморфизма *T-330G* гена *IL2* (15,50%). Была зарегистрирована также положительная ассоциация заболевания с аллелем *G* ($OR=1,56$) и генотипом *GG* ($OR=1,65$) полиморфизма *T-330G* гена *IL2*. Гомозиготный же генотип *TT* ($OR=0,59$) обладал протективным эффектом в отношении ГЭ (табл.1).

Неоспоримым является тот факт, что изменения в промоторной области часто влекут за собой изменение активности контролируемого гена [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005]. Следует отметить, что у больных ГЭ уровень исследуемого цитокина по всем генотипам локуса *T-330G* гена *IL2* оказался значимо ниже такового у женщин контрольной группы ($p<0,05$). Самая низкая концентрация *IL-2* была зарегистрирована у носителей редкого генотипа *GG* среди женщин больных эндометриозом (табл. 2).

Интересным является тот факт, что в группе женщин с ГЭ 3-4 степени распространения процесса уровень *IL-2* у носителей генотипа *TT* и *TG* (*T-330G*) гена *IL2* оказался значимо ниже, как по сравнению с группой контроля ($p_{1,3}<0,05$), так и по сравнению с женщинами с 1-2 степенью распространения заболевания ($p_{2,3}<0,05$).

IL-2 продуцируется *Th1* и является фактором роста и дифференцировки Т-лимфоцитов, НК-клеток, обеспечивает дифференцировку Т-киллеров и способствует проявлению функциональной активности Т-хелперов. Выявленное снижение уровня *IL-2* в сыворотке крови больных эндометриозом вероятно связано с уменьшением содержания активированных Т- лимфоцитов и НК-клеток в перитонеальной жидкости. Такая взаимосвязь представлена в работах М. Gogacz et al. [2007].

При сравнительной оценке генотипов и аллелей полиморфного участка *C-590T* гена *IL4* у женщин с эндометриозом наблюдалось снижение частоты генотипа *CC* ($\chi^2=10,90$, $p<0,05$) и преобладание редкого аллеля *T* ($\chi^2=11,65$, $p<0,05$). Была показана положительная ассоциация НГЭ с аллелем *T* ($OR=2,50$) и генотипом *TT* ($OR=22,83$) полиморфизма *C-590T* гена *IL4*. Генотип *CC* ($OR=0,52$) обладал протективным эффектом в отношении НГЭ (табл. 1).

При анализе иммуногенетических особенностей женщин с эндометриозом различной степени распространения процесса было выявлено, что среди пациенток, страдающих ГЭ 3-4 степени распространения процесса, имелись значимые различия в распределении аллелей ($\chi^2=20,67$, $p<0,001$) и генотипов ($\chi^2=21,61$, $p<0,05$) полиморфного сайта *C-590T* гена *IL4* (табл. 3).

Было отмечено значительное снижение частоты встречаемости генотипа *CC* и повышение генотипа *TT* полиморфного сайта *C-590T* гена *IL4* как по сравнению с женщинами без ГЭ, так и с женщинами с ГЭ 1-2 степени распространения ($p<0,05$) (табл. 3).

При этом выявлена также положительная ассоциация тяжёлого

течения эндометриоза с носительством аллеля *T* (OR=3,04) и генотипа *TT* (OR=39,69) полиморфизма *C-590T* гена *IL4*. Генотип *CC* имел протективное значение в отношении 3-4 степени распространения НГЭ (OR=0,37) (табл. 3).

Полиморфизм *C-590T* гена *IL4* находится в промоторном участке на пятой хромосоме (5q31.1) и контролирует уровень экспрессии соответствующего цитокина [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005].

Таблица 2

Концентрация IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 β , TNF- α и TGF- β в сыворотке крови (пг/мл) у женщин с эндометриозом в зависимости от генотипа локуса *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL4*, *C-592A* гена *IL10*, *A-1188C* гена *IL12B*, *C-509T* гена *TGFB* и *G-308A* гена *TNFA* Me (Q_{25%}:Q_{75%})

