

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ LSIL

Боровиков И.О., Холина Л.А., Авакимян В.А.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: bio2302@gmail.com

Проведено исследование полиморфизма генов про- и противовоспалительных цитокинов периферической крови у пациенток с низкой степенью цервикального интраэпителиального поражения (LSIL) на фоне анализа вагинального микробиоценоза. Результаты исследования показали, что группе женщин с LSIL преобладают противовоспалительные генотипы (71,2 %). При этом выявлены характерные для данной патологии полиморфизмы генов провоспалительных цитокинов: сочетание гаплотипов C/C и G/C гена IL-6 и G/G гена TNF $\alpha$  встречалось у 71,1% пациенток с LSIL. Кроме того, при LSIL в 94,9 % были обнаружены гомозиготы по аллели G и сочетание в генотипе полиморфной аллели C гена IL-6 и генотипа G/G гена TNF $\alpha$  (шансы цервикального ВПЧ-поражения при этом увеличиваются в 6,9 раза). Исследование геномных аллелей основных цитокинов позволяет выделить основные полиморфизмы в зависимости от состояния вагинальной флоры. У пациенток с абсолютным нормоценозом в основном определялись следующие полиморфизмы: IL-10-592A>C, IL-4-33C>T, IL-1 $\beta$ 3953C>T, IL-1RIPst11970. При дисбиотических состояниях влажной микрофлоры наиболее часто выявлялся полиморфизм аллелей IL-1RN11100msp1, что ассоциировалось, в первую очередь, с анаэробным и смешанным дисбиозом, а также с персистенцией у *Ureaplasma spp.* и *Gardnerella vaginalis*.

Ключевые слова: цервикальное интраэпителиальное поражение, полиморфизм генов про- и противовоспалительных цитокинов периферической крови, вагинальный микроценоз.

## GENE POLYMORPHISM OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PERIPHERAL BLOOD WITH LSIL

Borovikov I.O., Kholina L.A., Avakimyan V.A.

Kuban state medical university, Krasnodar, Russia (350063, M. Sedina street, 4), e-mail: bio2302@gmail.com

The study of gene polymorphism of pro-and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood in patients with a low degree of cervical intraepithelial lesions (LSIL) analysis of vaginal microflora. The results of the study showed that the group of women with LSIL dominate anti-inflammatory genotypes (71.2 %). When it identified the pathology of proinflammatory cytokines genes polymorphisms: combination of haplotypes with/c and G/C gene for IL-6 and TNF $\alpha$  gene G/G met 71.1 % have patients with LSIL. Furthermore when LSIL in the 94.9% were detected in seeds for allele G and combination of genotype polymorphic alleles with IL-6 gene and genotype G/G TNF $\alpha$  gene (the odds of cervical HPV when this increase in 6.9 times). The study of genomic alleles of the main cytokines to highlight major polymorphisms, depending on the State of the vaginal flora. Patients with absolute normocenoz is mainly determined by the following: polymorphisms IL-10-592A > c, IL-4-33s > t IL-1 $\beta$ 3953S > t IL-1RIPst11970. When dysbiotic conditions vaginal microflora most often see allele polymorphism IL-1RN11100msp1 that was associated in the first place, with anaerobic and mixed as well as associated with *Ureaplasma spp.* and *Gardnerella vaginalis*.

Keywords: cervical intraepithelial lesions, gene polymorphism of pro-and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood, vaginal mikrocenos.

Среди заболеваний, передающихся половым путем, одним из самых распространенных является папилломавирусная инфекция (ПВИ). Актуальность проблемы обусловлена тремя основными моментами. Во-первых, высокой частотой распространения вируса папилломы человека (ВПЧ) – число инфицированных в мире за последнее десятилетие увеличилось более чем в 10 раз [1, 5, 10]. Во-вторых, ПВИ сложна и дорога для диагностики и лечения – более 15 % женщин, не имеющих клинических симптомов ПВИ,

являются носительницами ВПЧ и источниками передачи инфекции [3, 8, 9]. Кроме того, определенные трудности вызывает диагностика латентной формы инфекций, так как в данном случае заболевание не выявляется клинически и наличие вируса в инфицированной ткани не вызывает явных морфологических изменений [1, 6, 7]. В-третьих, ВПЧ рассматривается как этиологический фактор рака шейки матки [2, 4, 10]. Рак шейки матки стоит на втором месте среди злокачественных новообразований в мире у женщин после рака молочной железы [1]. В европейских странах рак шейки матки занимает пятое место в списке злокачественных опухолей, несмотря на наличие эффективных скрининговых программ [4, 7].

