

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.1.175

УДК 619:612.12:618.14-002:636.2

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ КРОВИ КОРОВ, БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

В.С. Болотова – мл. науч. сотр. лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики (ORCID: 0000-0002-6967-7162), Н.В. Пасько – к.б.н., вед. науч. сотр. лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики (ORCID: 0000-0003-0513-7252), В.И. Михалёв – д.в.н., гл. науч. сотр. сектора болезней органов воспроизводства крупного рогатого скота (ORCID: 0000-0001-9684-4045)
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии»

Ключевые слова: коровы, хронический эндометрит, провоспалительные и противовоспалительные цитокины, экспрессия.

Key words: cows, chronic endometritis, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, expression.

Работа выполнена по гос. заданию 160. «Молекулярно-биологические и нанобиотехнологические методы создания биопрепаратов нового поколения, технологии и способы их применения с целью борьбы с особо опасными инфекционными, паразитарными и незаразными болезнями животных»



РЕФЕРАТ

Уровень экспрессии генов провоспалительных (ИЛ-1 α и ИЛ-1 β) и противовоспалительных (ИЛ-10) цитокинов в крови коров изучен на 20 животных, разделённых по принципу аналогов на две группы: первая группа (n=10) – клинически здоровые коровы, вторая (n=10) – с диагнозом хронический эндометрит. Диагностику хронического эндометрита осуществляли на основании результатов трансректального исследования и эхографических данных, проведённых с применением портативного ультразвукового сканера. В опыт были включены коровы через 60 и более дней после отёла. Установлено, что уровень экспрессии ИЛ-1 α , ИЛ-1 β у коров с хроническим эндометритом выше соответственно в 1,92 (P<0,01) и 4,61 (P<0,001) раза, чем у клинически здоровых животных, а противовоспалительного цитокина ИЛ-10 – наоборот, ниже в 118,6 (P<0,001) раза. Доминирование экспрессии генов провоспалительных цитокинов над противовоспалительными свидетельствует о развитии воспалительного процесса в матке, что подтверждается результатами гистологических исследований биопсийного материала эндометрия. У клинически здоровых животных покровный эпителий выстлан клетками призматической или кубической формы, эндометрий незначительно инфильтрирован нейтрофилами, лимфоцитами, гистиоцитами. Маточные железы представлены в значительном количестве, железистые клетки целостные, призматической формы. У коров с хроническим эндометритом диагностировано десквамация покровного эпителия, клетки которого в большинстве случаев находятся в состоянии дистрофии и некробиоза. Просвет маточных желез сужен, железистые клетки отторгались в просвет желез, что свидетель-

ствует о снижении функциональной активности органа. Эндометрий выглядел отёчным, обильно инфильтрирован, преимущественно нейтрофильными лейкоцитами и в меньшей степени лимфоидными клетками, свидетельствующими о наличии воспаления в слизистой оболочке матки.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Вне зависимости от своей локализации, воспалительные процессы протекают на фоне дисбаланса систем общей и локальной резистентности. Характер исхода патологического процесса воспалительного характера определяется уровнем выработки про-, противовоспалительных цитокинов [1, 2, 3].

Разновидностью сигнальных белков являются цитокины. К провоспалительным цитокинам относится интерлейкин-1 (ИЛ-1), а к противовоспалительным – интерлейкин-10 (ИЛ-10) [4]. Интерлейкин-1 α , 1 β имеют одинаковую молекулярную массу, обладают практически одинаковым спектром биологической активности и конкурируют за связывание с одними и теми же рецепторами [5, 6, 7]. Цитокины определяют характер особенностей образования иммунного ответа при помощи ассистирования в распознавании антигенов, увеличения экспрессии молекул основного комплекса гистосовместимости, дифференцировки иммунных клеток и т.д. Цитокины могут стимулировать миграцию нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов, также регулируют другие процессы, ассоциированные с воспалением, в том числе и регенерацию после воспаления. Спектр влияния цитокинов свидетельствует о довольно широком круге клеток организма, с которыми они ведут взаимодействие. Вследствие этого, исследование их воздействия в определенных патологиях требует всестороннего подхода с учетом наибольшей вариативности их влияния на организм [8, 9].

