

УДК 612.017.1:618.145-002-092

Г.Д. Коваль, В.В. Чоп'як, А.М. Камишний

*Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Запорізький державний медичний університет*

РОЛЬ TOLL-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ У РОЗВИТКУ ЕНДОМЕТРІОЗУ Й АСОЦІЙОВАНОГО З НИМ БЕЗПЛІДДЯ

Досліджено експресію мРНК TLR2 і TLR4 в тканині ендометрія та проаналізовані рівні прозапальних цитокінів у перитонеальній рідині у жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям. Показано, що у жінок з ендометріозом і безпліддям в ендометрії спостерігається підвищення експресії мРНК TLR2 і TLR4 з переважанням TLR2, що корелює зі значним підвищенням рівня прозапальних цитокінів у перитонеальній рідині.

Ключові слова: мРНК, toll-подібні рецептори, цитокіни, ендометріоз, безпліддя.

Останніми роками все більшого значення набувають проблеми імунологічної регуляції репродуктивних функцій [1, 2], особливо в контексті погіршення репродуктивного здоров'я, зростання частоти безпліддя та недостатньої ефективності існуючих методів діагностики й підходів до лікування [3, 4]. Вивчення імунологічних аспектів розвитку безпліддя може бути ключем у розумінні патогенезу та покращення діагностики і лікування репродуктивних порушень. Серед причин жіночого безпліддя однією з найчастіших є ендометріоз [5]. Ендометріоз – це захворювання, що характеризується розростанням тканини, морфологічно схожої на ендометрій поза межами порожнини матки [5, 6]. Такий імунологічний парадокс зумовлений деякими вродженими механізмами обмеження імунної відповіді проти антигенів не лише сперми та плода, а й ендометрія [1, 7, 8]. Власне особливостям імунологічної регуляції ендометрія приділяється велика увага як можливим причинам безпліддя. У цьому контексті надзвичайно важливе значення має клітинне та гуморальне оточення «вікна імплантації», і однією з причин безпліддя при ендометріозі вважають цитокіновий дисбаланс, індукований активацією вроджених факторів імунітету. Серед факторів уродженого імунітету важливу роль відіграють патерн-розпізнавальні рецептори (Pattern recognition receptors – PRRs), які розпізнають патоген-асоційовані патерни (patho-

gen-associated molecular patterns – PAMPs) та є медіаторами продукції цитокінів, необхідних для розвитку ефективного імунітету. Серед PRRs особливе місце займають toll-like receptors (TLRs) [9]. TLRs еволюційно розвивались як консервативні вроджені рецептори зі здатністю розпізнавати специфічні мікробні детермінанти. Після реагування з мікробними PAMPs більшість TLRs індукують активацію ядерного фактора NFκB і продукцію цитокінів, переважно по MyD88-залежному шляху [10, 11]. В репродуктивному процесі це має надзвичайне значення і відмічено, що на фетоплацентарному кордоні та трофобласті TLRs експресуються великою кількістю не тільки імунних, але й не імунних клітин [12, 13]. У той же час дослідження показують зв'язок між розладами вагітності та внутрішньоутробними інфекціями [14, 15], а будь-яка інфекція є носієм консервативної молекули (патерна) для розпізнавання TLRs, отже, ці рецептори мають бути залученими в репродуктивний процес. Експериментальні роботи вказують на негативну роль активації TLR4 в розвитку передчасних пологів, викликаних, зокрема, введенням антигенів кишкової палички мишам [16]. Показано, що в клітинах слизової цервікального каналу у вагітних з невиношуванням вагітності інфекційного генезу експресія гена TLR2 зростала в декілька разів у порівнянні з групою здорових вагітних [17]. Тим не менш, між експериментальними і клінічними роботами, які вказу-

© Г.Д. Коваль, В.В. Чоп'як, А.М. Камишний, 2015

ють на роль TLRs у формуванні безпліддя у людини, існує великий розрив. У людському ендометрії виявлено та ідентифіковано мРНК дев'яти типів TLR [18, 19], однак, на відміну від тканини плаценти та нижніх відділів репродуктивного тракту, даних про експресію TLR в ендометрії людини недостатньо, особливо при ендометріозі. Тому вивчення TLRs і їх зв'язків з цитокінами при ендометріозі та викликаному ним безпліддді й зумовило мету даної роботи – визначити експресію мРНК TLR2 та TLR4 в ендометрії жінок з ендометріозом і безпліддям та проаналізувати зв'язок з рівнями прозапальних цитокінів перитонеальної рідини.

