

ОСОБЕННОСТИ МЕСТНОГО СИНТЕЗА мРНК НЕКОТОРЫХ СС- И СХС-ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ

Кипич Н.В.¹, Кулагина Н.В.¹, Чухловин А.Б.²,
Сысоев К.А.², Тотолян Арег А.³

¹ Медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург

² Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

³ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Резюме. Гиперплазия эндометрия (ГПЭ) представляет собой избыточное увеличение толщины и объема пролиферирующего эндометрия с нарушением архитектоники желез. Заболевание широко распространено среди женщин пременопаузального возраста. В литературе имеются немногочисленные данные о роли хемокинов и их рецепторов в патогенезе и клиническом течении ГПЭ. В связи с этим, целью нашего исследования был анализ экспрессии мРНК ряда ключевых хемокинов и их рецепторов в тканях эндометрия у больных ГПЭ. В настоящей работе были обследованы 63 женщины с нарушениями менструального цикла или патологией эндометрия по данным УЗИ (возраст от 32 до 61 года, в среднем $48,4 \pm 0,6$ года). Уровни экспрессии генов оценивали с помощью полуквантитативной геноспецифической ПЦР, а промоторные генотипы матриксных металлопротеиназ (MMP1⁻¹⁶⁰⁷1G/2G и MMP3⁻¹¹⁷¹5A/6A) определяли посредством аллель-специфической ПЦР. В результате исследования выявлено достоверное повышение уровней мРНК MIP-1 α , эотаксина-2 и снижение уровня экспрессии мРНК CCR-3 (специфического рецептора для семейства эотаксинов) в полипах, развивающихся на фоне гиперплазии эндометрия без атипии. Об этом свидетельствует снижение с возрастом уровня MIP-1 α . Если уровень синтеза MIP-1 β был повышен при более длительных, часто рецидивирующих нарушениях менструального цикла, то уровень синтеза мРНК MIP-1 α и CXCR-1 был выше у женщин с большим количеством беременностей. При наличии угрозы невынашивания отмечена повышенная экспрессия MIP-1 β . Таким образом, локальная система хемокинов реагирует повышением уровня отдельных факторов на наличие воспалительных и геморрагических осложнений. Определение уровня мРНК данных хемокинов и их рецепторов у больных с гиперпластическими процессами эндометрия может отражать общий патологический фон заболевания.

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия, хемокины, рецепторы хемокинов, синтез мРНК.

Kipich N.V., Kulagina N.V., Chukhlovin A.B., Syssoev K.A., Totolian Areg A.

FEATURES OF LOCAL mRNA SYNTHESIS FOR SOME CC- AND CXC-CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS IN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

Abstract. Endometrial hyperplasia (EH) represents an excessive increase in thickness and volume of proliferating endometrium accompanied by altered glandular structure. This disorder is highly prevalent among women in their premenopausal period. There exist only scarce data concerning possible role of chemokines and their receptors in EH pathogenesis and clinical course. Hence, the aim of our study was to analyze mRNA expression of several key chemokines and their receptors in endometrial tissue samples from EH patients.

Адрес для переписки:

Кипич Наталья Владимировна
195257, Санкт-Петербург, Гражданский пр., 92,
корп. 1, кв. 202.
Тел.: (812) 651-56-26.
E-mail: nvkipich@mail.ru

This work included sixty-three women with disturbed menstrual cycle and/or pathological changes of endometrium, as assessed by sonographic studies. The patients were 32 to 61 years old (a mean of 48.4 ± 0.6 years). The levels of mRNA expression were determined by gene-specific PCR in a semiquantitative manner,

whereas promoter genotypes of matrix metalloproteinases (MMP1⁻¹⁶⁰⁷1G/2G and MMP3⁻¹¹⁷¹5A/6A) were identified by means of allele-specific PCR. Results of the study included a significant increase of mRNA for MIP-1 α , eotaxin 2, along with decreased amounts of mRNA for CCR-3 (a specific receptor for eotaxins), in polyps developing from hyperplastic endometrium. MIP-1 α synthesis fades away with increasing age. An increased level of MIP-1 β was shown in prolonged and recurrent disturbances of menstrual cycle, whereas elevation of MIP-1 α and CXCR-1 was registered in cases of multiple pregnancies. In threatening abortions, an increase of MIP-1 β gene expression was revealed. Hence, the local chemokine system reacts to inflammatory and hemorrhagic complications with increased mRNA expression of certain chemokine genes. Determination of the chemokine mRNA levels, as well as their receptors in patients with endometrial hyperplasia may reflect a general background of this disorder. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 189-196)

Keywords: endometrial hyperplasia, chemokines, chemokine receptors, mRNA synthesis.

Введение

Доброкачественные гиперпластические процессы в женской репродуктивной системе являются эстрогензависимыми состояниями, в патогенезе которых участвуют клеточные и гуморальные факторы иммунного ответа. В частности, это наблюдается на примере такого частого доброкачественного гиперпластического процесса, как лейомиома матки [7, 9].