Хронический эндометрит в молочном животноводстве регистрируется через 45-60 и более дней после отёла при проведении гинекологической диспансеризации. При хроническом эндометрите основные изменения происходят в эндометрии под воздействием микробного фактора, характеризующиеся множественными вторичными морфофункциональными изменени-

ями, нарушающие циклическую биотрансформацию клеток слизистой оболочки матки [10, 11]. Хроническое воспаление сопровождается не только повреждением структуры клеток эндометрия, но и изменением количества иммунокомпетентных клеток, прежде всего естественных «киллеров» и провоспалительных цитокинов [12, 13].

Поэтому результаты изучения уровня про- и противовоспалительных цитокинов в крови коров при хроническом эндометрите будут являться основой для последующей разработки критериев прогнозирования и ранней диагностики, а также вероятности исхода патологического процесса.

Цель исследований: изучить уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов крови коров, больных хроническим эндометритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHOD

Исследования проводились в ООО «СП Вязноватовка» Нижнедевицкого района Воронежской области. Объектом исследований служили коровы чёрно-пёстрой породы с массой тела 450-500 кг, больные хроническим эндометритом. Хронический эндометрит диагностировали при проведении гинекологической диспансеризации с применением ультразвуковой диагностики. Исследования по изучению уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов выполнены на 20 животных, разделённых по принципу аналогов на две группы: первая группа (n=10) – клинически здоровые коровы, вторая (n=10) – с диагнозом хронический эндометрит. От всех включённых в опыт животных отобраны пробы крови для изучения экспрессии генов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-10.

Выделение РНК из крови проводили, используя набор РНК-Экстран (Синтол, Россия). При проведении реакции обрат-

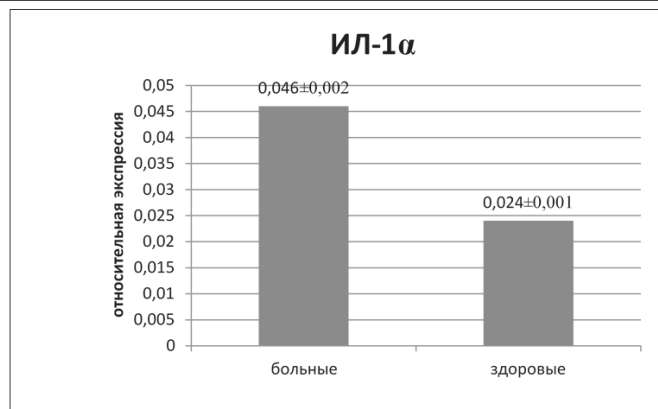


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии ИЛ -1α у клинически здоровых и больных хроническим эндометритом коров

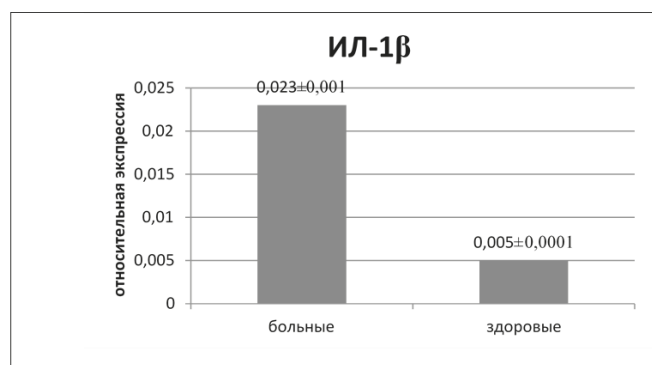


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии ИЛ -1β у клинически здоровых и больных хроническим эндометритом коров

ной транскрипции для получения кДНК использовали амплификатор «Терцик» («НПО ДНК-Технология», Россия) с применением набора реактивов MMLVRTkit («Евроген», Россия). В дальнейшем проведена ПЦР-реакция с учётом праймеров для интерлейкинов (ИЛ -1α, ИЛ -1β, ИЛ -10). Полимеразная цепная реакция проведена на детектирующем амплификаторе «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с готовой коммерчески доступной смесью для PCR 5X qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Россия).