Матеріал і методи. Під спостереженням знаходилося 40 жінок репродуктивного віку, які потрапили до клініки з діагнозом безпліддя впродовж не менше двох років. З метою в'яснення природи безпліддя всім пацієнткам були проведені діагностично-лікувальна лапароскопія та гістероскопія. Досліджувану групу склали 20 жінок з безпліддям, асоційованим з ендометріозом; контрольну – 20 жінок з безпліддям трубного генезу внаслідок перенесеного раніше запального процесу. Всі операції проводилися в інтервалі 14–20 днів менструального циклу. Для дослідження мРНК TLR2 та TLR4 використовувався матеріал тканини еутопічного ендометрія, отриманий інтраопераційно під час гістероскопії. Всі дослідження проводилися з інформованої згоди пацієнтів на умовах конфіденційності.

Визначення мРНК TLR2 та TLR4 в тканині ендометрія проводили за допомогою молекулярно-генетичних досліджень. Перед проведенням дослідження здійснювали депарафінізацію, регідратацію в нисхідних концентраціях етанолу та подрібнення матеріалу.

Для виділення тотальної РНК використовували набір Trizol RNA Prep 100 (Ізоген Lab., LTD, Росія), що містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол з рН = 4.0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно з протоколом до набору.

Зворотну транскрипцію та отримання кДНК проводили, використовуючи набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Росія). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої H_2O , очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5X реакційної суміші та

1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотну транскрипцію проводили при 45 °С впродовж 45 хв з наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT впродовж 5 хв при температурі 92 °С. Отриману кДНК відразу використовували в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) в кількості 1–10 мкл або зберігали при температурі -20 °С, а також при -70 °С більш тривалий період.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала забарвлювач SYBR Green, ДНК – полімераза Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального обсягу 25 мкл додаванням деіонізованої H_2O .

Специфічні пари праймерів (5'–3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина). Ампліфікація складалася з 45–50 циклів і проводилася за таких умов: денатурація – 95 °С, 15 с, відпал – 59–61 °С, 30–60 с, елонгація – 72 °С, 30 с. В якості референт-гена для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Відносно нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta Ct$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Результати та їх обговорення. Аналіз експресії мРНК TLR2 та TLR4 показав, що в досліджуваному ендометрії жінок з безпліддям і ендометріозом спостерігалася підвищення експресії обох показників у порівнянні з такими в ендометрії жінок контрольної групи. Експресія мРНК TLR2 в ендометрії жінок з ендометріозом була більшою, ніж в контрольній групі в 16,1 раза. Експресія мРНК TLR4 в ендометрії жінок з ендометріозом перевищувала дані контролю в 4,17 раза. Рівень експресії мРНК TLR2 був вищим за експресію мРНК TLR4 в 3,88 раза.

Відомо, що TLR2 розпізнає, зокрема, такі структури, як мікробні ліпопептиди, пептидо-

глікан грамполозитивних бактерій, зимозан грибів. У свою чергу TLR4 розпізнає ліпополісахарид (LPS), який входить до складу стінки переважно грамнегативних мікроорганізмів [9, 20, 21]. Мікроорганізми з відповідними патернами часто присутні в репродуктивному тракті при бактеріальних дисбіозах, причому частіше знаходяться мікробні агенти, що є лігандами для TLR2. Власне з цієї позиції ми і пояснюємо отримані результати підвищення мРНК TLR2 та TLR4 в ендометрії жінок з ендометріозом з переважанням TLR2. Дана гіпотеза підтверджується результатами мікробіологічного обстеження вагінального вмісту жінок, згідно з якими виявлялися ознаки дисбіозу, а дані цитоморфологічного обстеження епітелію за ПАП-тестом у 87 % вказували на II тип, що демонстрував запальний процес в шийці матки або піхві.