Полиморфизм	Аллели и генотипы	Женщины без ГЭ, % (абс)	Женщины с ГЭ, % (абс)	p
<i>T-330G</i> гена <i>IL2</i>	<i>TT</i>	35,04 (28,51 – 54,87) $p_{TT/GG}<0,05$	17,17 (14,49 – 23,00) $p_{TT/GG}<0,05$	$p<0,05$
	<i>TG</i>	38,54 (29,87 – 61,85) $p_{TG/TT}>0,05$	12,08 (11,00 – 15,00) $p_{TG/TT}<0,05$	$p<0,05$
	<i>GG</i>	18,65 (18,07 – 21,09) $p_{GG/TG}<0,05$	10,00 (8,51 – 11,40) $p_{GG/TG}<0,05$	$p<0,05$
<i>C-590T</i> гена <i>IL4</i>	<i>CC</i>	11,00 (8,00 – 16,00) $p_{CC/TT}<0,001$	50,75 (40,00 – 71,00) $p_{CC/TT}<0,001$	$p<0,001$
	<i>CT</i>	11,50 (9,00 – 15,76) $p_{CT/CC}>0,05$	66,94 (50,00 – 85,00) $p_{CT/CC}<0,05$	$p<0,001$
	<i>TT</i>	0 $p_{TT/CT}<0,001$	100,15 (89,06 – 103,73) $p_{TT/CT}<0,05$	$p<0,001$
<i>C-592A</i> гена <i>IL10</i>	<i>CC</i>	11,00 (8,17 – 14,58) $p_{CC/AA}<0,001$	32,15 (24,00 – 45,67) $p_{CC/AA}<0,001$	$p<0,001$
	<i>CA</i>	9,00 (6,00 – 12,00) $p_{CA/CC}>0,05$	30,5 (19,00 – 44,84) $p_{CA/CC}>0,05$	$p<0,001$
	<i>AA</i>	0 $p_{AA/CA}<0,001$	17,24 (15,00 – 19,50) $p_{AA/CA}<0,001$	$p<0,001$
<i>A-1188C</i> гена <i>IL12B</i>	<i>AA</i>	82,13 (72,00 – 88,80) $p_{AA/CC}<0,05$	58,79 (52,45 – 69,00) $p_{AA/CC}<0,05$	$p<0,05$
	<i>AC</i>	94,00 (89,37 – 98,64) $p_{AC/AA}<0,05$	78,00 (70,12 – 87,03) $p_{AC/AA}<0,05$	$p<0,05$
	<i>CC</i>	105,25 (104,93 – 114,65) $p_{CC/CA}<0,05$	97,05 (86,36 – 99,0) $p_{CC/CA}<0,05$	$p<0,05$
<i>G-308A</i> гена <i>TNFA</i>	<i>GG</i>	43,60 (36,94 – 52,04) $p_{GG/AA}<0,001$	59,25 (47,82 – 77,25) $p_{GG/AA}<0,001$	$p<0,001$
	<i>GA</i>	60,00 (57,06 – 64,52) $p_{GA/GG}<0,001$	92,65 (77,45 – 106,80) $p_{GA/GG}<0,001$	$p<0,001$
	<i>AA</i>	72,5 (70,50 – 74,50) $p_{AA/GA}<0,001$	121,72 (90,82 – 157,91) $p_{AA/GA}<0,001$	$p<0,001$
<i>C-509T</i> гена <i>TGFB</i>	<i>CC</i>	575,45 (520,00 – 686,57) $p_{CC/TT}>0,05$	875,55 (751,25 – 998,25) $p_{CC/TT}<0,001$	$p<0,05$
	<i>CT</i>	820,00 (660,00 – 936,52) $p_{CT/CC}<0,001$	908,55 (777,00 – 1088,30) $p_{CT/CC}>0,05$	$p<0,05$

	TT	605,89 (481,79 – 680,37) p _{TT/CT} <0,001	1113,45 (860,00 – 1365,42) p _{TT/CT} <0,001	p<0,05
--	-----------	---	---	--------

Примечание: Анализ количественных данных, не имеющих нормальное распределение, проводили с помощью критерия Краскула-Уолиса. p – уровень статистической значимости различий между группами. Статистически значимые различия считали при p<0,05.

Среди женщин основной группы был зарегистрирован значимо высокий уровень исследуемого цитокина у носителей всех генотипов (C-590T) гена *IL4* (<0,001) по сравнению с аналогичными показателями группы контроля (табл. 2). У женщин с эндометриозом зафиксировано статистически значимое увеличение концентрации IL-4 у пациентов с генотипом *TT* по сравнению с носителями генотипа *CT* (p_{TT/CT}<0,05) и *CC* (p_{CC/TT}<0,05) полиморфного сайта C-590T гена *IL4* (табл. 3).

