# ЗНАЧЕННЯ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ ЯК МОЖЛИВИХ ФАКТОРІВ РОЗВИТКУ ЕНДОМЕТРІОЗУ ТА АСОЦІЙОВАНОГО З НИМ БЕЗПЛІДДЯ

*Г.Д. Коваль, О.М. Юзько*
*Буковинський державний медичний університет*

**Резюме**
Толл-подібні рецептори (TLRs) відіграють важливу роль у вроджених імунологічних механізмах, ініціюють імунну відповідь на патогени, які наявні в ендометрії та можуть впливати на патогенез ендометріозу, що асоційований із безпліддям. У роботі висвітлено результати досліджень експресії мРНК TLR2 і TLR4 й показано, що в жінок з ендометріозом і безпліддям спостерігається підвищення експресії мРНК TLR2 і TLR4 в ендометрії з переважанням TLR2, що корелює зі значним підвищенням рівнів прозапальних цитокінів у перитонеальній рідині.

**Ключові слова**
Толл-подібні рецептори, мРНК, цитокіни, ендометріоз, безпліддя.

Погіршення репродуктивного здоров'я та зростання частоти безпліддя, що спостерігаються останніми роками, є проблемою більшості розвинених країн. У цьому контексті особливої актуальності набувають нові підходи до вивчення та розуміння патогенетичних механізмів формування захворювань, асоційованих із безпліддям, як можливих мішеней для профілактики й терапевтичного втручання [1, 2]. Як провідні чинники, що беруть участь у розвитку патології жіночої репродуктивної сфери, предметом уваги науковців у світі стали вроджені та набуті імунологічні фактори регуляції репродуктивних функцій [3, 4]. Вивчення імунологічних аспектів розвитку безпліддя може бути ключем у розумінні патогенезу та покращання діагностики й лікування репродуктивних порушень. Серед причин жіночого безпліддя однією з найчастіших є ендометріоз [5, 6]. Ендометріоз — захворювання, що характеризується розростанням тканини, морфологічно й функціонально схожої на ендометрій, поза межами порожнини матки [5, 6]. Етіологія та патогенез ендометріозу достеменно не з'ясовані, а з імунологічної точку зору ендометріоз називають «хворобою-загадкою», адже за своєю суттю — це імунологічний парадокс з ознаками автотрансплантату, метастазування та, безумовно, запального процесу [7, 8]. Такий імунологічний парадокс зумовлений деякими вродженими механізмами обмеження імунної відповіді проти антигенів не лише сперми й плода, а й ендометрія [1, 2]. Зокрема, відомо, що ендометріоїдні вогнища «ховаються» від імунного нагляду різними шляхами, у тому числі й шляхом експресії некласичних молекул головного комплексу

© Г.Д. Коваль, О.М. Юзько



БЕЗКОШТОВНА on-line передплата с. 72

гістосумісності (ГКГ), що обмежує можливість ефективної елімінації ектопій імунною системою [7, 9]. Власне, такі особливості імунологічної регуляції ендометрія розглядаються як можливі причини безпліддя при ендометріозі. Адже, як відомо, у нормі імунна система репродуктивного тракту є високоспеціалізованою системою, яка, як частина контролюючих і комунікативних механізмів, перебуває в тісній взаємодії з тканинами репродуктивного тракту й функціонально представлена у нормальному ендометрії. Крім того, імунні клітини відіграють важливу роль на всіх етапах репродуктивного процесу, у тому числі й у процесах імплантації, як необхідні елементи для самої можливості запліднення та настання вагітності [9, 10]. Взаємодія імунних факторів при ендометріозі, асоційованому з безпліддям, є надзвичайно «тонкою грою», адже імунна система вимушена точно обирати між необхідністю агресії щодо мільйонів чужорідних антигенів, які потрапляють у нижні відділи репродуктивного тракту, і толерантністю щодо алоантигенів сперми та плода у верхніх відділах репродуктивного тракту, захищаючи вагітність. Власне, ці аспекти патогенезу безпліддя при ендометріозі й були фокусом уваги науковців упродовж останніх десятиліть. І більшість дискусій точилися навколо понять «толерантності» — «агресивності» імунної системи при ендометріозі. Однак погляди змінилися з моменту вивчення імунного клітинного й гуморального оточення «вікна імплантації». Так, однією з причин безпліддя при ендометріозі почали вважати цитокіновий дисбаланс, індукований активацією вроджених факторів імунітету [3, 4, 10]. Фактори вродженого імунітету є філогенетично найстарішими серед усіх імунологічних механізмів і в більшості випадків функціонують за принципом розпізнання консервативних молекул чужорідних речовин. Таким чином, фокус наукової уваги змістився на можливу роль інфекційних чинників як можливих етіопатогенетичних факторів у розвитку багатьох захворювань репродуктивної сфери, у тому числі й ендометріозу.