В патогенезе ПВИ большую роль играют иммунные механизмы, как на системном, так и на локальном уровне, которые позволяют вызывать активацию транскрипции ДНК ВПЧ, его интеграцию в клетку и последующей активации неопластических процессов. Кроме того, немаловажное значение имеет состояние микробиоценоза цервикагинальной области. Учитывая клиническое течение ПВИ и различные степени поражения, особую значимость приобретает определение состояния адаптационных систем организма, особенно на ранних стадиях ВПЧ-поражения шейки матки, что позволит в дальнейшем разработать индивидуальную тактику менеджмента данного контингента больных.

### **Материалы и методы**

У всех пациенток с цервикальным интраэпителиальным поражением легкой степени, включенных в исследование, проведена сравнительная оценка содержания ДНК основных цитокинов периферической крови. Сравнивали образцы ДНК, полученные от 120 женщин с LSIL, с группой клинико-лабораторного контроля (30 условно здоровых женщин). Пациенткам провели типирование следующих генетических полиморфизмов, ассоциированных с системой цитокинов - IL-1 $\alpha$ -889C>T, IL-1 $\beta$ 3953C>T, IL-1R1:Pst11970, IL-1RN:11100msp1, IL-2:166G>T(Leu38Leu), IL-2-330G>T, IL-4-589C>T, IL-4-1098T>G, IL-4-33C>T, IL-4R+1902A>G(Gln576Arg), IL-6-174G>C, IL-10-1082G>A, IL-10-592A>C, IL-10-819C>T, IL-12 $\beta$ -1188C>A, IL-18-137G>C, IL-18-607C>A, IL-18-656A>C, TNF-308G>A.

### **Результаты и обсуждение**

При анализе полученных данных выявлено, что у женщин с LSIL нет существенных различий по сравнению с группой клинико-лабораторного контроля в частоте встречаемости аллелей и генотипов следующих генов: IL-12 $\beta$  в локусе -1188(C>A), IL-10 в области -592A>C и в двух позициях гена СЭФР-А 936C>T и -634G>C). Кроме того, определение полиморфизмов генов цитокинов, относящихся к членам семейства IL-1, не выявило их клинической значимости в отношении патологии шейки матки (рис. 1). При этом выявлены

различия в полиморфизмах генов, кодирующих белки провоспалительных цитокинов - IL-6 и TNF $\alpha$ , в группах женщин с LSIL по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

Отмечены характерные для пациенток с LSIL полиморфизмы генов провоспалительных цитокинов: полиморфной аллели С гена IL-6 (гаплотипы C/C и G/C) и гомозиготный вариант гена TNF $\alpha$  (G/G), была изучена взаимосвязь между ВПЧ-поражением шейки матки и наличием в генотипе пациенток сочетания этих гаплотипов. Обнаружено, что сочетание гаплотипов C/C и G/C гена IL-6 и G/G гена TNF $\alpha$  встречалось у 71,1 % пациенток с LSIL.