Таблица 3

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма C-590T гена *IL4* (абс., %) у женщин с эндометриозом различной степени распространения (R-AFS, 1985г.)

Генотипы и аллели полиморфизма C-590T гена <i>IL4</i>	Женщины без эндометриоза n=100	Женщины с эндометриозом 1-2 ст. n=107	Женщины с эндометриозом 3-4 ст. n=93
CC	70(70,00)	67 (62,60)	43*† (46,20)
OR (95% CI)		не определяется	0,37 (0,20 – 0,67)
CT	30 (30,00)	35 (32,7)	35 (37,60)
OR (95% CI)		не определяется	1,41 (0,77 – 2,56)
TT	0(0,00)	5 (4,70)	15*† (16,10)
OR (95% CI)		не определяется	39,69 (2,34-673,64)
χ^2 , p		5,22 p> 0,05	21,61 p< 0,05
T	15 (15,00)	22 (21,00)	32 (34,90)
χ^2 , p		2,53 p> 0,05	20,67 p< 0,001
OR (95% CI)		не определяется	3,04 (1,86 – 4,98)

Примечание: n – количество человек в группе. Анализ качественных независимых данных проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона, или точного критерия Фишера. p – уровень статистической значимости различий между группой женщин с эндометриозом и без эндометриоза. * - статистически значимые различия относительно здоровых женщин по данному генотипу, † - статистически значимые различия между группами больных эндометриозом. Статистически значимые различия считали при p<0,05. OR – критерий отношения шансов.

Самые высокие показатели уровня данного интерлейкина обнаружены нами у женщин с 3-4 степенью распространения эндометриоза (101 пг/мл) по сравнению с аналогичными показателями у женщин группы контроля (p<0,001). В литературе встречается двойственная информация о положительной ассоциации полиморфизма гена *IL4* с развитием ГЭ. По данным М.И. Ярмолинской [2009], при наличии аллеля *C* гена *IL4* риск развития эндометриоза возрастает в 3 раза, причем частота носительства аллеля *C* по гену *IL4* (-590C/T) достоверно выше у больных ГЭ тяжелой

степени. В свою очередь Y.Y. Hsieh et al. [2002] не выявили положительной ассоциации с ГЭ среди китайских женщин.

Проведенный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *C-592A* промоторного участка гена *IL10* позволил установить, что у женщин с эндометриозом значительно чаще встречались носители гетерозиготного генотипа *CA* (34%) и были обнаружены носители редкого гомозиготного генотипа *AA* (13,50%) промоторного участка *C-592A* гена *IL10*. Редкий аллель *A* так же статистически значимо был выше, чем аналогичный показатель у женщин без ГЭ. Кроме того, была показана положительная ассоциация генотипа *AA* (OR=31,86) и аллеля *A* (OR=3,95) с заболеванием и защитная роль генотипа *CC* (OR=0,28) в отношении НГЭ (табл. 1).

Для гена *IL10*, который находится в промоторном участке первой хромосомы человека (1q31-q32), также существует функциональный полиморфизм *C-592A* [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005]. Определение концентрации IL-10 в сыворотке крови в зависимости от аллельного полиморфизма *C-592A* гена *IL10* показало, что у женщин, больных эндометриозом, по всем генотипам уровень данного цитокина значительно превышал его содержание у женщин без эндометриоза ($p < 0,001$) (табл. 2). По данным литературы, так же отмечается положительная ассоциация полиморфизма *C-592A* гена *IL10* с НГЭ. В своём исследовании X. Zhang et al. [2007] показали, что среди женщин с эндометриозом достоверно чаще встречаются носители гетерозиготного генотипа *CA* и гомозиготного *AA* *C-592A* гена *IL10* по сравнению с группой контроля и установил, что концентрация IL-10 у женщин с эндометриозом значительно выше.

Проведенный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *A-1188C* промоторного участка гена *IL12B* не позволил установить статистически значимых различий между группами (табл. 1). Генотип локуса *A-1188C* гена *IL12B* находится в промоторном участке пятой хромосомы человека 5q31-33, и теоретически замена аденина на цитозин, относительно стартовой точки транскрипции, должна быть связана с уровнем экспрессии гена, а соответственно и с уровнем синтеза кодируемого продукта [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005].