Важливу роль серед факторів уродженого імунітету відіграють паттерн-розпізнавальні рецептори — Pattern recognition receptors (PRRs). PRRs розпізнають патоген-асоційовані паттерни (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs) із наступною передачею інформації про патоген імунним клітинам, запуском адаптивного імунітету та медіацією продукції цитокінів, необхідних для розвитку ефективного імунітету. Серед PRRs особливе місце займають Toll-like receptors (TLRs) [11]. TLRs як основні представники PRRs розвивались еволюційно і є консервативно вродженими рецепторами зі здатністю розпізнавати специфічні мікробні детермінанти. Після реакції з мікробними PAMPs більшість TLRs індукують активацію ядерного фактора NFκB і продукцію цитокінів переважно по MyD88-залежному шляху [10, 11, 12]. У той же час відомо, що при ендометріозі спостерігається високий рівень прозапальних цитокінів, однак причини цього підвищення точно не визначені. Також відмічено й те, що на фетоплацентарному кордоні й трофобласті TLRs експресуються великою кількістю не тільки імунних, але й неімунних клітин [13, 14], що вказує на важливу роль TLRs у репродуктивному процесі. Зокрема, в людському ендометрії виявлено й ідентифіковано мРНК дев'яти типів TLRs, однак, на відміну від тканини плаценти та нижніх відділів репродуктивного тракту, даних про експресію TLRs в ендометрії людини недостатньо, особливо при ендометріозі [18, 19]. У той же час максимальна концентрація експресії TLRs виявляється на специфічних антигенпрезентуючих клітинах (тобто на макрофагах), а, як відомо, макрофаги становлять левову частку усіх клітин перитонеальної рідини при ендометріозі. Таким чином, вимальовується патогенетична вісь: збільшення кількості імунних клітин (переважно макрофагів) із високою експресією TLRs в оточенні вогнищ ендометріозу й активація TLRs (можливо, інфекційними патогенами), що призводить до продукції великої кількості цитокінів і розладів репродукції.

Гіпотезу про роль активації TLRs у розладах репродуктивної функції підтверджують наукові дослідження, які вказують на зв'язок між розладами вагітності та внутрішньоутробними інфекціями [15]. Як відомо, будь-яка інфекція є носієм консервативної молекули (паттерну) для розпізнавання TLR. Отже, ці рецептори мають бути залученими в репродуктивний процес. Зокрема, експериментальні роботи демонструють негативну роль активації TLR4 в розвитку передчасних пологів, викликаних уведенням антигенів кишкової палички мишам [17]. Показано, що в клітинах слизової цервікального каналу у вагітних із невиношуванням інфекційного генезу експресія гена TLR2 зростала в декілька разів порівняно з групою здорових вагітних [18]. Проте між експериментальними й клінічними роботами, які вказують на роль TLRs у формуванні безпліддя в людини, простежується великий розрив. Що ж стосується їх ролі при ендометріозі — наявна дуже мала кількість робіт. Однак є роботи, які чітко демонструють вплив активації TLRs на розростання екндометріоїдних ектопій. Так, зокрема, показано, що блокування TLRs антиTLRs моноклональними антитілами сприяє зменшенню розмірів ендометріозних вогнищ [19]. Такі роботи обнадіюють.

**Мета дослідження** — визначити експресію мРНК TLR2 і TLR4 в ендометрії жінок з ендометріозом і безпліддям і проаналізувати зв'язок із рівнями прозапальних цитокінів перитонеальної рідини.

## Матеріали та методи

Під спостереженням перебувало 40 жінок репродуктивного віку, які надійшли в клініку з діагнозом безпліддя (впродовж не менше 2 років). Із метою з'ясування природи безпліддя всім пацієнткам були проведені діагностично-лікувальна лапароскопія та гістероскопія. Досліджувану групу становили 20 жінок із безпліддям, яке асоціювалось з ендометріозом. Контрольну групу становили 20 жінок із безпліддям трубного генезу внаслідок перенесеного раніше запального процесу. Для дослідження мРНК TLR2 і TLR4 використовувався матеріал тканини еутопічного ендометрія, отриманий інтраопераційно під час гістероскопії в першу фазу менструального циклу. Усі дослідження проводилися з інформованої згоди пацієнтів на умовах конфіденційності.