Відомо, що ендометріоз асоціюється з підвищеним прозапальним характером перитонеальної рідини, а активація TLR2 через MyD88-залежний сигнальний шлях призводить до активації транскрипції NF- κ B і синтезу великої кількості прозапальних цитокінів [10, 11]. Так само бактеріальний LPS, який є лігандом TLR4, потенційно стимулює макрофаги до продукції прозапальних цитокінів і факторів росту, таких як HGF, VEGF, IL-6 та TNF- α в черевній порожнині [21]. Це тверд-

ження узгоджується з даними, отриманими нами в попередніх дослідженнях, де було показано достовірне ($p < 0,01$) зростання рівнів прозапальних цитокінів в перитонеальній рідині. Зокрема, рівень IL-2 у жінок з ендометріозом становив ($112,51 \pm 2,54$) пг/мл при показниках контрольної групи ($3,03 \pm 3,07$) пг/мл, демонструючи зростання в 37,13 рази, рівень ФНП- α був відповідно ($17,03 \pm 0,52$) і ($3,17 \pm 0,40$) пг/мл та зростав в 5,37 рази, а рівень ІФН- γ становив ($41,67 \pm 1,38$) та ($20,51 \pm 0,50$) пг/мл у досліджуваній та контрольній групах відповідно, що демонструвало перевищення в 2,03 рази [22, 23]. В цілому, отримані дані узгоджуються з даними відомих сучасних досліджень [24–26]. Вказані механізми прозапальної медіації через уроджені механізми активації TLRs можуть бути причиною безпліддя при ендометріозі, так як відомо, що вагітність і її успішне виношування залежать від ряду умов, серед яких цитокіновий баланс, що може порушуватися внаслідок надлишкової активації TLRs. Дане питання, безумовно, вимагає подальших досліджень.

Таким чином, в ендометрії жінок з ендометріозом спостерігається підвищена експресія мРНК TLR2 і TLR4, що асоціюється зі зростанням рівнів прозапальних цитокінів у перитонеальній рідині та може бути однією з причин безпліддя при ендометріозі.

Література

1. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions / C.R. Wira, J.V. Fahey, C. L. Sentman, et al. // *Immunol Rev.* – 2005. – Vol. 206. – P. 306–335.
2. Charles R. Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens / R. Charles, C.R. Wira, J.V. Fahey // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2014. – Vol. 72, № 2. – P. 236–258.
3. Юзько О.М. Застосування допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні / О.М. Юзько, Т.А. Юзько // *Жіночий лікар.* – 2010. – № 2 (28). – С. 30–34.
4. Дахно Ф.В. Безпліддя в Україні: аналіз ситуації / Ф.В. Дахно // *Здоров'я України.* – 2011. – № 12. – С. 10.
5. Айламазян Э.К. Генитальный эндометриоз / Э.К. Айламазян, В.В. Потин, М.А. Тарасова // *Гинекология от пубертата до постменопаузы.* – М.: Медпресс-информ. – 2007. – № 1. – С. 284–302.
6. Burney R.O. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis / R.O. Burney, L.C. Giudice // *Fertil Steril.* – 2012. – Vol. 98. – P. 511–519.
7. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis / C.M. Kyama, S. Debrock, J.M. Mwenda, et al. // *Reprod Biol. Endocrinol.* – 2003. – № 1. – P. 123.
8. Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review / K. Khoufache, N. Michaud, N. Harir N., et al. // *Minerva Endocrinol.* – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 75–92.
9. Takeda K. Toll-like receptors / K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira // *Annu Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 335–376.
10. Guo S.W. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): an unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? / S.W. Guo // *Gynecol Obstet Invest.* – 2007. – Vol. 63. – P. 71–97.