От клинически здоровых (n=5) и боль-

ных хроническим эндометритом животных (n=5), включённых в опыт отобраны пробы эндометрия методом биопсии для проведения гистологических исследований, выполненных общепринятыми в морфологии методами.

Полученный при проведении исследований цифровой материал обрабатывали статистически с применением компьютерной программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

При исследовании крови коров было обнаружено, что уровень экспрессии ИЛ-1α, ИЛ-1β у клинически здоровых животных ниже соответственно в 1,92 (P<0,01)

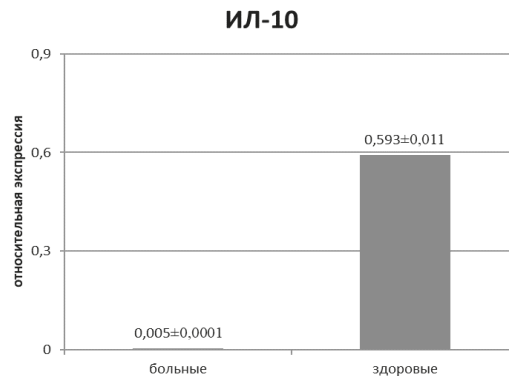


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии ИЛ-10 у клинически здоровых и больных хроническим эндометритом коров

и 4,61 ($P < 0,001$) раза, чем у больных хроническим эндометритом животных (рис.1, 2).

Уровень экспрессии генов противовоспалительного цитокина ИЛ-10 у клинически здоровых животных (рис. 3), наоборот, выше в 118,6 раза ($P < 0,001$) по сравнению с коровами, у которых диагностирован хронический эндометрит.

Доминирование экспрессии генов провоспалительных цитокинов над противовоспалительными свидетельствует о развитии воспалительного процесса в матке, что подтверждается результатами гистологических исследований биопсийного материала эндометрия.

У клинически здоровых животных покровный эпителий целостный, представлен клетками призматической или кубической формы. Компактный слой эндометрия незначительно инфильтрирован нейтрофилами, лимфоцитами, гистиоцитами. Маточные железы представлены в значительном количестве, в большинстве случаев просвет их расширен и заполнен секретом. Железистые клетки целостные, призматической формы.

У коров с хроническим эндометритом констатируется отторжение клеток покровного эпителия. Сохранившийся покровный эпителий представлен клетками плоской формы, в большинстве случаев, находящихся в состоянии дистрофии и некролиза. В толще эндометрия находи-

лись маточные железы, просвет их сужен. Клетки, выстилающие маточные железы, подвергались дистрофии и отторгались в просвет железы. Эндометрий выглядел отёчным, обильно инфильтрирован, преимущественно нейтрофильными лейкоцитами и в меньшей степени лимфоцитами, свидетельствующими о наличии воспаления в слизистой оболочке матки.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, развитие хронического эндометрита у коров протекает на фоне дисбаланса между про- и противовоспалительными цитокинами. Уровень экспрессии провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β) в крови коров с хроническим эндометритом в 1,92 и 4,61 раза выше, чем у клинически здоровых животных. Повышенный уровень экспрессии ИЛ-1 α , ИЛ-1 β у больных хроническим эндометритом коров свидетельствует о развитии воспалительной реакции. При хроническом эндометрите доминирование провоспалительных цитокинов является ответом организма на повреждение, способствующее развитию локальной сосудистой реакции. Обратная ситуация с экспрессией ИЛ-10, уровень которого резко снижен у больных коров (в 118,6 раза), из-за развития хронического эндометрита.