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

Для виділення тотальної РНК використовували набір Trizol RNA Prep 100 (Ізоген Lab., LTD, Росія), який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол із pH=4,0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно до протоколу.

Зворотну транскрипцію та отримання кДНК проводили, використовуючи набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Росія). Реакційна суміш загальним обсягом 25 мкл містила: 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої $H_2O$, очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х-реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотну транскрипцію проводили при 45 °С упродовж 45 хвилин із наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT упродовж 5 хв за температури 92 °С. Отриману кДНК негайно використовували в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) у кількості 1-10 мкл або зберігали за температури -20 °С, а також при -70 °С триваліший 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 барвник SYBR Green, ДНК-полімеразу Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого й зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального обсягу 25 мкл шляхом додавання 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), виготовлені фірмою Metabion (Німеччина). Ампліфікація складалася з 45-50 циклів і проводилася за таких умов: денатурація — 95 °С, 15 сек, віджиг — 59-61 °С, 30-60 сек, елонгація — 72 °С, 30 сек. Як референт-ген для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом ΔΔCt. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager ™ (Bio-Rad, США).

## Результати та їх обговорення

При проведенні аналізу експресії мРНК TLR2 та TLR4 показано, що в досліджуваному ендометрії жінок із безпліддям та ендометріозом спостерігалося підвищення експресії обох показників порівняно з такими ж показниками в ендометрії жінок контрольної групи. Експресія мРНК TLR2 в досліджуваному ендометрії жінок з ендометріозом була більшою, ніж у контрольній групі в 16,1 раза. Експресія мРНК TLR4 в ендометрії жінок з ендометроізом перевищувала дані контролю в 4,17 раза. Рівень експресії мРНК TLR2 був вищим за експресію мРНК TLR4 в 3,88 рази (табл.).

Відомо й те, що TLR2 розпізнає, зокрема, такі структури, як мікробні ліпопептиди, пептидоглікан грампозитивних бактерій, зимозан грибів. У свою чергу, TLR4 розпізнає ліпополісахарид (LPS), який входить до складу стінки переважно грамнегативних мікроорганізмів [11, 20, 21]. Мікроорганізми з відповідними паттернами часто спостерігаються в репродуктивному тракті при бактеріальних дисбіозах, причому частіше виявляються мікробні агенти, що є лігандами для TLR2. Власне, з цієї позиції ми й пояснюємо отримані результати підвищення мРНК TLR2 і TLR4 в ендометрії жінок з ендометріозом із переважанням TLR2. Ця гіпотеза підтверджується результатами мікробіологічного обстеження вагінального вмісту жінок, згідно з якими виявлялися ознаки дисбіозу, а дані цитоморфологічного об-

**Таблиця**

Експресія мРНК TLR2 і мРНК TLR4 в ендометрії жінок з ендометріозом, що асоційований із безпліддям

| Групи | мРНК TLR2 | мРНК TLR4 | p |
|---|---|---|---|
| Досліджувана | 16,18±2,72 | 4,17±0,75 | p<0,05 |
| Контрольна | 1±0,13 | 1±0,15 | p<0,05 |

*Примітка. Відносна нормалізована кількість кДНК гена TLR2 та TLR4. Нормалізація за методом ΔΔCt з референс-геном GAPDH. p<0,05 відображає достовірну відмінність.*