Гиперплазия эндометрия — это избыточное увеличение толщины и объема пролиферирующего эндометрия с нарушением архитектоники желез. Гиперпластические процессы эндометрия (ГПЭ) являются распространенной гинекологической патологией, составляющей от 10 до 18% среди гинекологических заболеваний. Сложность этой проблемы обусловлена тем, что гиперплазия слизистой оболочки матки проявляется при многих патологических состояниях женского организма и в 80% случаев является причиной дисфункциональных маточных кровотечений [6].

Сегодня известно, что ГЭ — это не единая совокупность, а состоящая из двух функциональных категорий: нормального поликлонального эндометрия, отвечающего на аномальные гормональные воздействия, и пролиферативных моноклональных повреждений, возникающих фокусно, сопровождающихся высоким риском развития карциномы. Эти наблюдения подтверждаются многими исследованиями [10].

Эндометрий — гормоночувствительная ткань мезенхимального происхождения, обладающая способностью к внутренней регуляции, благодаря местным факторам [11]. Гормоны яичников участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток эндометрия, влияя на экспрессию рецепторов, локальных факторов роста, процессы апоптоза, внеклеточный матрикс и межклеточное взаимодействие. Большая роль в возникновении ГПЭ принадлежит также гипоталамо-гипофизарным нарушениям [5].

Показано, что развитие ГПЭ на клеточном уровне может быть связано с изменением интенсивности пролиферации и апоптоза клеток, уве-

личением в очаге воспаления уровня цитокинов, факторов роста, активацией матриксных металлопротеиназ и других протеолитических ферментов [1, 2]. Воспалительные изменения в слизистой оболочке матки также могут способствовать возникновению и рецидивированию гиперплазии эндометрия [4].

В связи с этим, гиперпластические процессы в эндометрии непосредственно связывают с нарушениями иммунитета, в частности — со снижением индекса CD4⁺/CD8⁺, а также функциональной активности нейтрофилов [8]. Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что у пациенток с патологией эндометрия отмечаются значительные нарушения системного и локального иммунного ответа сходной направленности, более выраженные на локальном уровне [14]. В целом, однако, данные об изменениях иммунной системы у больных с гиперпластическими процессами в эндометрии немногочисленны и противоречивы [4, 8].

Важная роль в развитии опухолевого роста в эндометрии отводится цитокиновому статусу. Действие цитокинов на клетки-мишени осуществляется аутокринно, паракринно или эндокринно (дистанционно). Специальной разновидностью факторов, контролирующих процессы миграции и активации клеток иммунной системы, являются хемокины. Показана важная роль хемокинов в хроническом и остром воспалении, инфекционных заболеваниях, процессах ангиогенеза [2, 7], росте опухолей, пролиферации стволовых клеток и др. Дисбаланс системы хемокинов можно предположить также и в развитии патологии эндометрия. Биологическая активность хемокинов опосредована взаимодействием со специфическими рецепторами, относящимися к семейству GPCR (рецепторы, связанные с G-белками). GPCR-рецепторы широко представлены в эндокринной и нервной системах человека и служат элементами поддержания гомеостаза. В ряде работ было исследовано влияние концентрации половых стероидов на активность хемокинов и их рецепторов [12, 13].

В ряде опубликованных исследований показаны изменения экспрессии мРНК хемокинов, в частности MIP-1 β , в нормальной эндометрии в различные фазы менструального цикла, а также их индукция в культивируемых клетках стромы эндометрия [13]. В экспериментах на мышах показано стимулирующее влияние эстрогена на экспрессию рецепторов CCR-1 и CCR-3 [12]. Известно, что повышенный уровень эстрогенов или сниженный уровень прогестерона способны усиливать гиперпластических процессов в эндометрии, активируя ростовые факторы и замедляя апоптоз [15]. Таким образом, уровень экспрессии хемокинов и их рецепторов при гиперпластических процессах эндометрия может быть существенно изменен, что на фоне циклических гормональных сдвигов может стать фактором неконтролируемой пролиферации эпителия.

В связи с этим, целью нашего исследования была оценка особенностей местного синтеза ряда СС-и СХС-хемокинов и их специфических рецепторов при гиперплазии эндометрия. Выявленные изменения данных иммунологических показателей позволяют установить связи с конкретными нарушениями репродуктивной функции и, возможно, обосновывают новые подходы к лечению ГПЭ.

Материалы и методы

Группу обследованных больных составили 63 женщины с нарушениями менструального цикла или патологией эндометрия по данным УЗИ (возраст от 32 до 61 года, в среднем 48,4 \pm 0,6 года). В репродуктивном возрасте (до 40 лет) находились 2 (3,2%) пациентки, в позднем репродуктивном возрасте — 10 (15,9%), в пременопаузальном — 48 (76,2%), в менопаузе — 3 (4,7%) женщины. Нарушения менструального цикла по типу меноррагии выявлены у 25 (39,6%), метроррагии — у 30 (47,6%), а менометроррагии — у 3 (4,8%) пациенток. У 34 пациенток ранее были отмечены нарушения менструального цикла, требующие проведения раздельного диагностического выскабливания полости матки и цервикального канала (однократно — у 20 (31,7%), 2 раза и более — у 14 (22,2%)).

После гистероскопии и раздельного выскабливания полости матки и цервикального канала, произведенных в момент нашего наблюдения по данным гистологии секреторный эндометрий был выявлен у 22 (34,9%), гиперплазия эндометрия без атипии — у 24 (38,1%), полипы эндометрия — у 6 (9,5%), атрофия эндометрия — у 7 (11,1%), атипичная гиперплазия эндометрия — у 4 (6,3%) женщин.

Бесплодием страдали 3 (4,8%) пациентки, 1-2 беременности наблюдались у 20 (31,7%), 3 бере-

менности и более — у 40 (63,5%) обследованных. Не было родов у 6 (9,5%) женщин, 1-2 родов отмечены у 56 (88,9%), более 2 родов — у 1 (1,6%) пациентки. У 14 (22,2%) пациенток наблюдались выкидыши до 12 недель беременности с выскабливанием полости матки.

Молекулярно-генетическое определение экспрессии генов хемокинов (эотаксин-1, эотаксин-2, CXCL8/IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) и хемокиновых рецепторов (CCR-1, CCR-3, CCR-5, CXCR-1, CXCR-2) проведено в биоптатах ткани эндометрия. Образцы тканей подвергались обработке в ультразвуковой мойке “FinnSonic m03” (“FinnSonic Oy”, Финляндия) с последующим выделением РНК. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора «Реверта» («Амплисенс», Москва, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Следующим этапом являлась постановка ПЦР ДНК со специфическими праймерами (табл. 1). Реакционная смесь для ПЦР содержала следующие компоненты: 5х ПЦР-буфер (Амплисенс, Москва); смесь дезоксинуклеотидов (MBI Fermentas, Каунас, Литва), праймеры (от 0,05 до 0,3 μ М) производства «Синтол» (Москва), ДНК-Тақ полимеразу («ДНК-Технология, Москва», 1,0 МЕ в пробе) и геномную ДНК (2,5 мкл на реакцию), в общем объеме 20 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе ICycler (Bio-Rad, США). Режимы ПЦР были следующими: 94 °С, 5 мин; 40 циклов ПЦР: денатурация: 94 °С, 30 с; отжиг в течение 30 с: 60 °С (для кДНК хемокинов и их рецепторов), 55 °С (ММР-1), 54 °С (ММР-3/5А), 49 °С, (ММР-3/6А); элонгация: 72 °С, 30 с (40 циклов); 72 °С, 7 мин. Визуализацию полученных ПЦР-продуктов осуществляли по их флуоресценции после электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при УФ-освещении на трансиллюминаторе “Vilber Lourmat” (Франция). Полуколичественную оценку синтеза мРНК хемокинов проводили с помощью программы Gel-Pro, принимая за 100% интенсивность флуоресцентного сигнала бета-актина.

С целью определения взаимосвязей уровня мРНК хемокинов и соответствующих рецепторов в ткани эндометрия с различными клиническими и лабораторными показателями был проведен статистический анализ, в результате которого обнаружены некоторые значимые закономерности. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли t-критерий Стьюдента, а при сравнении частотных величин — χ^2 -критерий

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ ПЦР, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ, И ДЛИНА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Название хемокина/рецептора	Смысловой праймер	Антисмысловой праймер	Длина ампликона, п.н.	T _m °C
эотаксин/CCL11	ACCACCTCTCACGCCAAAGCTCACAC	CGGCACAGATATCCTTGCCAGTTTG	263	60
эотаксин-2/CCL24	CACATCATCCCTACGGGCTCT	GGTTGCCAGGATATCTCTGGACAGGG	288	60
IL-8/CXCL8	GTGGCTCTCTTGGCAGCCTTCCTGAT	TCTCCACAACCCTCTGCACCCAGTTT	253	60
MIP-1 α /CCL3	GCCCGGTGTCATCTTCCTAACCAAGC	AGGGGACAGGGGAAGTCTCAGAGCAA	353	60
MIP-1 β /CCL4	TGCTGCTTTTCTTACACCGCGAGGAA	AGAAGGGACAGGAAGTGCAGGAGAGGA	291	60
RANTES/CCL5	CCCCGTGCCCACATCAAGGAGTATTT	CGTCCAGCCTGGGGAAGGTTTTTGTA	316	60
CCR1	CAACTCCGTGCCAGAAGGTGAA	GCCAGGGCCCAAATGATGAT	421	60
CCR3	GAGCCCGGACTGTCACTTTTG	CAGATGCTTGCTCCGCTCACAG	410	60
CCR5	CTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTC	CAGCCCTGTGCCTCTTCTTCTCAT	487	60
CXCR1	GGCTGCTGGGGAAGTGTCTATGAAT	GCCCGGCGATGTTGTTG	383	60
CXCR2	CCGCCCCATGTGAACCAGAA	AGGGCCAGGAGCAAGGACAGAC	427	60
β -актин (контроль)	CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC	AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC	587	60
MMP-1/1G	GAAATTGTAGTTAAATAATTAGAAAGAT	AAACATACAGTGGAGAAACAC	226	55
MMP-1/2G	AAATTGTAGTTAAATAATTAGAAAGGA	TGGAAGCATTTATTGAAAAC	240	55
MMP-3/5A	TTGATGGGGGGAAAAAC	ACTCCAGAGAAAATTTACAAAGG	226	54
MMP-3/6A	TTGATGGGGGGAAAAAA	AACATATTATCTATCAGGCTTTCCT	281	49

Пирсона и точный метод Фишера (ТМФ). Использовали также методы множественных межгрупповых различий: Н-критерий Краскела–Уоллиса, факторный дисперсионный анализ (ANOVA). Анализ зависимости между признаками проводили с помощью г-критерия Пирсона, rs-критерия Спирмена и χ^2 -критерия Пирсона. Статистическая обработка материала выполнялась на ЭВМ с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 6.0).

Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий или факторных влияний) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При анализе соотношений уровней мРНК хемокинов и их рецепторов была, в частности, выявлена корреляция между экспрессией генов MIP-1 α и CXCL8/IL-8 ($r = 0,57$) (рис. 1А). Рецепторами соответствующих хемокинов для MIP-1 α являются CCR-1 и CCR-5, а для CXCL8/IL-8 – CXCR-1 и CXCR-2.

На фоне выявленных связей между хемокинами представляет интерес исследование корреляций между экспрессией рецепторов хемокинов. Наиболее выраженными оказались взаимосвя-

зи между CCR-1 и CXCR-2 ($r = 0,58$; $p < 0,001$) (рис. 1Б). Характерно, что лигандами этих рецепторов являются MIP-1 α и, соответственно, CXCL8/IL-8, экспрессия которых также взаимно коррелирует. Обнаружена столь же значимая корреляция между CXCR-1 (лиганд – CXCL8/IL-8) и CCR-5 (лиганды: MIP-1 α , MIP- β , RANTES) ($r = 0,75$; $p < 0,001$) (рис. 1В).

Наконец, выявлена выраженная корреляция между экспрессией рецепторов CXCR-1 и CXCR-2 (оба являются рецепторами CXCL8/IL-8) ($r = 0,71$; $p < 0,001$) (рис. 1Г).

Таким образом, наиболее четкие взаимосвязи обнаружены между экспрессией хемокинов CXCL8/IL-8 и MIP-1 α и их специфическими рецепторами. В целом же, в исследованных образцах наблюдается сочетанная активация рецепторов различных хемокинов, что может отражать общую направленность рецепторной регуляции для различных видов клеток-мишеней хемокинов в ткани миометрия.

Произведена оценка зависимости уровня экспрессии генов хемокинов и их рецепторов от гистологической структуры эндометрия. При сравнительном анализе экспрессии генов хемокинов в группах больных с патологией эндометрия обнаружены следующие закономерности, отраженные в таблице 2:

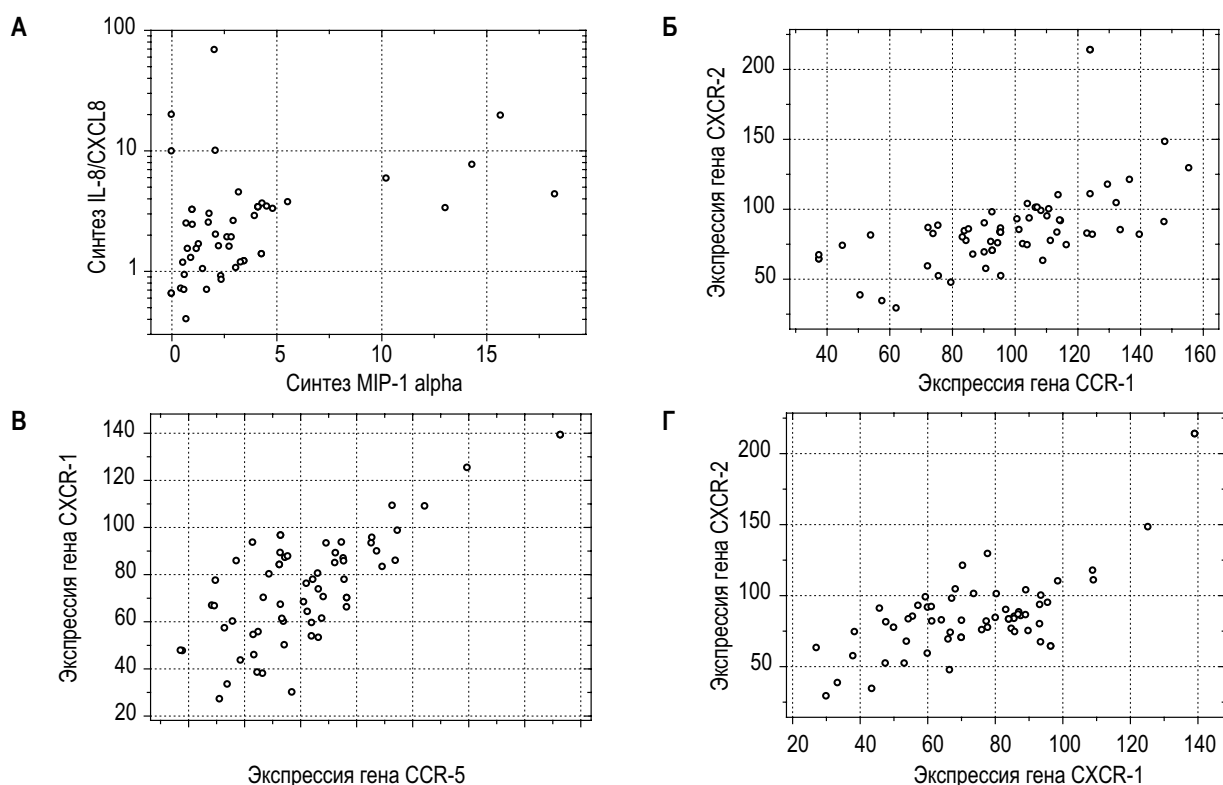


Рисунок 1. Гистограммы корреляций между экспрессией генов хемокинов и их рецепторов в образцах эндометрия от пациенток с гиперплазией эндометрия

Примечание. Показаны следующие корреляции:

- А. Корреляция между CXCL8/IL-8 и MIP-1 α ($r = 0,57$; $p < 0,001$; $n = 63$);
 Б. Корреляция между экспрессией CXCR-2 и CCR-1 ($r = 0,58$; $p < 0,001$; $n = 63$);
 В. Корреляция между экспрессией CXCR-1 и CCR-5 ($r = 0,75$; $p < 0,001$; $n = 63$);
 Г. Корреляция между экспрессией CXCR-1 и CXCR-2 ($r = 0,71$; $p < 0,001$; $n = 63$).

1. Уровень экспрессии мРНК MIP-1 α существенно повышен в полипах, развивающихся на фоне гиперплазии эндометрия без атипии ($p = 0,003$). Этот показатель достоверно ниже при атрофии эндометрия ($2,27 \pm 0,56$ ед.) по сравнению с его экспрессией у женщин с полипами эндометрия на фоне гиперплазии без атипии ($4,96 \pm 1,06$ ед.) ($t = 2,34$; $p = 0,039$). Методом множественных сравнений, в рамках факторного дисперсионного анализа (ANOVA), показано,

что уровень экспрессии MIP-1 α достоверно выше у больных со сложной атипической гиперплазией эндометрия ($14,32 \pm 0,34$ ед.), по сравнению с остальными морфологическими изменениями эндометрия ($F = 3,38$; $p < 0,001$).

2. Уровень экспрессии гена эотаксина-2 достоверно выше у женщин с полипами эндометрия на фоне гиперплазии эндометрия без атипии ($5,89 \pm 1,52$ ед.) по сравнению с показателями экспрессии при секреторной трансформации эн-

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ СИНТЕЗА мРНК MIP-1 α И ЭОТАКСИНА-2 ПРИ РАЗЛИЧНОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ЭНДОМЕТРИЯ

Данные гистологического исследования	Хемокины, усл. ед.	
	MIP-1 α	эотаксин-2
1. Секреторный эндометрий ($n = 22$)	$3,53 \pm 1,11$	$3,41 \pm 0,29$
2. Гиперплазия эндометрия без атипии ($n = 24$)	$1,75 \pm 0,32$	$3,53 \pm 0,41$
3. Полипы эндометрия на фоне гиперплазии эндометрия без атипии ($n = 6$)	$4,96 \pm 1,06^*$	$5,89 \pm 1,52^{***}$
4. Атрофия эндометрия ($n = 7$)	$2,27 \pm 0,56^{**}$	$2,51 \pm 0,84$
5. Простая атипическая гиперплазия эндометрия ($n = 3$)	$2,03 \pm 0,44$	$3,21 \pm 1,46$

Примечание. * – различия между (3) и остальными группами больных достоверны при $p = 0,003$; ** – $p_{3,4} = 0,04$; *** – различия между (3) и (1, 4) достоверны при $p = 0,045$.

дометрия ($3,41 \pm 0,29$ ед.; $t = 2,62$; $p = 0,015$) и при атрофии эндометрия ($2,51 \pm 0,84$ ед.; $t = 2,02$; $p = 0,068$; $U = 7,00$; $p = 0,045$).

Методом множественных сравнений, выполненного в рамках факторного дисперсионного анализа, определено, что уровень экспрессии гена эотаксина-2 достоверно выше у больных со сложной атипической гиперплазией эндометрия ($16,63$ ед.), по сравнению с пятью остальными видами морфологических изменений эндометрия ($F = 9,68$; $p < 0,001$). Выявлено также снижение экспрессии гена CCR-3 (рецептора семейства эотаксинов) в полипах эндометрия (рис. 2).

Уровень мРНК CCR-3 достоверно выше при секреторной трансформации эндометрия ($93,30 \pm 4,54$ ед.) и при атрофии эндометрия ($92,43 \pm 4,63$ ед.) по сравнению с женщинами, у которых обнаружены полипы эндометрия на фоне гиперплазии эндометрия без атипии ($72,21 \pm 3,26$ ед.) ($t = 2,35$; $p = 0,026$; $U = 19,00$; $p < 0,009$) и ($t = 3,45$; $p < 0,005$; $U = 3,50$; $p = 0,012$) соответственно.

Экспрессия гена CCR-3 имеет тенденцию к повышению у женщин с метроррагиями по сравнению с меноррагиями ($t = 1,91$; $p = 0,061$). Уровень синтеза мРНК CCR-1 несколько выше при меноррагиях, чем при менометроррагиях ($t = 1,73$; $p = 0,095$).

Чем старше пациентки, тем ниже у них уровень MIP-1 α ($r = -0,29$; $p = 0,020$). Таким образом, можно предположить, что с возрастом стимуляция системы хемокинов угасает.

Анализируя связи между уровнями экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов, и тяжестью течения заболевания по количеству рецидивов и диагностических выскабливаний в анамнезе, можно сделать следующие заключения: уровень экспрессии гена MIP-1 β выше у женщин с большим количеством рецидивов и диагностических выскабливаний в анамнезе ($1,82 \pm 0,47$ ед.) по сравнению со случаями единичных рецидивов

($0,84 \pm 0,19$ ед.; $t = 2,16$; $p = 0,039$). Таким образом, синтез мРНК MIP-1 β повышен при более длительных и тяжелых нарушениях менструального цикла, требующих проведения большего количества инвазивных лечебных процедур.

Уровень экспрессии мРНК CXCR-2 относительно низок у женщин с бесплодием ($57,32 \pm 5,67$ ед.) по сравнению с женщинами, имевшими 3 беременности и более ($91,58 \pm 5,21$ ед.; $t = 1,77$; $p = 0,083$). У женщин, имевших выкидыши, уровни CXCL8/IL-8 ($8,35 \pm 4,82$ ед.) выше, чем у женщин без выкидышей в анамнезе ($2,34 \pm 0,48$; $t = 2,24$; $p = 0,029$). Подобная взаимосвязь выявлена и для MIP-1 β ($t = 1,83$; $p = 0,072$).

У женщин с угрозой невынашивания беременности была отмечена повышенная экспрессия гена MIP-1 β ($t = 2,24$; $p = 0,029$). В то же время у пациенток, не имевших осложнений беременности, уровень мРНК эотаксина ($1,98 \pm 0,11$ ед.) и RANTES ($1,38 \pm 0,10$ ед.) достоверно ниже, чем у женщин, имевших осложнения ($3,00 \pm 0,50$ ед.; $t = 2,91$; $p = 0,005$) и ($2,00 \pm 0,37$ ед.; $t = 2,18$; $p = 0,034$), соответственно.

У женщин, не имевших осложнений после абортов, уровень мРНК эотаксина ($2,11 \pm 0,11$ ед.) и MIP-1 α ($2,30 \pm 0,45$ ед.) достоверно ниже, чем у женщин, имевших воспалительные осложнения ($3,66 \pm 1,01$ ед.; $t = 3,20$; $p = 0,003$) и ($6,59 \pm 2,73$ ед.; $t = 2,81$; $p = 0,007$) соответственно.

Одной из важных задач нашего исследования было выявление взаимосвязей между промоторными генотипами матриксных металлопротеиназ (важных факторов ремоделирования соединительной ткани) и экспрессией генов хемокинов. Была показана взаимосвязь между генотипом 2G/2G⁻¹⁶⁰⁷ MMP-1 и снижением экспрессии гена MIP-1 β у 40 больных (рис. 3).

Кроме того, как видно из рисунка 4, уровни экспрессии CCR-3 также оказались существенно сниженными у больных с генотипом 2G/2G⁻¹⁶⁰⁷ гена MMP-1, который, как считается, связан с более высокой продукцией коллагеназы-1.

Экспрессия CCR-1 достоверно повышена у больных с генотипом 5A/5A MMP-3, который связан с более активной продукцией данной протеазы (рис. 5). Это подтверждает точку зрения о разнонаправленной регуляции хемокиновых рецепторов CCR-1 и CCR-3 со стороны генов системы протеолиза.

Эти результаты указывают на возможность модуляции экспрессии мРНК рецептора эотаксина (CCR-3) и хемокина MIP-1 β у больных — носителей определенного, гиперактивного генотипа MMP-1 (вариант 2G/2G⁻¹⁶⁰⁷). Ранее, при клинко-генетических сопоставлениях, нами была показана связь между генотипом 2G/2G⁻¹⁶⁰⁷ MMP-1 и поздними сроками наступления менархе, а также развитием полипов эндометрия.

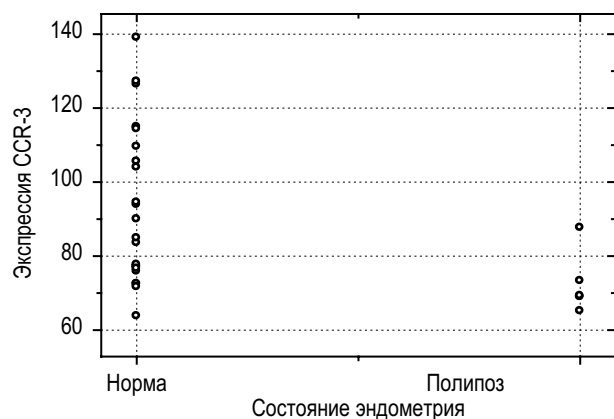


Рисунок 2. Сравнительные уровни экспрессии CCR-3 в нормальной эндометрии ($n = 22$) и в полипах эндометрия ($n = 6$) ($t = 2,35$; $p = 0,026$)

Те же клинические взаимосвязи теперь выявлены нами с экспрессией рецептора CCR3, который является рецептором эотаксина, который стабильно вырабатывается в клетках эндометрия на протяжении менструального цикла [12, 13]. Поэтому можно предположить, что влияние генного варианта 2G/2G⁻¹⁶⁰⁷ MMP-1 на сроки менархе и процессы развития полипов эндометрия реализуется через регуляцию CCR-3 – рецептора эотаксина. Таким образом, наличие у больных генотипа 2G/2G⁻¹⁶⁰⁷ MMP-1 и снижение экспрессии CCR-3 может быть использовано в качестве прогностических маркеров развития гиперпластических процессов эндометрия.

В то же время экспрессия гена CCR-1, специфического рецептора макрофагальных хемокинов (MIP-1 β и MIP-1 α), повышается у больных-носителей активного варианта гена MMP-3 (5A/5A). Поэтому можно предполагать, что соответствующие клинические эффекты, как, например, повышение экспрессии MIP-1 β в случаях с угрозой невынашивания беременности также могут быть связаны с эффектами гиперактивного генотипа MMP-3.

Подводя итоги проведенных исследований, можно заключить, что система хемокинов играет определенную роль в патогенезе гиперпластических процессов эндометрия, влияет на клинические проявления заболевания. Результаты исследования показали различные уровни экспрессии мРНК ряда хемокинов и рецепторов хемокинов, в частности, MIP-1 α , эотаксина-2, CCR-3 (рецептора эотаксина-1 и 2) в ткани полипов эндометрия, развившихся на фоне гиперплазии эндометрия без атипии, что может быть объяснено нарушением продукции регуляторных факторов в патологически измененной ткани.

Доказательством этому служит то, что уровень MIP-1 α и эотаксина-2 существенно повышен в полипах, развивающихся на фоне гиперплазии эндометрия без атипии ($p = 0,003$ и $p = 0,015$ соответственно), а уровень экспрессии CCR-3 (рецептора эотаксина-1) снижен в полипах эндометрия ($p = 0,026$). Отмечается обратная зависимость между уровнями экспрессии CCR-3 ($p = 0,021$ по критерию Спирмена), CCR-1 ($t = 2,40$; $p = 0,020$), CCR-5 ($t = 2,39$; $p = 0,020$), CXCR-2 ($t = 2,27$; $p = 0,027$), MIP-1 β ($t = 2,35$; $p = 0,044$) и возрастом наступления менархе. Это, возможно, связано с более выраженной стимуляцией системы хемокинов при раннем начале месячных. С возрастом стимуляция системы хемокинов угасает. Об этом свидетельствует снижение с возрастом уровня экспрессии гена MIP-1 α ($r = -0,29$; $p = 0,020$).

Уровень синтеза мРНК MIP-1 β повышен при более длительных, часто рецидивирующих нарушениях менструального цикла, требующих проведения большего количества выскабливаний

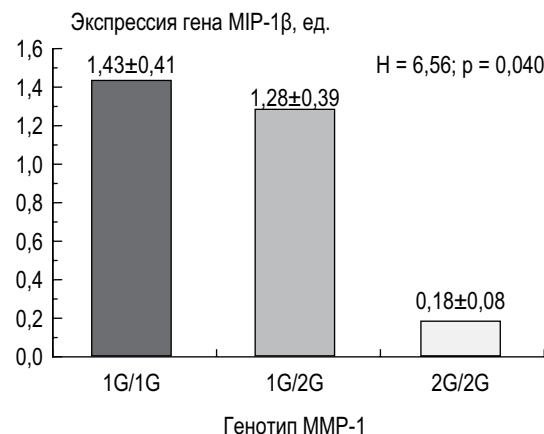


Рисунок 3. Взаимосвязь между генотипами MMP-1 (позиция -1607) и уровнями экспрессии MIP-1 β (H = 6,56; p = 0,04)

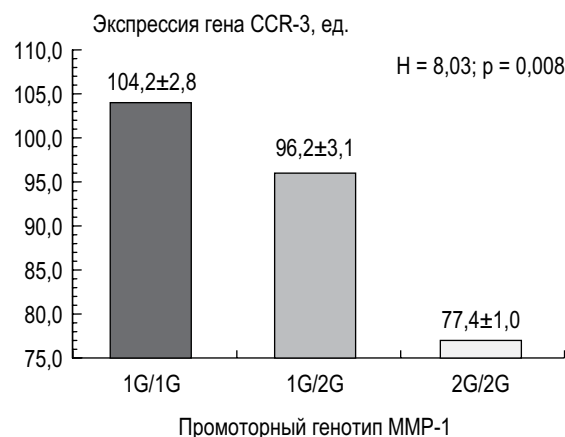


Рисунок 4. Сравнительные уровни мРНК хемокинового рецептора CCR-3 среди больных-носителей различных генотипов MMP-1 (1G/2G в позиции -1607), p = 0,008

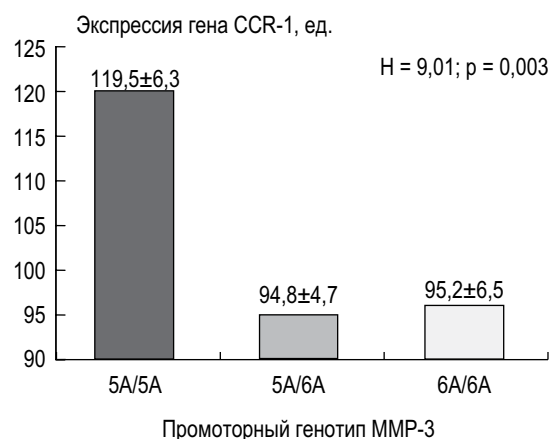


Рисунок 5. Сравнительные уровни экспрессии CCR-1 при различных генотипах MMP-3 (5A/6A в позиции -1171), p = 0,003

с лечебной целью ($t = 2,16$; $p = 0,039$). Уровень экспрессии гена MIP-1 α и CXCR-1 был выше у женщин с большим количеством беременностей ($t = 2,01$; $p = 0,049$; и $t = 2,30$; $p = 0,025$ соответственно). При наличии угрозы невынашивания отмечена повышенная экспрессия MIP-1 β ($p = 0,029$). У женщин, имевших выкидыши, уровень экспрессии IL-8 выше ($t = 2,24$; $p = 0,029$). Система хемокинов реагирует активацией генов защитных факторов (эотаксина, RANTES, MIP-1 α) на наличие воспалительных и геморрагических осложнений в течение беременности, после родов и аборт.

Заключение и выводы

1. Экспрессия генов MIP-1 α и эотаксина повышается при воспалительных или пролиферативных реакциях эндометрия.
2. Координированная экспрессия генов рецепторов MIP-1 α (CCR-1, CCR-5) и CXCL8/IL-8 (CXCR-2) подтверждают их существенную роль в общей регуляции клеточных взаимодействий при ГПЭ.
3. Связь между активацией гена рецептора CCR-3 и гистологическими характеристиками эндометрия предполагает регуляторную роль рецепторов эотаксина в его биологических эффектах.

Список литературы

1. Барышников Ю.А., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. — 1996. — № 1. — С. 58-61.
2. Бурлев В.А. Роль ангиогенеза в женской репродуктивной системе // Материалы VII Российского форума «Мать и дитя». — М., 2005. — С. 340-341.
3. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. — СПб.: Наука, 1996. — 276 с.
4. Романовский О.Ю. Гиперпластические процессы эндометрия в репродуктивном периоде (обзор литературы) // Гинекология. — 2004. — Т. 6, № 6. — С. 296-302.
5. Савельева Г.М. Бреусенко В.Г., Каппушева Л.М. Постменопауза. Физиология и патология // Вестник Российской Ассоциации акушеров-гинекологов. — 1998. — № 2. — С. 16-17.
6. Фунден Р.А. Клинико-морфологическая оценка эффективности негормональной терапии дисфункциональных маточных кровотечений: Дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2004. — 24 с.
7. Сысоев К.А., Кулагина Н.В., Чухловин А.Б., Морозова Е.Б., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в тканях миометрия и лейомиомы матки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2008. — Т. 145, № 1. — С. 91-96.
8. Хаит О.В. Возрастные изменения показателей иммунного гомеостаза у женщин с сохраненным ритмом менструаций // Акушерство и гинекология. — 1989. — № 2. — С. 61-66.
9. Чухловин А.Б., Кулагина Н.В., Сысоев К.А., Морозова Е.Б., Зуева Е.Е., Комарова Л.С., Тотолян Арег А. Изучение роли иммунологических и генетических факторов в патогенезе лейомиомы матки // Молекулярная медицина. — 2007. — № 1. — С. 42-50.
10. Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia / G.L. Mutter, R.J. Zaino, J.P. Baak [et al.] // Int. J. Gynecol. Pathol. — 2007. — Vol. 26, N 2. — P. 103-114.
11. [Endometrial hyperplasia: a review] / J.L. Brun, E. Descat, B. Boubli [et al.] // J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris). — 2006. — Vol. 35, N 6. — P. 542-550. [франц.]
12. Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes / R. Mo, J. Chen, A. Grolleau-Julius [et al.] // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174, N 10. — P. 6023-6029.
13. Expression of macrophage inflammatory protein-1 beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells / K. Kitaya, T. Nakayama, T. Okubo [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2003. — Vol. 88, N 4. — P. 1809-1814.
14. Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner / C. Maillard, M. Jost, M.U. Roemer [et al.] // Neoplasia. — 2005. — Vol. 7, N 1. — P. 57-66.
15. Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis during follicular development / T. Maruo, J.B. Laoag-Fernandes, S. Takekida [et al.] // Gynecol. Endocrinol. — 1999. — Vol. 13, N 6. — P. 410-419.
16. Salamonsen, L.A., Zhang J., Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling // J. Reprod. Immunol. — 2002. — Vol. 57, N 1-2. — P. 95-108.
17. Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus / T. Nakayama, K. Hieshima, D. Nagakubo [et al.] // J. Virol. — 2004. — Vol. 78, N 4. — P. 1665-1674.

поступила в редакцию 15.02.2011
отправлена на доработку 05.03.2011
принята к печати 21.03.2011