LEVEL OF GENEEXPRESSION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD OF

COWS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS. V.S. Bolotova, Junior Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics (ORCID: 0000-0002-6967-7162), N.V. Pasko, Cand. of Biol. Sciences, Principal Scientific Associate of the Laboratory of Innovative Preparations of Recombinant Proteomics (ORCID: 0000-0003-0513-7252), V.I. Mikhalev, Doc. of Vet. Sciences, Chief Scientific Associate of the Sector of Diseases of Bovine Reproductive Organs (ORCID: 0000-0001-9684-4045). FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy"

The work was done according to the state task 160. "Molecular-biological and nanobiotechnological methods for creating new generation biological products, technologies and methods of their application in order to combat especially dangerous infectious, parasitic and non-contagious animal diseases"

ABSTRACT

The level of expression of genes of pro-inflammatory (IL-1 α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in the blood of cows was studied on 20 animals, divided according to the principle of analogues into two groups: the first group (n=10) - clinically healthy cows, the second one (n=10) - diagnosed with chronic endometritis. Diagnosis of chronic endometritis was carried out on the basis of the results of transrectal examination and echographic data obtained using a portable ultrasound scanner. The experiment included cows 60 or more days after calving. It has been found that the level of expression of IL-1 α , IL-1 β in cows with chronic endometritis is by 1.92 and 4.61 times higher, respectively, than in clinically healthy animals, and the anti-inflammatory cytokine IL-10, on the contrary, is by 118.6 times lower. The dominance of pro-inflammatory cytokine gene expression over anti-inflammatory ones indicates the development of an inflammatory process in the uterus, which is confirmed by the results of histological studies of endometrial biopsy material. In clinically healthy animals, the integumentary epithelium is lined with cells of a prismatic or cubic shape, the endometri-

um is slightly infiltrated with neutrophils, lymphocytes and histiocytes. The uterine glands are presented in a significant amount, the glandular cells are integral, prismatic in shape. In the cows with chronic endometritis, desquamation of the integumentary epithelium was diagnosed, the cells of which in most cases are in a state of dystrophy and necrobiosis. The lumen of the uterine glands is narrowed, glandular cells are rejected into the lumen of the glands, which indicates a decrease in the functional activity of the organ. The endometrium looked edematous, abundantly infiltrated, predominantly with neutrophilic leukocytes and, to a lesser extent, with lymphoid cells, indicating the presence of inflammation in the uterine mucosa.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Анциферова Ю.С., Сотникова Н.Ю., Шохина М.Н. Цитокины в акушерстве, гинекологии и неонатологии. Цитокины и воспаление. 2002;2(1):145-156. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9124320>
2. Жидовинов А.А., Чупров С.В. Клинико-лабораторная стратификация эндогенной интоксикации и SIRS у больных с распространенной формой аппендикулярного перитонита. Цитокины и воспаление. 2007;6(1):25-30. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21362716>
3. Казачков Е.Л. Хронический эндометрит, эндокринная функция яичников и рецептивность эндометрия: есть ли связь. Медицинский вестник Башкортостана. 2014; 20(5):3.
4. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокины и воспаление. 2004;3(2):16-22. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9124580>
5. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж., Семёнов Н.В., Гузовская Е.В. Интерлейкин-1, интерлейкин-10 в регуляции воспалительного процесса. Сибирский медицинский журнал. 2012;8:5-7. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18402803>
6. Свиридова В.С., Кологривова Е.Н.,