БЕЗКОШТОВНА on-line передплата с. 72

стеження епітелію за ПАП-тестом у 87% вказували на II тип — запальний процес у 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-kB 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, 22, 23]. Це твердження узгоджується з даними, отриманими нами в попередніх дослідженнях, де було показано достовірне ($p<0,01$) зростання рівнів прозапальних цитокінів у перитонеальній рідині. Зокрема, рівень ІЛ-2 в жінок з ендометріозом становив $112,51\pm2,54$ пг/мл при показниках контрольної групи $3,03\pm3,07$ пг/мл, демонструючи зростання в 37,13 раза, рівень ФНП-α був $17,03\pm0,52$ пг/мл і $3,17\pm0,40$ пг/мл відповідно і зростав у 5,37 раз, а рівень ІФН-γ становив $41,67\pm1,38$ пг/мл і $20,51\pm0,50$ пг/мл у досліджуваній і контрольній групах відповідно, що демонструвало перевищення у 2,03 рази [24, 25]. У цілому отримані дані узгоджуються з відомими сучасними дослідженнями [24, 25, 26]. Вищевказані механізми прозапальної медіації через вроджені механізми активації TLRs можуть бути причиною безпліддя при ендометріозі, оскільки відомо, що вагітність та її успішне виношування залежать від цілої низки умов, серед яких, цитокіновий баланс, що може порушуватися внаслідок надлишкової активації TLRs.

## Висновки

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

Висвітлені в статті питання вимагають подальших досліджень. Однак на цьому етапі в практичній роботі слід приділяти увагу діагностиці та лікуванню будь-яких дисбіотичних проявів — індукторів активації TLRs і запуску каскаду прозапальних імунних реакцій як можливих чинників підтримання ендометріоїдного росту та асоційованого з ним безпліддя.

*Надійшла до редакції 11.05.2015 р.*

## Список використаної літератури


1. Юзько О.М. Застосування допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні / О.М. Юзько, Т.А. Юзько // Жін. лікар. — 2010. — № 2 (28). — С. 30-34.
2. Дахно Ф.В. Безпліддя в Україні: аналіз ситуації / Ф.В. Дахно // Здоров'я України. — 2011. — № 12. — С. 10.
3. Wira C.R. 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.
4. 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.
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. Ozkan S., Murk W., Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments [Електронний ресурс] / S. Ozkan, W. Murk, A. Arici // Annals of the New York Academy of Sciences. — 2008. — Режим доступу: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1196/annals.1434.007/pdf
7. Burney R.O., Giudice L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis / R.O. Burney, L.C. Giudice // Fertil Steril. — 2012. — Vol. 98. — P. 511-519.
8. Kyama C.M. 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.
9. Khoufache K., Michaud N., Harir N. et al. 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.
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. Takeda K. Toll-like receptors / K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira // Annu. Rev. Immunol. — 2003. — Vol. 21. — P. 335-376.
12. 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.
13. Holmlund U. 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. 145-51.
14. 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. 46-59.
15. Arechavaleta-Velasco F. 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.
16. Herath S., Fischer D.P., Werling D. et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus // Endocrinology. — 2006. — Vol. 147. — P. 562-570.
17. 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. 1957-63.
18. Ганковская Л.В. Роль механизмов врожденного иммунитета при невынашивании беременности инфекционного генеза / Л.В. Ганковская, О.В. Макаров, Л.В. Ковальчук, И.В. Бахарева и др. // Аллергология и иммунология. — 2007. — № 1, Т. 8. — С. 311.

19. Khan K.N. 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.
20. Pioli P.A. 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 Immun. — 2004. — Vol. 72. — P. 5799-5806.
21. Hirata T. 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.
22. Takeuchi O. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and grampositive bacterial cell wall components / O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai et al. // Immunity. — 1999. — Vol. 11. — P. 443-451.
23. 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.
24. Коваль Г.Д. Локальна продукція прозапальних цитокінів у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям / Г.Д. Коваль // Імунологія та алергологія. Наука і практика. — 2012. — № 4. — С. 28-31.
25. Коваль Г.Д. Порівняльна характеристика системної та локальної концентрації прозапальних цитокінів у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям / Г.Д. Коваль // Імунологія та алергологія. Наука і практика. — 2012. — № 3. — С. 22-25.
26. Latha M. 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.
27. Seung Geun Yeo. Increased Expression of Pattern Recognition Receptors and Nitric Oxide Synthase in Patients with Endometriosis / Seung Geun, Won Yong Sung, Lee Ho Yun et al. // Int J Med Sci. — 2013. — Vol.10, № 9. — P. 1199-1208.

## The role of toll-like receptors as the possible factors in the development of endometriosis and endometriosis-associated infertility

*H.D. Koval, O.M. Yuzko*

**Summary**

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in innate immune mechanisms. They initiate the immune response to pathogens presented in the endometrium and can play a role in the pathogenesis associated with infertility. The expression of mRNA TLR2 and TLR4 in the tissue of endometrium was studied in the present investigation and 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.

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



БЕЗКОШТОВНА on-line передплата с. 72