В ходе исследования нами было обнаружено: концентрация IL-12 β у женщин, больных эндометриозом, носителей генотипа *AA*, *AC* и *CC* полиморфного сайта *A-1188C* гена *IL12B* была статистически значимо ниже таковой у женщин без эндометриоза. Обращал на себя внимание и тот факт, что уровень исследуемого цитокина был статистически значимо выше у носителей гомозиготного генотипа *CC* относительно носителей гомозиготного генотипа *AA* и гетерозиготного *AC* в обеих группах ($p_{AA/CC} < 0,05$; $p_{AC/AA} < 0,05$ и $p_{CC/CA} < 0,05$) (табл. 2).

При сравнительной оценке генотипов и аллелей полиморфного участка *G-308A* гена *TNFA* у женщин с НГЭ снижалась частота гомозиготного по аллелю *G* генотипа (62,5%), и повышалась частота гомозиготного генотипа *AA* (10%). Были выявлены положительная ассоциация аллеля *A* (OR=2,0) и

генотипа *AA* (OR=5,44) (*G-308A*) гена *TNFA* с риском развития НГЭ и протективный эффект генотипа *GG* (OR=0,56) в отношении подверженности эндометриозу (табл. 1).

Ген фактора некроза опухолей альфа (*TNFA*) находится в шестой хромосоме (6p21.3) и имеет функциональный полиморфизм *G-308A* [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005]. У женщин, страдающих эндометриозом, минимальная концентрация TNF- α регистрировалась у лиц, имеющих гомозиготный генотип *GG* (*G-308A*) гена *TNFA*, по сравнению с таковой у женщин, несущих *GA* и *AA* генотипы ($p_{GA/GG}<0,05$ и $p_{GG/AA}<0,05$) (табл. 2).

При сравнительной оценке концентрации данного цитокина в зависимости от степени распространения эндометриоза (R-AFS,1985г.) и от генотипа локуса *G-308A* гена *TNFA* уровень TNF- α в сыворотке крови был значимо выше у женщин с 3-4 степенью распространения процесса, носителей генотипа *AA* (157,91 пг/мл) как по сравнению с показателями женщин с 1-2 степенью распространения (90,82 пг/мл), так и здоровых (72,5 пг/мл).

Проведённое австрийскими учёными исследование не показало связи распределения генотипов и аллелей полиморфизма *G-308A* гена *TNFA* с эндометриозом у европеоидного населения [Wieser F. et al., 2002]. В нашей стране изучением связи полиморфизма *G-308A* гена *TNFA* с НГЭ занималась О.А. Конева [2011], которая установила ассоциацию данного полиморфизма с формированием заболевания, возрастом манифестации и особенностями его клинического проявления и сообщила, что формирование бесплодия у женщин, больных ГЭ, ассоциировано с *-308 A TNFA* (OR=1,6).

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного сайта *C-509T* гена *TGFB* было выявлено, что у женщин с ГЭ существуют значимые различия в распределении аллеля *T* относительно аналогичного параметра у женщин контрольной группы и отсутствуют по распределению генотипов (табл. 1). Выявлена положительная ассоциация аллеля *T* (OR=1,66) полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* с НГЭ (табл. 1).

Аллельные варианты полиморфизма *C-509T* гена *TGFB*, находящегося в девятнадцатой хромосоме (19q31.1), могут вызывать разные фенотипические эффекты [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005]. В группе женщин с НГЭ у гомозигот по аллелю *T* отмечалась максимальная, а у гомозигот по аллелю *C* – минимальная концентрация TGF- β ($p_{CC/TT}<0,001$; $p_{TT/CT}<0,05$ и $p_{CT/CC}<0,05$) (табл. 2). Самая высокая концентрация TGF- β отмечалась у женщин с 3-4 степенью распространения заболевания вне зависимости от генотипа (*CC* - 998,75; *CT* - 1089,3; *TT* - 1365,42 пг/мл) - как по отношению к соответствующим показателям здоровых женщин, так и по отношению к показателям женщин с 1-2 степенью распространения ГЭ ($p<0,001$).

В литературе также накоплены весьма противоречивые сведения о роли полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* в развитии НГЭ. Проводя исследование связи полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* с ГЭ, H.J. Lee et al.

[2011] выявили, что гетерозиготный генотип СТ встречается в 4,5 раза чаще у женщин с ранней стадией заболевания в корейской популяции. А так же исследование уровня TGF- β в сыворотке крови этих женщин показало значимо высокий уровень данного цитокина по сравнению с его концентрацией у женщин контрольной группы. В более ранних работах Y.Y. Hsieh et al. [2005] показана положительная ассоциация с генитальным эндометриозом среди женщин, проживающих на территории Китая, носителей генотипа *TT* и редкого аллеля *T-509C/T* гена *TGFB*.