11. Qian C. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses / C. Qian, X. Cao // *Ann N. Y. Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 1283. – P. 67–74.
12. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta / U. Holmlund, G. Cebers, A.R. Dahlfors, et al. // *Immunology.* – 2002. – Vol. 107, № 1. – P. 145–151.
13. Mitsunari M. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells / M. Mitsunari, S. Yoshida, T. Shoji, et al. // *J. Reprod Immunol.* – 2006. – Vol. 72. – № 1–2. – P. 6–59.
14. Adverse reproductive outcomes in urban women with adenoassociated virus-2 infections in early pregnancy / F. Arechavaleta-Velasco, L. Gomez, Y. Ma, et al. // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23, № 1. – P. 29–36.
15. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus / S. Herath, D.P. Fischer, D. Werling, et al. // *Endocrinology.* – 2006. – Vol. 147. – P. 562–570.
16. Wang H. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4 / H. Wang, E. Hirsch // *Biol. Reprod.* – 2003. – Vol. 69. – № 6. – P. 1957–1963.
17. Роль механізмів вродженого імунітета при невынашивании беременности инфекционного генеза / Л.В. Ганковская, О.В. Макаров, Л.В. Ковальчук и др. // *Аллергология и иммунология.* – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 311.
18. Evidence for the presence of Toll-like receptor 4 system in the human endometrium / T. Hirata, Y. Osuga, Y. Hirota, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90. – P. 548–556.
19. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract / P.A. Pioli, E. Amiel, T.M. Schaefer, et al. // *Infect. Immunol.* – 2004. – Vol. 72. – P. 5799–5806.
20. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components / O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, et al. // *Immunity.* – 1999. – Vol. 11. – P. 443–451.
21. Rashidi N. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-mediated pro-inflammatory cytokine production and modulation of TLR2, TLR4 and MyD88 expression in human endometrial cells / N. Rashidi, M. Mirahmadian, M. Jeddi-Tehrani, et al. // *J. Reprod. Infertil.* – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 72–81.
22. Коваль Г.Д. Локальна продукція прозапальних цитокінів у жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям / Г.Д. Коваль // *Імунологія та алергологія. Наука і практика.* – 2012. – № 4. – С. 28–31.
23. Коваль Г.Д. Порівняльна характеристика системної та локальної концентрації прозапальних цитокінів у жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям / Г.Д. Коваль // *Імунологія та алергологія. Наука і практика.* – 2012. – № 3. – С. 22–25.
24. Toll-like receptor system and endometriosis / K.N. Khan, M. Kitajima, A. Fujishita, et al. // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2013. – Vol. 39, № 8. – P. 1281–1292.
25. Molecular pathogenesis of endometriosis; Toll-like receptor-4 A896G (D299G) polymorphism: a novel explanation. / M. Latha, S. Vaidya, S. Movva, et al. // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2011. – Vol. 15, № 3. – P. 181–184.
26. Increased expression of pattern recognition receptors and nitric oxide synthase in patients with endometriosis / Seung Geun Yeo, Won Yong Sung, Lee Ho Yun, et al. // *Int. J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 10, № 9. – P. 1199–1208.

Г.Д. Коваль, В.В. Чопяк, А.М. Камышный

РОЛЬ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ЭНДОМЕТРИОЗА И АССОЦИИРОВАННОГО С НИМ БЕСПЛОДИЯ

Исследована экспрессия мРНК TLR2 и TLR4 в ткани эндометрия и проанализированы уровни провоспалительных цитокинов в перитонеальной жидкости у женщин с эндометриозом, ассоциированным с бесплодием. Показано, что у женщин с эндометриозом и бесплодием в эндометрии наблюдается повышение экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 с преобладанием TLR2, что коррелирует со значительным повышением уровня провоспалительных цитокинов в перитонеальной жидкости.

Ключевые слова: мРНК, toll-подобные рецепторы, цитокины, эндометриоз, бесплодие.

H.D. Koval, V.V. Chopyak, A.M. Kamyshnyi

**ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE DEVELOPMENT OF ENDOMETRIOSIS
AND ENDOMETRIOSIS-ASSOCIATED INFERTILITY**

The expression of mRNA TLR2 and TLR4 in the tissue of endometrium was studied in the present investigation and the contents of proinflammatory cytokines in peritoneal fluid of women with endometriosis, associated with infertility, were analysed. The increased endometrial expression of mRNA TLR2 and TLR4 with the prevalence of TLR2, correlating with the significant elevation of proinflammatory cytokines contents in peritoneal fluid were shown in women with endometriosis and infertility.

Key words: *mRNA, toll-like receptors, cytokines, endometriosis, infertility.*

Поступила 16.05.15