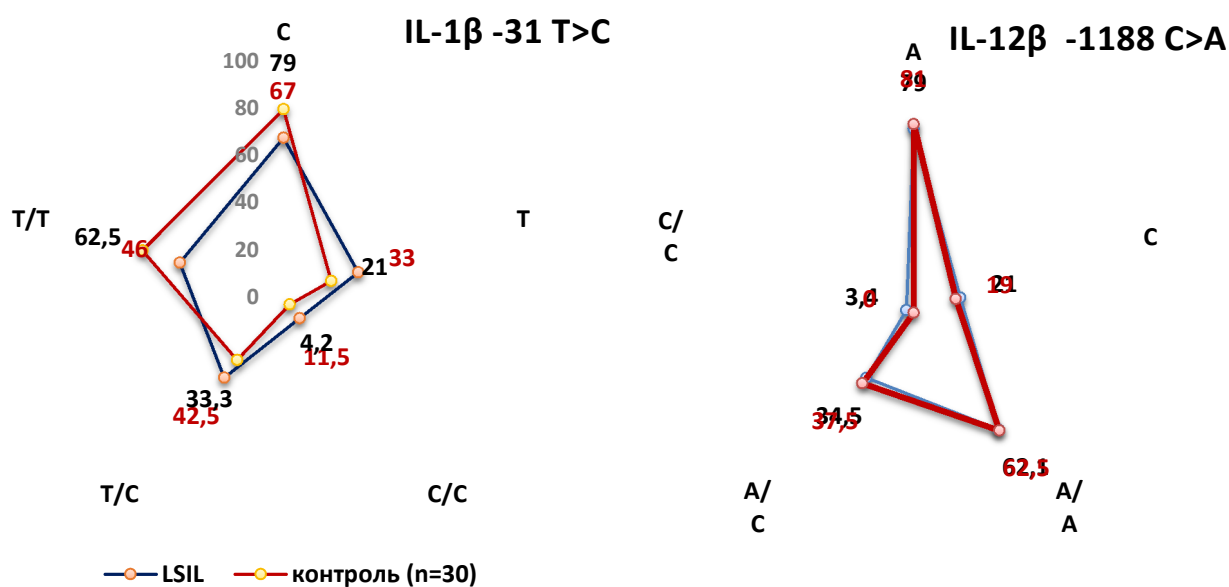


Рис.1. Аллели генов цитокинов IL-1 $\beta$ -31T>C IL-12 $\beta$ -1188C>A в исследуемых группах

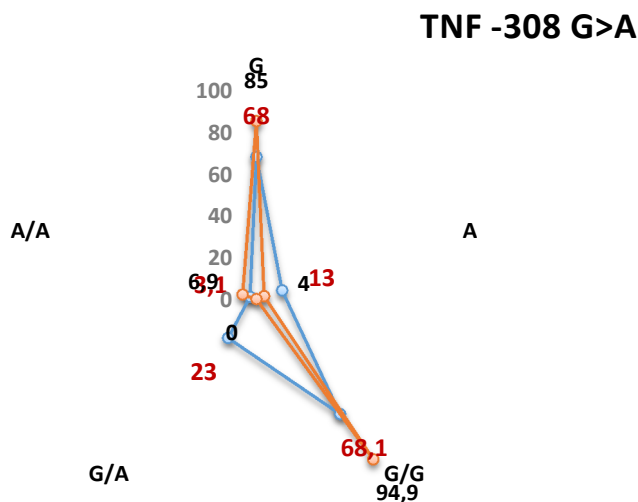
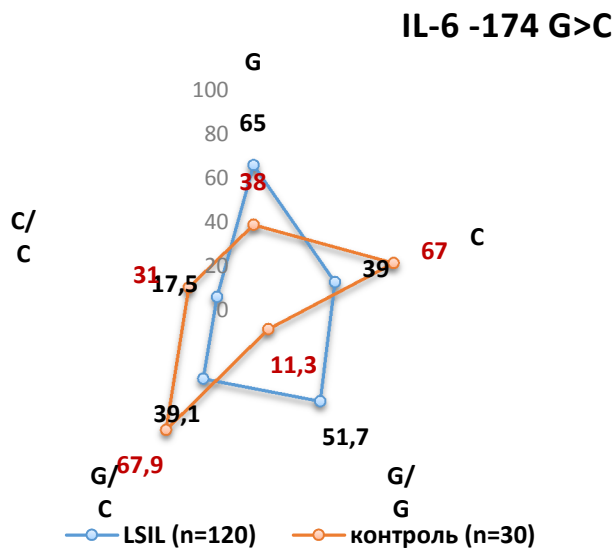


Рис.2. Аллели генов цитокинов IL-6-174G>C и TNF-308G>A в исследуемых группах

В ходе данного генетического скрининга не было обнаружено взаимосвязи между полиморфизмами генов противовоспалительных цитокинов IL-12 $\beta$ , IL-10, СЭФР-А, цитокинов, относящихся к членам семейства IL-1 и наличием поражения шейки матки. В то же время специфические закономерности выявлены при изучении точечных замен нуклеотидов в промоторной зоне генов IL-6 и TNF $\alpha$ . Определено, что обнаружение у пациенток основной группы аллели С гена IL-6 сопровождается двукратным повышением частоты ВПЧ-патологии шейки матки, тогда как гомозиготный генотип G/G был типичен для пациенток контрольной группы.

В контрольной группе замена нуклеотидов G>A в позиции -308 промотора гена TNF $\alpha$  выявлялась более часто. В то время как при LSIL в 94,9% были обнаружены гомозиготы по аллели G. Также, характерно для LSIL сочетание в генотипе полиморфной аллели С гена IL-6 и генотипа G/G гена TNF $\alpha$  (шансы ВПЧ-поражения увеличиваются в 6,9 раза) (рис. 2).

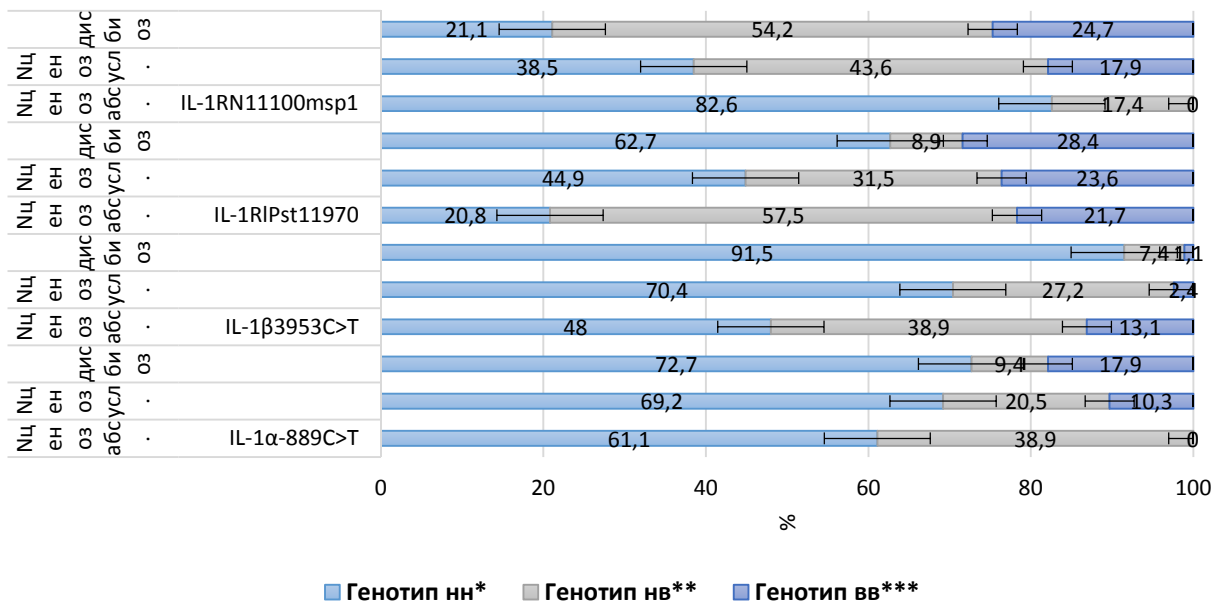
В зависимости от преобладания генома про- или противовоспалительных цитокинов в исследуемых клинических группах мы попытались выделить 3 генотипа: сбалансированный, провоспалительный и противовоспалительный.



*Рис.3. Распределение генотипов в исследуемых группах*

При этом нами выявлено, что в группе женщин с LSIL преобладают противовоспалительные генотипы (71,2 %), в группе клинико-лабораторного контроля намного чаще встречался сбалансированный генотип (63,3 %) (рис. 3). Количество сбалансированных генотипов статистически не отличалось во всех группах.

Был проведен генетический скрининг в исследуемых группах в зависимости от состояния микробиоценоза влагалища (рис. 4). Анализ частоты выявления полиморфизмов в системе гена IL-1 показал, что преобладающим генотипом полиморфизма IL-1 $\alpha$ -889C>T при абсолютном и условном нормоценозе был вариант CC - 61,3 % и 69,2 % соответственно, при дисбиотических состояниях влагалища данный вариант гена встречался. При этом у женщин с абсолютным нормоценозом выявляли только генотип СТ, а генотип ТТ не встречался (при условном нормоценозе и дисбиозе генотип ТТ встречался в 11,4 %). Генотипы СТ или ТТ гена IL-1 $\beta$ 3953C>T чаще выявляли у женщин с абсолютным нормоценозом, таким образом, наличие этого полиморфизма может расцениваться как благоприятный вариант генотипа в плане микробиоценоза. Генотип СТ гена IL-1R1:Pst11970 в 2 раза чаще выявляли у женщин с абсолютным нормоценозом ( $p=0,049$ ), в то время как генотип CC в два раза чаще имел место у женщин с условным нормоценозом и дисбиозом.



**Примечание (здесь и далее):**

\* генотип ни - гомозигота по «дикому» (низкопродуцирующему) аллелю

\*\* генотип пв - гетерозигота

\*\*\* генотип вв - гомозигота по полиморфному (высокопродуцирующему) аллелю

*Рис.4. Частота выявления полиморфизмов в гене IL-1 у пациенток с нормоценозом и дисбиозом*

Видимо именно носительство аллеля Т чаще присутствует у пациенток с абсолютным нормоценозом. Носительство полиморфизма IL-1RN11100msp1 ассоциировано с наличием условного нормоценоза, как в гетерозиготном, так и гомозиготном полиморфном варианте. При абсолютном нормоценозе не выявили ни одного случая носительства полиморфной гомозиготы, частота же выявления «дикого» гомозиготного генотипа у женщин с условным нормоценозом была в 2 раза ниже, при дисбиозе он вовсе не обнаруживался. Таким образом, полиморфизмы IL-1α-889C>T и IL-1RN11100msp1 в гене IL-1 статистически значимо чаще выявляли у пациенток с условным нормоценозом и дисбиозом, а полиморфизмы IL-1β3953C>T и IL-1RIPst11970, напротив, чаще встречались при абсолютном нормоценозе.

При оценке частоты обнаружения полиморфных аллелей гена IL-4 получены следующие данные (рис. 5). Полиморфизмы IL-4-589C>T, IL-4-1098T>G и IL-4R+1902A>G(Gln576Arg) в гене IL-4 с равной частотой выявлялись у пациенток с нормоценозом (абсолютным и условным) и дисбиозом. Различия были выявлены в частоте выявления аллеля Т гена IL-4-33C>T. Его во всех вариантах чаще выявляли при абсолютном нормоценозе (аллель Т выявлен у 79,7 %), в то время как у 42,8 % женщин с условным нормоценозом она отсутствовала. В связи с вышеперечисленным можно думать, что носительство данных полиморфизмов оказывает протективный эффект на состояние микробиоценоза влагалища.