Для комплексной оценки влияния полиморфных вариантов *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL-4*, *C-592A* гена *IL10*, *G-308A* гена *TNFA* на развитие ГЭ мы провели анализ распространенности их комбинаций. В связи с тем, что статистически значимых различий в распределении генотипов полиморфных вариантов *A-1188C* и *C-509T* генов *IL12B* и *TGFB* у обследованных нами женщин получено не было, мы не включили в анализ сочетаний полиморфных маркеров данные показатели.

Комбинации, обладающие предрасполагающими свойствами, представлены в таблице 4.

Таблица 4

Рисковые комбинации полиморфных вариантов генов *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL-4*, *C-592A* гена *IL10*, *G-308A* гена *TNFA* у женщин с эндометриозом

Комбинации генотипов	OR (CI95%)
<i>IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGG</i>	1,09 (1,05-1,14)
<i>IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGA</i>	1,04 (1,01-1,07)
<i>IL2TT/IL4TT/IL10CA/TNFAGG</i>	1,07 (1,03-1,12)
<i>IL2TG/IL4TT/IL10CC/TNFAGG</i>	1,04 (1,01-1,07)
<i>IL2TG/IL4TT/IL10AC/TNFAGG</i>	1,05 (1,02-1,08)

Обращало на себя внимание то, что характерной особенностью предрасполагающих к ГЭ комбинаций полиморфных генов цитокинов оказалось наличие в них генотипа *TT* промоторного региона *C-590T* гена *IL4*, отсутствовавшего в протективных комбинациях вариантных генотипов.

Было установлено протективное влияние следующих сочетаний полиморфных вариантов, представленных в таблице 5. Все остальные комбинации генов оказались интактными к развитию ГЭ.

Таблица 5

Протективные комбинации полиморфных вариантов генов *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL-4*, *C-592A* гена *IL10*, *G-308A* гена *TNFA* у женщин с эндометриозом

Комбинации генотипов	OR (CI95%)
<i>IL2TT/IL4CC/IL10CC/TNFAGG</i>	0,03 (0,01-0,16)
<i>IL2TT/IL4CC/IL10AC/TNFAGG</i>	0,06 (0,01-0,47)
<i>IL2TT/IL4CC/IL10CC/TNFAGA</i>	0,04 (0,01-0,32)
<i>IL2TG/IL4CC/IL10CC/TNFAGG</i>	0,12 (0,03-0,35)
<i>IL2TG/IL4CC/IL10AC/TNFAGG</i>	0,97 (0,93-1,01)

Был проведён анализ комбинаций генотипов у женщин с рецидивирующим течением генитального эндометриоза. 12,5% женщин, больных эндометриозом, были повторно прооперированы по поводу рецидива. У 20% этих женщин достоверно чаще встречалась комбинация *IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGG* ($p < 0,05$). Риск развития рецидивирующего течения ГЭ у носителей данного генотипа составил 1,25. У 16% женщин была отмечена тенденция к носительству комбинации полиморфных маркеров – *IL2TT/IL4TT/IL10CA/TNFAGA*, которая встречалась среди пациенток с 3-4 степенью распространения заболевания.

Таким образом, наличие в генотипе женщины данных сочетаний полиморфных генов иммунорегуляторных цитокинов следует расценивать как предрасполагающий фактор возникновения и рецидивирующего течения ГЭ. В настоящее время в литературе нет данных о роли комбинаций генов цитокинов в развитии и тяжести течения эндометриоза. Имеются данные о связи генов детоксикации и их комбинации с развитием НГЭ [Ярмолинская М.И., 2009]. Так, сочетание GSTM1 0/0 + GSTT1 0/0 увеличивает риск развития НГЭ почти в 5, а генотип GSTM1 0/0+GSTT1 0/0+NAT2 S/S - в 10 раз. Носительство сочетанного генотипа GSTM1 0/0 + GSTT1 0/0 и GSTT1 0/0 + NAT2 S/S увеличивает риск развития более тяжелых степеней заболевания.

Ключевым фактором в формировании эндометриозной болезни является ретроградная менструация. Отторгнутые фрагменты функционального слоя эндометрия попадают через маточные трубы в перитонеальную полость. Далее происходит адгезия фрагментов эндометрия к поверхности брюшины. Завершающим этапом является васкуляризация очага эндометриоза [Wu M.H. et al., 2004; Barcz E. et al., 2012].