- Пронина Н.А. Цитокиновая регуляция иммунных реакций при ревматоидном артрите. Цитокины и воспаление. 2010;9(2):3-6. Режимдоступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=16810823>.
7. Chubenko V.A. Immunotherapy is based on cytokines (IL-1, IL-2, FNO, CSF, IFN). Hum.Reprod. 2016;5:35-41.
8. Yazd A.S., Ghoreschi K. The interleukin-1 family. Adv. Exp. Med. Biol. 2016;941:21-29. DOI: 10.1007/978-94-024-0921-5.
9. Коган Е.А., Демура Т.А. Молекулярные и морфологические аспекты нарушений рецептивности эндометрия при хроническом эндометрите. Архив патологии. 2012;74(3):3-7.
10. Cicinelli E., Matteo M., Tinelliet R. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. Hum.Reprod. 2015;Feb.30(2):323-353. DOI: 10.1093/humrep/deu292.
11. Zezenketa E., Matteo M., Tinell R. Endometritis kronikoaren prebalentzia behin eta berriro errepikatzen ez den ezartze-akatsen eta terapia antibiotikoaren ondoren PFRK izan duen arrakastatan. Hum.Reprod. 2015;30(2):323-330. DOI: 10.1093 / humrep / deu292
12. Penaloza H.F., Nieto P.A., Munoz-Durango N. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumonia. Immunology. 2015;146(1):100-112. DOI: 10.1111/imm.1248.
13. Fields J.k., Gunther S., Adibidez J. IL-1 Familiako Zitokinaren Seinaleztapena. Mugak Immunologiaren Oinarria. 2019;10:1412.
- REFERENCES**
1. Antsiferova Yu.S., Sotnikova N.Yu., Shokhina M.N. Cytokines in obstetrics, gynecology and neonatology. Citokiny i vospalenie [Cytokines and inflammation]. 2002;2(1):145-156. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9124320>
2. Zhidovinov A.A., Chuprov S.V. Clinical and laboratory stratification of endogenous intoxication and SIRS in patients with a frequent form of appendicular peritonitis. Citokiny i vospalenie [Cytokines and inflammation]. 2007;6(1):25-30. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21362716>.
3. Kazachkov E.L. Chronic endometritis, ovarian endocrine function and endometrial receptivity: is there a link. Medicinskij vestnik Bashkortostana [Medical Bulletin of Bashkortostan]. 2014; 20(5):3. (In Russ.)
4. Simbirtsev A.S. Cytokines: classification and biological functions. Citokiny i vospalenie [Cytokines and inflammation]. 2004;3(2):16-22. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9124580>.
5. Serebrennikova S.N., Seminsky I.Zh., Semenov N.V., Guzovskaya E.V. Interleukin-1, interleukin-10 in the regulation of the inflammatory process. Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian medical journal]. 2012;8:5-7. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18402803>.
6. Sviridova V.S., Kologrivova E.N., Pronina N.A. Cytokine regulation of immune responses in case of rheumatoid arthritis. Citokiny i vospalenie [Cytokines and inflammation]. 2010;9(2):3-6. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=16810823>.
7. Chubenko V.A. Immunotherapy is based on cytokines (IL-1, IL-2, FNO, CSF, IFN). Hum. Reprod. 2016;5:35-41.
8. Yazd A.S., Ghoreschi K. The interleukin-1 family. Adv. Exp. Med. Biol. 2016;941:21-29. DOI:10.1007/978-94-024-0921-5.
9. Kogan E.A., Demura T.A. Molecular and morphological aspects of endometrial receptivity disorders in case of chronic endometritis. Arhiv patologii [Pathology Archive]. 2012;74(3):3-7. (In Russ.).
10. Cicinelli E., Matteo M., Tinelliet R. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. Hum. Reprod. 2015;Feb.30(2):323-353. DOI: 10.1093/humrep/deu292.
11. Zezenketa E., Matteo M., Tinell R. Endometritis kronikoaren prebalentzia behin eta berriro errepikatzen ez den ezartze-akatsen eta terapia antibiotikoaren ondoren PFRK izan duen arrakastatan. Hum. Reprod. 2015;30(2):323-330. DOI: 10.1093 / humrep / deu292
12. Penaloza H.F., Nieto P.A., Munoz-Durango N. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumonia. Immunology. 2015;146(1):100-112. DOI: 10.1111/imm.1248.
13. Fields J.k., Gunther S., Adibidez J. IL-1 Familiako Zitokinaren Seinaleztapena. Mugak Immunologiaren Oinarria. 2019;10:1412.