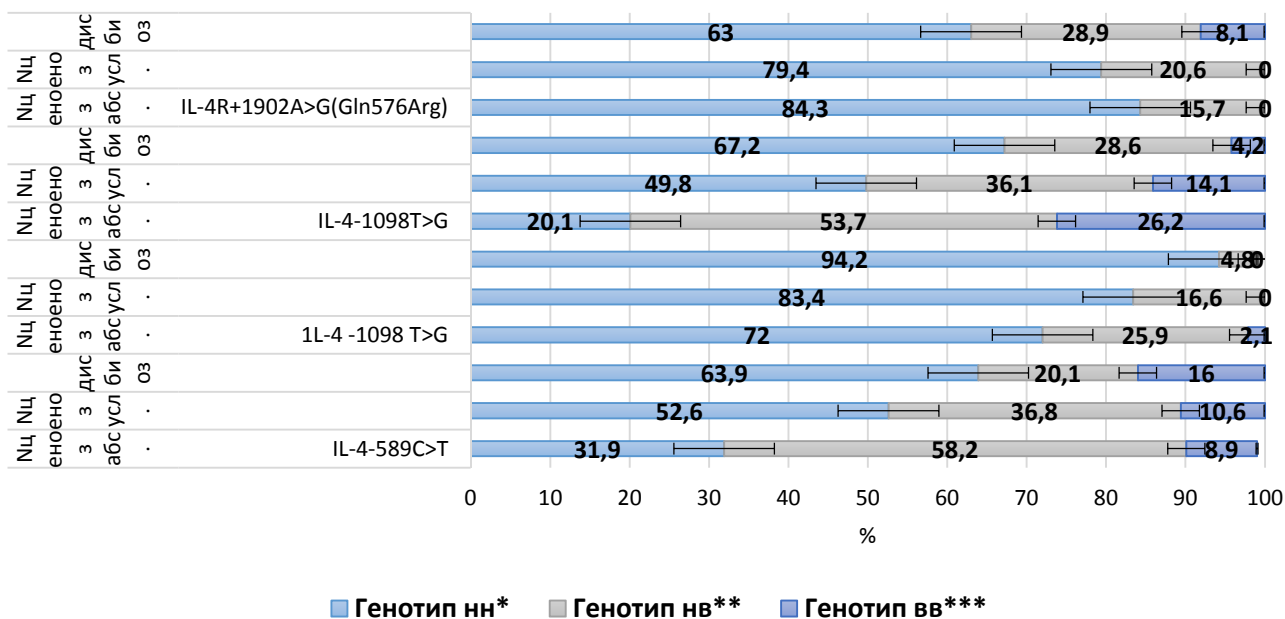


Рис. 5. Частота выявления полиморфизмов в гене IL-4 у пациенток с нормоценозом и дисбиозом

Частота выявления полиморфизмов генов IL-2, IL-6, IL-18 и TNF практически не различалась между группами пациенток с нормоценозом (абсолютным и условным) и дисбиозом влагалища. Генотипы AC и CC гена IL-10-592A>C чаще выявляли при абсолютном нормоценозе влагалища (при условном нормоценозе и дисбиозе чаще присутствовал генотип AA (56,8 %)).

Исследование геномных аллелей основных цитокинов позволяет выделить основные полиморфизмы в зависимости от наличия сохраненной нормальной микрофлоры влагалища. У пациенток с абсолютным нормоценозом в основном определялись следующие полиморфизмы: IL-10-592A>C, IL-4-33C>T, IL-1β3953C>T, IL-1R1Pst11970. У пациенток с условным нормоценозом: IL-1α-889C>T и IL-1RN11100msp1. При дисбиотических состояниях влагалищной микрофлоры наиболее часто выявлялся полиморфизм аллелей IL-1RN11100msp1, что ассоциировалось, в первую очередь, с анаэробным и смешанным дисбиозом, а также с персистенцией *Ureaplasma spp.* и *Gardnerella vaginalis*.

### Список литературы

1. Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 32 с.
2. Бибнева Т.Н., Прилепская В.Н. Папилломавирусная инфекция и патология шейки матки // Гинекология. – 2013. – Т.3, № 3. – С. 77-81.
3. Киселев В.И. Папилломавирусная инфекция. – М., 2013. – 36 с.

4. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий: руководство для врачей. – СПб.: Ольга, 2012. – 168 с.
5. Патология шейки матки и генитальные инфекции / под ред. проф. В.Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 383 с.
6. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: (руководство практикующего врача). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 144 с.
7. Bosch F., Manos M., Munoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. J. Natl. Cancer Inst 87:796-802, 2014.
8. Chen T., Pecoraro G., Defendi V. Genetic analysis of *in vitro* progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. Cancer Res 2011; 53:1167–71.
9. Hohn H., Julch M., Pilch H., Kortsik C. et al. Definition of the HLA-A2 restricted peptides recognized by human CD8+ effector T cells by flow-assisted sorting of the CD8+ CD45RA+ CD28- T cell subpopulation. ClinExpImmunol 2013 Jan;131(1):102-10.
10. Huang G., Zhang X., Park N. Increased ICAM-1 expression in transformed human oral epithelial cells: molecular mechanism and functional role in peripheral blood mononuclear cell adhesion and lymphokine-activated-killer cell cytotoxicity. Int J Oncol 2011 Sep;17(3):479-86.

**Рецензенты:**

Куценко И.И., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства, гинекологии и перинатологии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар;

Карахалис Л.Ю., д.м.н., профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.