Повышенная способность к адгезии фрагментов эндометрия может быть связана с гиперэкспрессией молекулы ICAM-1, присутствующей на мембранах лейкоцитов и эндометриальных клетках [Viganò P. et al., 2003].

Одновременно ускоряется миграция макрофагов в перитонеальную жидкость и снижается активность натуральных киллеров. При активации макрофаги секретируют цитокины – IL-10, IL-12 β , TNF- α , TGF- β , регулирующие события в перитонеальной полости.

Очевидно, эндометриоз может развиваться тогда, когда система моноцит-макрофаг не справляется с высоким уровнем ретроградной менструации или когда её повреждение даёт возможность имплантации и росту эндометриальных клеток или фрагментам ткани [Цвелёв Ю.В. и др., 2007; Guo S. et al., 2012; Veillat V. et al., 2012].

Схема иммунопатогенеза эндометриоза представлена на рисунке 3.

Таким образом, проведенное исследование распределения аллелей и генотипов полиморфных генов цитокинов у больных генитальным эндометриозом с разной степенью распространения патологического процесса выявило значимость вариантных генотипов в формировании предрасположенности к развитию данного заболевания. Позволило оценить также вклад, как отдельных генных полиморфизмов, так и их

сочетаний в увеличение рисков возникновения и характера течения генитального эндометриоза.

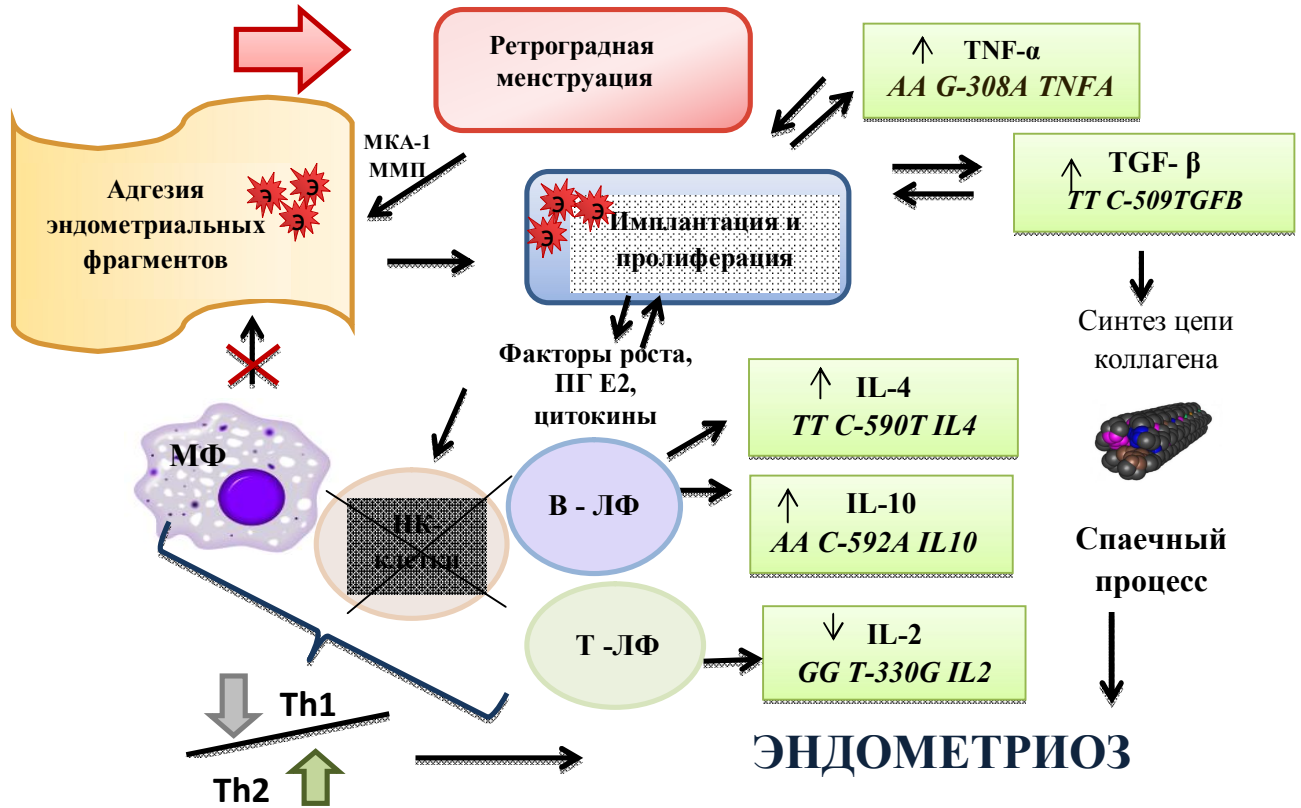


Рисунок 3. Иммунопатогенез эндометриоза (по данным литературы и результатам собственных исследований). В зелёных рамках приведены результаты собственных исследований.

Выводы:

1. Течение генитального эндометриоза сопровождается повышением концентрации IL-4, IL-10, TNF- α и TGF- β при снижении содержания IL-2 и IL-12 β в сыворотке крови. При этом у пациенток с тяжелым течением генитального эндометриоза (3-4 степень распространения) содержание IL-4, IL-10, TNF- α и TGF- β в крови выше, чем у женщин с легким течением заболевания (1-2 степень распространения).
2. Частота встречаемости генотипов GG полиморфизма T-330G гена IL2, TT полиморфного региона C-590T гена IL4, AA промоторного региона C-592A гена IL10 и AA G-308A гена TNFA у больных генитальным эндометриозом выше, чем у женщин без эндометриоза.
3. У женщин с генитальным эндометриозом повышенное содержание IL-4 в сыворотке крови ассоциировано с генотипом TT (C-590T) гена IL4; IL-10 – с CC (C-592A) гена IL10; TNF- α – с AA (G-308A) гена TNFA; TGF- β – с TT

(*C-509T*) гена *TGFB*; при этом низкая концентрация *IL-2* – *GG (T-330G)* гена *IL2*; *IL-12 β* – *AA (A-1188C)* гена *IL12B*.

4. Подверженность тяжелому течению генитального эндометриоза (3-4 степень распространения) ассоциировано с носительством аллеля *T* ($OR=3,04$) и генотипа *TT* ($OR=39,69$) полиморфизма *C-590T* гена *IL4*.
5. Развитие генитального эндометриоза обусловлено пятью комбинациями полиморфных вариантов генов *IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGG*, *IL2TT/IL4TT/IL10CC/TNFAGA*, *IL2TT/IL4TT/IL10CA/TNFAGG*, *IL2TG/IL4TT/IL10CC/TNFAGG*, *IL2TG/IL4TT/IL10AC/TNFAGG*, оказывающих более выраженный предрасполагающий эффект. Характерной особенностью «рисковых» сочетаний является наличие генотипа *TT* промоторного региона *C-590T* гена *IL4*.
6. Рисковую значимость для рецидивирующего течения генитального эндометриоза имеет носительство комбинации генотипов *TT(T-330G)IL2/TT(C-590T)IL4/CC(C-592A)IL10/GG(G-308A)TNFA*.

Практические рекомендации

1. На основании комплексного иммуногенетического исследования можно диагностировать, прогнозировать развитие и течение наружного генитального эндометриоза.
2. Женщинам с отягощенным семейным анамнезом по генитальному эндометриозу и хроническими тазовыми болями целесообразно рекомендовать определять рискованные комбинации полиморфных вариантов генов цитокинов для прогнозирования развития наружного генитального эндометриоза.
3. Наличие в генотипе женщины, страдающей генитальным эндометриозом, сочетания генотипов *TT(T-330G)* гена *IL2* / *CC(C-590T)* гена *IL4* / *CC(C-592A)* гена *IL10* / *GG(G-308A)* гена *TNFA* может служить основанием для назначения противорецидивного лечения.

Список работ опубликованных по теме диссертации:

1. Аллельный полиморфизм гена *IL10* при эндометриозе / *Меньшикова Н.С.*, Юрченко А.С., Ильяди Е.Б., Прокопьева Е.В., Миненко Т.В. // Сб. «Науки о человеке»: сборник статей по материалам XII конгресса молодых учёных и специалистов, Томск – 2011. – С. 48-49.
2. Аллельный полиморфизм генов *TNFA* и *TGFA* при генитальном эндометриозе / Евтушенко И.Д., Наследникова И.О., Ткачев В.Н., Кублинский К.С., *Меньшикова Н.С.*, Ильяди Е.Б., Юрченко А.С. // *Мать и дитя в Кузбассе* (спецвыпуск). Клинические и фундаментальные аспекты репродуктивных проблем и здоровья женщины. – 2011. – Том 44. – № 1. – С. 219-222.
3. Полиморфизм гена интерферона гамма при генитальном эндометриозе / Новицкий В.В, Наследникова И.О., Евтушенко И.Д., Кублинский К.С., Ткачев В.Н., *Меньшикова Н.С.*, Ильяди Е.Б., Юрченко А.С. // *Материали*

- за VII международна научна практична конференция «Образованието и науката на XXI век-2011», г.София. – 17-25 октябрия. – С. 3-6.
4. **Генитальный эндометриоз и спаечный процесс: возможная роль трансформирующего фактора роста-бетта / Евтушенко И.Д., Кублинский К.С., Наследникова И.О., Новицкий В.В., Ткачѐв В.Н., Меньшикова Н.С., Ильяди Е.Б., Юрченко А.С. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2011. – № 6 (129). – С. 44-47.**
 5. Полиморфный вариант гена IL 12 β , как иммуногенетический маркер генитального эндометриоза / Меньшикова Н.С., Агаркова Т.А., Евтушенко И.Д., Наследникова И.О., Ткачѐв В.Н., Кублинский К.С. // Материали за 8-а международна научна практична конференция, «Динамиката на съвременната наука», г. София. – 2012. – Том 10.– С. 3-6.
 6. Полиморфизм гена IL 4 как маркер эндометриоз-ассоциированного бесплодия / Агаркова Т.А., Меньшикова Н.С., Кублинский К.С., Наследникова И.О., Евтушенко И.Д. // Материали за 8-а международна научна практична конференция «Динамиката на съвременната наука», г. София. – 2012. – Том 10.– С. 7-10.
 7. Полиморфные варианты генов IL12, IL4 при эндометриоз-ассоциированном бесплодии / Агаркова Т.А., Меньшикова Н.С.// Материали III ежегодной конференции молодых учёных и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых учёных и специалистов», Санкт-Петербург. – 2012. – С. 3.
 8. Immune-genetics markers of genital endometriosis / *Menshikova N.S., Kublinskiy K.S., Agarkova T.A., Evtushenko I.D., Novitskiy V.V., Tkachev V.N., Naslednikova I.O.*// International Journal of Advanced Studies (ISSN 2227-930X Online). – 2012. – Vol. 2. – NO. 1. www.ijournal-as.com
 9. Иммуногенетические аспекты генитального эндометриоза: роль аллельного полиморфизма гена IL10 / Меньшикова Н.С., Кублинский К.С., Ткачѐв В.Н., Агаркова Т.А., Евтушенко И.Д., Новицкий В.В., Наследникова И.О. // *Materialy VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Dynamika naukowych badań - 2012».* Medycyna.: Przemśl. Nauka i studia – 2012. – Vol. 17. – P. 3-6.
 10. **Полиморфизм генов цитокинов при бесплодии, ассоциированном с эндометриозом / Агаркова Т.А., Кублинский К.С., Меньшикова Н.С., Наследникова И.О., Евтушенко И.Д., Агаркова Л.А., Новицкий В.В. // **Фундаментальные исследования.** – 2012. – Ч. 2. – № 8. – С. 265-270.**
 11. Иммуногенетические маркеры генитального эндометриоза / Кублинский К.С., Меньшикова Н.С., Агаркова Т.А., Евтушенко И.Д., Новицкий В.В., Наследникова И.О., Шперлинг Н.В., Шперлинг И.А. // Клиническая патофизиология. – 2012. – 1-3. – С. 91-94.
 12. **Функциональный полиморфизм генов иммуносупрессорных цитокинов при наружном генитальном эндометриозе / Меньшикова Н.С. // **Мать и дитя в Кузбасе.** – 2013. – № 1. – С. 24-26.**

Список сокращений:

ГЭ – генитальный эндометриоз

ЛФ – лимфоцит

МКА-1 – молекула клеточной адезии-1

ММП – матриксные металлопротеиназы

МФ – макрофаг

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) - молекула клеточной адезии-1

IL (interleukin) – интерлейкин

НК (natural killer) – натуральные киллеры

SNP (single nucleotide polymorphisms) – единичный полиморфизм нуклеотидов

Th (T-helper) – Т-хелпер

TNF (tumor necrosis factors) – фактор некроза опухоли

TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста