

© Коваль Г.Д., 2018
УДК 577.218:612.112]:618.145-002-097:618.177

ДИСБАЛАНС ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ РЕГУЛЯЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ Т-КЛІТИН В ЕУТОПІЧНОМУ ЕНДОМЕТРІЇ ЖІНОК, ХВОРИХ НА ЕНДОМЕТРІОЗ

Г.Д. КОВАЛЬ

Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці)

Вступ. Ендометріоз - це захворювання, що характеризується доброякісним розростанням тканини, за морфологічними та функціональними характеристиками подібної до ендометрія, поза межами порожнини матки на тлі гормональних порушень та генетичної схильності [1]. У загальній популяції жінок захворюваність на ендометріоз сягає близько 10% [1, 2, 3]. Частота первинного та вторинного жіночого безпліддя при ендометріозі, за даними різних авторів, коливається від 40 до 80% [4, 5, 6, 7]. Встановлено, що 30–40% хворих на ендометріоз страждають на безпліддя, і біля 30% – на невиношування вагітності [5, 6].

Висока частота захворювання та асоціація з безпліддям, робить проблему його вивчення, діагностики та лікування надзвичайно актуальною. Не дивлячись на велику кількість робіт, присвячених цій проблемі, етіологія та патогенез ендометріозу є достеменно нез'ясованими, залишаючись в багатьох аспектах на рівні теорій [8, 9]. У цьому контексті ендометріоз називають «хворобою-загадкою» [10]. Однак, враховуючи те, що захворювання по своїй суті є доброякісною ектопією, зрозуміло, що в патогенезі ендометріозу чільне місце відводиться імунному дисбалансу, адже основною задачею імунної системи є підтримка гомеостазу, в тому числі, й шляхом контролю різноманітних ектопічних розростань [8, 9, 10, 11].

На нашу думку, важливим питанням вивчення патогенезу ендометріозу є розуміння парадигми Th1/Th2 клітин, що дасть не тільки краще уявлення про патогенез, а й можливість проводити відповідну адекватну терапію. Доказами порушень співвідношення Th1/Th2 клітин є дуже багато робіт, які демонструють зміни балансу цитокінів Th1/Th2 у хворих на ендометріоз. Зокрема, встановлено, що при ендометріозі в перитонеальній рідині зростає кількість типових Th1 цитокінів - INF- та IL-2 [12], рівень TNF- корелює зі стадією ендометріозу [11, 12], введення рекомбінантного людського TNF-інгібітора знижує розміри ектопій [13], а IL-12 знижує експериментальний ендометріоз у щурів [14] та в природніх умовах [15]. З іншого боку, є роботи, які вказують на посилення проліферації стро-

мальних клітин ендометрія під дією типового Th2 цитокіну - IL-4 та зниженню ендометріюїдних розростань під впливом анти IL-4 МКАТ [16]. Деякі дослідники публікують, що ендометріоз має асоціації та ознаки аутоімунного захворювання, пов'язуючи це з переважанням Th2 [17]. Таким чином, розвиток ендометріозу супроводжується порушенням цитокінів обох типів хелперів і чи являється ендометріоз типовим Th1- чи Th2-опосередкованим захворюванням достеменно не зрозуміло.

У даний час добре вивчено щонайменше чотири субпопуляції CD4+ Т-клітин: Т-хелпери 1 типу (Th1), Т-хелпери 2 типу (Th1), Т-хелпери 17 (Th17) в поєднанні з регуляторними Т-клітинами CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) [18, 19, 20]. Зокрема, не так давно ідентифіковані прозапальні Th17, які виділяють високий рівень IL-17A, IL-17F, IL-6 та TNF- цитокінів [21]. На відміну від підходів до ідентифікації Т-хелперів на основі їх здатності до продукції певних цитокінів, що визначає їх функції, на сьогодні підходи полягають у визначенні ряду молекулярних механізмів диференціювання Т-клітин [18, 19, 20, 22]. Молекулярні механізми, за допомогою яких антигенна стимуляція Т-клітинного рецептора та сигналів, отриманих від костимуляторних молекул призводить до диференціювання наївних попередників Т-клітин у напрямку Th1 або Th2 були в центрі інтенсивних досліджень в останні роки. Стало відомим, що клональна експансія та диференціювання наївних Т-клітин являє собою складний процес, який регулюється взаємодією мережі транскрипційних факторів (ТФ) та активаторів транскрипції - signal transducers in the cytoplasm and activators of transcription (STAT) [23, 24]. Для диференціювання кожного підтипу клітин необхідні свої ТФ та STAT, які можуть взаємно посилювати чи пригнічувати диференціацію певних підтипів хелперів. Зокрема, для диференціювання Th1 потрібні транскрипційний фактор Т-клітин сімейства T-box (T-box expressed in T cells, (T-bet)), STAT-1 та iSTAT-4. Для диференціювання Th2 потрібні транскрипційний фактор активації Т-лімфоцитів (Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3 (GATA-3)) та iSTAT-5, для диференціювання Th17 потрібні RORgt та STAT-3 та для диферен-

ціювання pTreg та iTreg клітин необхідні Foxp3 (Forkhead box protein P3) і STAT-5 [18, 22, 23, 26, 27, 28, 29]. У координації повної транскрипційної програми, окрім вищенаведених факторів, беруть участь й інші транскрипційні регулятори, а диференціювання Т-клітин характеризується значним ступенем гнучкості та пластичності, що показано як *in vitro* так і *in vivo* [18, 22, 23, 30, 31]. Відмічено, що співвідношення T-bet/ GATA-3 більш об'єктивно відображають Th1 / Th2 диференціацію, ніж лише визначення рівнів відповідних цитокінів [32, 33]. Показано, що залишок або дисбаланс між Th1 / Th2 і Th17 / Treg відіграє важливу роль у ряді фізіологічних і патологічних станів, таких як алергічні, аутоімунні, гематологічні захворювання та ряд пухлин [34, 35]. Логічно, що у розвитку ендометріозу та у процесах репродукції баланс Th1/ Th2/ Th17/ Treg також відіграє важливу роль [36, 37]. Однак, робіт присвячених проблемі транскрипційних факторів при ендометріозі дуже мало, що до кінця не відкриває дане питання, що й зумовило мету даної роботи [38]. На нашу думку, тканина еутопічного ендометрія представляє собою свого роду «попередника» ектопічних розростань – власне ендометріозу, що й зумовило логіку досліджень власне в тканині еутопічного ендометрія.

Мета дослідження: визначити особливості експресії генів транскрипційних факторів регуляції диференціювання Th1 і Th2 (T-bet GATA-3) та гена транскрипційного фактора регуляції диференціювання Treg клітин Foxp3 у тканині ендометрія жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям.

Матеріал і методи. Протокол дослідження відповідав вимогам до біомедичних досліджень та затверджувався комітетом по біоетиці Буковинського державного медичного університету, а також локальним етичним комітетом Центру лікування безпліддя (м. Чернівці), в якому проходили лікування пацієнтки. Всі дослідження проводились з інформованої згоди пацієнток та в умовах конфіденційності.

Матеріал

Досліджуваними зразками була тканина еутопічного ендометрія, залитого в парафінові блоки. Досліджувані зразки ендометрія отримували від жінок з ендометріозом (n=20), а контрольні - від жінок з безпліддям трубного генезу (n=20). Тканина ендометрія забиралась у проліферативну фазу менструального циклу, інтраопераційно під час гістероскопії. Перед дослідженням зразки тканини ендометрія подрібнювали та гомогенізували за допомогою ступки та пестика, після чого депарафінували в ксилолі та проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%).

Методи визначення мРНК

Визначення мРНК проводилось за допомогою молекулярно-генетичних досліджень. Для виділення тотальної РНК використовували набір „Trizol RNA Prep 100 (Ізоген Lab., LTD), який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол з pH = 4.0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно протоколу до набору. Протокол виділення включав етапи відповідно до інструкції.

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 – полімераза Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загально-го обсягу 25 мкл додаванням деіонізованої H₂O.

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) (див. табл. 1).

Таблиця 1

Специфічні пари праймерів для визначення мРНК Foxp3, T-box 21 (T-bet), GATA-3

Gene	Primer	Temperature melting (°C)	Product length (bp)	Exon junction
FOXP3	F: 5'-TCTGCACCTTCCCAAATCCC-3'	59.96	48	730/731
	R: 5'-AAAGGGTGCTGTCCCTCCTG-3'	59.89		
T-box 21 (T-bet)	F: 5'-CCGTGACTGCCTACCAGAAT-3'	59.46	40	1138/1139
	R: 5'-TTCAGCTGAGTAATCTCGGCA-3'	59.18		
GATA-3	F: 5'-GATGCAAGTCCAGGCCCAA-3'	60.3	51	1335/1336
	R: 5'-CACACTCCCTGCCTTCTGTG-3'	60.6		

Спочатку проводилася початкова денатурація протягом 10 хв. при 95°C, після чого проводилася ампліфікація, яка складалася з 45-50 циклів. Ампліфікація проводилася за таких умов: денатурація - 95°C, 15 сек., отжиг – 59-61°C, 30-60 сек., елонгація - 72°C, 30 сек. В якості референс-гену 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 $^{\circ}C_t$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Результати експресії мРНК Foxp3, T-bet, GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом асоційованим з безпліддям у порівнянні з контрольною групою представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Відносна нормалізована кількість кДНК генів Foxp3, T-bet, GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом та безпліддям

№п/п	Групи хворих	мРНК транскрипційних факторів		
		T-bet	GATA-3	Foxp3
1	Жінки з ендометріозом асоційованим з безпліддям (n=20)	3,76 ± 0,54	2,86 ± 0,39	0,35 ± 0,01
2	Контрольна група (n=20)	1,00 ± 0,11	1,01 ± 0,10	1,00 ± 0,12
P		p<0,01	p<0,01	p<0,01

Примітка: p<0,01 – є достовірною відмінністю. Нормалізація за методом C_t з референс-геном GAPDH.

Як видно з табл. 2, отримані дані вказують на зміну експресії всіх досліджуваних транскрипційних факторів в ендометрії жінок з ендометріозом асоційованим з безпліддям у порівнянні з контрольною групою. Зокрема, рівень експресії мРНК T-bet зріс у 3,76 рази (p<0,01) порівняно з контролем, що опосередковано можна прирівняти до підвищення T-хелперів 1-го типу в тканині еутопічного ендометрія жінок з ендометріозом. Як відомо з даних літератури, диференціації наївних T-клітин в Th1 сприяють два основних сигнальні шляхи - один за участю IL-12 / STAT4 та другий за участю IFN- γ / STAT1 / T-bet [39, 40, 41, 42]. Це узгоджується з відомими роботами, які вказують на підвищення рівнів IL-12 та IFN- γ у перитонеальній рідині у хворих на ендометріоз [43]. Також є роботи, що вказують на те, що присутність IL-12 призводить до підвищеної експресії транскрипційного фактора T-bet [24]. (Це твердження також узгоджується й з отриманими нами в попередніх дослідженнях підвищених рівнів IL-12 в перитонеальній рідині у обстежених пацієнток [44]). Підвищення мРНК T-bet в ендометрії супроводжуються підвищенням рівнів цитокінів притаманних Th1 (IL-2, INF- γ , TNF- α) в перитонеальній рідині, про що є дані в літературі та підтверджується результатами обстежених хворих (результати отримані нами в попередніх дослідженнях у цих самих пацієнток вказували на достовірне (p<0,01) зростання рівнів IL-2, INF- γ , TNF- α , а також IL-12 в перитонеальній рідині [44]). Підвищення рівня експресії мРНК T-bet в ендометрії жінок з ендометріозом також можна пояснити необхідністю активації Th1 з метою знищення ендометріодних ектопій та розвитком гіперчутливості сповільненого типу по відношенню до ектопій як трансплантата.

Рівень експресії мРНК GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом також був вищим у порівнянні з контролем, а саме – у 2,86 рази. Ці дані також узгоджуються з відомими роботами, які вказують на підвищення рівнів цитокінів, що продукуються Th2 [16]. (Нами у попередніх дослідженнях у даних пацієнток отримані результати достовірно знижених рівнів IL-4 (p<0,05) та достовірно підвищених рівнів IL-6 (p<0,01) в перитонеальній рідині). У дослідженнях Chen et. al. 2012, отримано результати більш низьких рівнів мРНК T-bet ніж мРНК GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом [38]. Однак, у нашому дослідженні результати вказують на нижчий рівень експресії транскрипційних факторів GATA-3 ніж T-bet при зростанні рівнів мРНК обох ТФ (p<0,01). Співвідношення T-bet до GATA-3 згідно отриманих даних становило 1,31. Звісно, наші дослідження проведені на невеликій вибірці і не дозволяють зробити кінцевих висновків, а лише визначити тенденцію.

На основі проведеного дослідження, встановлено, що експресія мРНК Foxp3 в ендометрії безплідних жінок з ендометріозом була достовірно зниженою в порівнянні з показниками контрольної групи. На нашу думку, зниження експресії мРНК Foxp3 є виразом недостатності функції регуляторних T-лімфоцитів. Це,

в свою чергу, може підтримувати імунологічну толерантність по відношенню до ендометріодних ектопій та сприяти їх росту поза межами фізіологічної локалізації. Наші дані узгоджуються з відомими дослідженнями, де, зокрема, показано наявність поліморфізму гаплотипів FoxP3, пов'язаних з ендометріозом [45]. Однак є роботи, що вказують на підвищення мРНК FoxP3 в ендометрії жінок з ендометріозом, проте названі дослідження проводились за інших умов (в передімплантаційну фазу) [46]. З іншого боку, сприйнятливості ендометрія до імплантації вимагає адекватної імунологічної толерантності для захисту ембріона від імунного відторгнення з боку материнської імунної відповіді, що може грати негативну роль у можливості завагітніти для жінок з ендометріозом [46, 47, 48]. Зокрема, є роботи, де показано, що експресія мРНК FoxP3 в ендометрії жінок з безпліддям невиясненого генезу у двічі нижча, ніж у здорових жінок, що чітко вказує на роль Т-регуляторних лімфоцитів у розвитку безпліддя [49, 50].

ВИСНОВКИ.

1. Ендометріоз асоційований з безпліддям супроводжується підвищенням експресії мРНК T-bet та GATA-3 з переважанням експресії T-bet в тканині ендометрія.
2. У тканині еутопічного ендометрія жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям спостерігається зниження експресії мРНК Foxp3, що може відігравати роль як у розвитку самого ендометріозу, так і асоційованого з ним безпліддя.

Отримані дані зумовлюють необхідність подальших досліджень ролі Т-лімфоцитів в патогенезі ендометріозу та спричиненого ним безпліддя в контексті їх взаємодії з іншими імунними факторами та з перспективою вирішення питань діагностичного використання та терапевтичного впливу.

Робота виконана в Буковинському державному медичному університеті на клінічній базі Центру лікування безпліддя. ПЛР тканини ендометрія проводилась в молекулярно-генетичній лабораторії Запорізького державного медичного університету.

Конфлікт інтересів: немає.

Подяки: просимо щиро подяку ректору Буковинського державного медичного університету, професору Тарасу Миколайовичу Бойчуку за підтримку і сприяння у виконанні даної роботи, професору Олександрі Михайловичі Юзьку та директору Центру лікування безпліддя, доценту Тамарі Анатоліївні Юзько за допомогу в підборі і дослідженні пацієнтів на базі Центру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баскаков В. П. Эндометриодная болезнь / Баскаков В. П., Цвелев Ю. В., Кира Е. Ф. // СПб. - 2002. - 452 с. (Baskakov V. P. Endometrioid disease /Baskakov V. P., Cvelev Ju. V., Kira E. F.// SPb. - 2002. - 452 p.).
2. Cramer D.W. The epidemiology of endometriosis [Електронний ресурс] / D. W. Cramer, S.A. Missmer // Annals of the New York Academy of Sciences. - 2002. - P. 955. - Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02761.x/pdf>
3. Mcleod B.S. Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors / B.S. Mcleod, M.G. Retzloff // Clin. Obstet. Gynecol. - 2010. - Vol. 53. - P. 39 - 396.
4. Айламазян Э.К. Гинекология от пубертата до постменопаузы / Э.К. Айламазян // Практик. Рук. - М.: Медпресс. - 2007. - 495 с.
5. Allaire C. Endometriosis and infertility: a review/ C. Allaire // J. Reprod. Med. - 2006. - Vol. 51, №3. - P. 164-168.
6. Реабілітація репродуктивної функції жінок із безпліддям при ендометріозі після лапароскопічних операцій / Юзько О.М., Приймак С.Г., Приймак І.А., Бегаль Л.В. // Шпитальна хірургія. - 2005. - № 2. - С. 94-98.
7. Савицкий Г.А. Перитонеальный эндометриоз и бесплодие (клинико-морфологические исследования) / Г.А.Савицкий, С.М. Горбушин // СПб. ЭЛБИС СПб. - 2002. - 170 с.
8. Burney R.O. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis / R.O.Burney, L.C. Giudice // Fertil Steril. - 2012. - Vol. 98. - P. 511-519.
9. Vinatier D. Theories of endometriosis / D. Vinatier, G. Orazi, M. Cosson, P. Dufour // European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. - 2001. - Vol. - 96. - №1. - P. - 21 - 34.
10. Acin P. Endometriosis: A Disease That Remains Enigmatic [Електронний ресурс] / P. Acin, I. Velasco // Obstet Gynecol. - 2013. -Режим доступу: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/242149/>
11. 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. - N1.- P.123.
12. Richter O.N. Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis / O.N. Richter, C. Dorn,

- B. R sing, C. Flaskamp et. al. // Arch Gynecol Obstet. – 2005. – Vol. 271(2). – P.143-147.
13. Koninckx P.R. Anti-TNF- treatment for deep endometriosis-associated pain: a randomized placebo-controlled trial / P.R. Koninckx, M. Craessaerts, D. Timmerman, F. Cornillie et.al. // Hum Reprod. – 2008. – Vol. 23(9). – P. 2017–2023.
 14. Somigliana E. Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis / E. Somigliana, P. Vigano, G. Rossi, S. Carinelli et.al. // Hum Reprod. – 1999. – Vol. 14(12). – P.:2944-2950.
 15. Itoh H. Interleukin-12 inhibits development of ectopic endometriotic tissues in peritoneal cavity via activation of NK cells in a murine endometriosis model / H. Itoh, T. Sashihara, A. Hosono, S. Kaminogawa et. al. // Cytotechnology. – 2011. – Vol. 63(2). – P. 133–141.
 16. Yang Zhuo Ou. Interleukin-4 Stimulates Proliferation of Endometriotic Stromal Cells / Yang Z. O., Hirota Y., Osuga Y., Hamasaki K. et.al // Am J Pathol. – 2008. – Vol. 173(2). – P. 463–469.
 17. Sinaii N. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis / N. Sinaii, S.D. Cleary, M.L. Ballweg, L.K. Nieman et.al. // Hum Reprod. – 2002. – Vol. 17. – P. 2715–2724.
 18. Coomes S. M. Plasticity within the $\alpha\beta+$ CD4+ T-cell lineage: when, how and what for? / S. M. Coomes, V. S. Pelly and M. S. Wilson // Open Biology/ – 2013. - DOI: 10.1098/rsob.120157 Режим доступу: <http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/3/1/120157>
 19. Yang X.O. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs / X.O. Yang, R. Nurieva, G.J. Martinez, H.S. Kang, Y. Chung, B.P. Pappu, B. Shah, S.H. Chang, K.S. Schluns, S.S. Watowich et al. // Immunity. – 2008. – № 29. – P. 44 – 56.
 20. Wong W.F. Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx / W.F. Wong, K. Kohu, T. Chiba, T. Sato, M. Satake // Immunology. – 2011. – Vol.132, № 2. – P. 157 – 164.
 21. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming / C. Dong // Nat Rev Immunol. – 2008. – Vol.8, № 5. – P. 337 – 348.
 22. Naito T. Transcriptional control of T-cell development/ T. Naito, H. Tanaka, Y. Naoe and I. Taniuchi // International Immunology. – 2011. – Vol. 23, № 11. – P. 661–668.
 23. Evans C. M. Transcription factor interplay in T helper cell differentiation / C. M. Evans and R. G. Jenner // Briefings in functional genomics. 2013. – Vol. 12, № 6. – P. 499 – 511.
 24. Murphy K. M., and S. L. Reiner. The lineage decisions of helper T cells / K.M. Murphy // Nat. Rev. Immunol. – 2002. - Vol. 2. – P. 933–944.
 25. Kemp K. L. Lck Mediates Th2 Differentiation through Effects on T-bet and GATA-3/ K.L. Kemp, S.D. Levin, P.J. Bryce, P. L. Stein // J. Immunol. - 2010. – № 184. – P. 4178 – 4184.
 26. Sui T. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet / T. Usui, R. Nishikomori, A. Kitani, and W. Strober. // Immunity. – 2003. – № 18. – P. 415 – 428.
 27. Ouyang W. STAT6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment / W. Ouyang, M. Lohning, Z. Gao, M. Assenmacher, S. Ranganath, A. Radbruch, K.M. Murphy. // Immunity. 2000. – Vol. 12. – P. 27 – 37.
 28. Fontenot J.D. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3 / J.D. Fontenot, J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, A.Y. Rudensky // Immunity. – 2005. - № 22. – P. 329–341.
 29. Ivanov I.I. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells / I.I. Ivanov, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, D.R. Littman // Cell. – 2006. – № 126. – P. 1121 – 1133.
 30. Ichiyama K. Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat / K. Ichiyama, H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura, T. Kobayashi // J Biol Chem.- 2008. - № 283. – P. 17003–17008.
 31. Skapenko A. GATA-3 in Human T Cell Helper Type 2 Development / A. Skapenko, J. Leipe, U. Niesner, K. Devriendt et.al. // J Exp Med. – 2004. – Vol. 199(3). – P. 423–428.
 32. Chakir H. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3 / H. Chakir, H. Wang, D.E. Lefebvre, J. Webb, F.W. Scott // Immunol Methods. – 2003. – Vol. 278, № (1-2). – P. 157 – 169.
 33. Li X. The Diagnostic Value of Transcription Factors T-bet/GATA-3 Ratio in Predicting Antibody-Mediated Rejection [Електронний ресурс] / X. Li, Q. Sun, M. Zhang M, J. Chen, Z. Liu // Clin Dev Immunol. – 2013. – Vol. 2013. - P. 4603-4616.

34. Режим доступу: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2013/460316/>
35. Kanwar B. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis / B. Kanwar, D. Favre, J.M. McCune // *Curr Opin HIV AIDS*. – 2010. – Vol. 5 № 2. – P. 151 – 157.
36. Ze-Wei Lin. The Expression Levels of Transcription Factors T-bet, GATA-3, ROR γ and FOXP3 in Peripheral Blood Lymphocyte (PBL) of Patients with Liver Cancer and their Significance [Електронний ресурс] / Ze-Wei Lin, Li-Xuan Wu, Yong Xie, Xi Ou et.al. // *Int J Med Sci*. – 2015. – Vol. 12(1). – P. 7–16.
Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278870/>
37. Saito S. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy / S. Saito, A. Nakashima, T. Shima, M. Ito // *Am J Reprod Immunol*. – 2010. – Vol. 63(6). – P.601–610.
38. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? / G. Chaouat // *Semin Immunopathol*. – 2007. – № 29. – P. 95 – 113.
39. Chen P. Expression of Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors, T-bet and GATA-3, in the eutopic endometrium of women with endometriosis / P. Chen, Z. Zhang, Q. Chen, F. Ren et.al. // *Acta Histochem*. – 2012. – Vol. 114(8). – P.779-84.
40. Szabo S. J. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses / S. J. Szabo, B. M. Sullivan, S. L. Peng, L. H. Glimcher. // *Annu. Rev. Immunol*. – 2003. – Vol. 21. – P. 713–758
41. Szabo S. J. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment / S. J. Szabo, S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, L. H. Glimcher. // *Cell*. – 2000. – Vol.100: 655–669.
42. Afkarian M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4 T cells / M. Afkarian, J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. *Nat. Immunol*. – 2002. – Vol. 3. – P. 549–557.
43. Usui T. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription / Usui T. J. C. Preiss, Y. Kanno, Z. J. Yao, J. H. Bream, J. J. O'Shea, and W. Strober. // *J. Exp. Med*. – 2006.- Vol. 203. – P. 755–766.
44. Fairbanks F. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. F. Fairbanks, M. S. Abr o, S. Podgaec, J. A. Dias et. al. // *Fertil Steril*. – 2009. – Vol. 91(2). – P. 320-324.
45. Коваль Г.Д. Особенности системной и локальной продукции провоспалительных цитокинов у женщин с эндометриозом ассоциированным с бесплодием / Г.Д.Коваль, Н.В.Пашковская, О.А. Оленович и др. // Сборник материалов Международной научной конференции «Современные исследования медико-биологических наук: совершенствование диагностики, разработка средств профилактики и терапии болезней». - Россия, г. Киров, 26-28 июня 2013 г. С. 67-73.
46. Andr G. M. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis / G. M. Andr , C. P. Barbosa, J. S. Teles. et.al. // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 95. - Iss. 7. – P. 2223–2227.
47. Chen S. Expression of the T regulatory cell transcription factor FoxP3 in periimplantation phase endometrium in infertile women with endometriosis/ S. Chen , J. Zhang , C. Huang et.al. // *Chen et al. Reproductive Biology and Endocrinology*. - 2012. –Vol. 10. – P. 34 – 41.
48. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site / G. Mor, I. Cardenas, V. Abrahams, S. Guller // *Reproductive Science*. – 2011.- Vol. – 1221. - P. 80 – 87.
49. Tilburgs T. Elsevier trophoblast research award lecture: unique properties of decidual T cells and their role in immune regulation during human pregnancy [Електронний ресурс] / T. Tilburgs, F.H. Claas, S.A. Scherjon // *Placenta*. - 2010. – Vol. – 31. – P. S82–S86. - Режим доступу: [http://www.placentajournal.org/article/S0143-4004\(10\)00023-8/pdf](http://www.placentajournal.org/article/S0143-4004(10)00023-8/pdf).
50. Teles A. Control of Uterine Microenvironment by Foxp3+ Cells Facilitates Embryo Implantation [Електронний ресурс] / A. Teles, A. Schumacher, M.-C. Khnle et.al. // *Front Immunol*. – 2013. – Vol.4. Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689029/>
51. Jasper M.J. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue / M. J. Jasper, K. P. Tremellen , S. A. Robertson // *MHR: Basic science of reprod. Medicine* .- 2006. – Vol. 12. – Iss. 5.- P. 301-308.

РЕЗЮМЕ

**ДИСБАЛАНС ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ
РЕГУЛЯЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ Т-КЛІТИН
В ЕУТОПІЧНОМУ ЕНДОМЕТРІЇ ЖІНОК,
ХВОРИХ НА ЕНДОМЕТРІОЗ**

Г.Д. Коваль

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет» (м. Чернівці)

Метою дослідження було встановити особливості експресії цитокинасочіюваних транскрипційних факторів T-bet, GATA-3, Foxp3 як маркерів диференціювання Т-хелперів 1-го та 2-го типів та Т-регуляторних клітин у тканині ендометрія жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям. Досліджено експресію мРНК T-bet, GATA-3, Foxp3 методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в тканині еутопічного ендометрія 20 жінок з ендометріозом асоційованим з безпліддям та 20 жінок з безпліддям трубного генезу. Результати: виявлено зростання експресії мРНК T-bet та GATA-3 з переважанням експресії мРНК T-bet та зниження експресії мРНК Foxp3. Висновки: виявлені зміни експресії транскрипційних факторів можуть свідчити про дисбаланс Т-хелперів 1-го та 2-го типів та зниження регуляторної функції Т-клітин, що може бути однією з причин ендометріозу та грати негативну роль у розвитку безпліддя при цьому захворюванні.

Ключові слова: ендометріоз, безпліддя, Т-хелпери, мРНК, T-bet, GATA-3, Foxp3.

РЕЗЮМЕ

**ДИСБАЛАНС ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ
РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК
В ЭУТОПИЧНОМ ЭНДОМЕТРИИ ЖЕНЩИН,
БОЛЬНЫХ ЭНДОМЕТРИОЗОМ**

Г.Д. Коваль

Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет»(г. Черновцы)

Целью исследования было установить особенности экспрессии цитокинасочіюванных транскрипционных факторов T-bet, GATA-3, Foxp3 в качестве маркеров дифференцирования Т-хелперов 1-го и 2-го типов и Т-регуляторных клеток в ткани эндометрия

женщин, больных эндометриозом, ассоциированный с бесплодием. Исследовано экспрессию мРНК T-bet, GATA-3, Foxp3 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в ткани эутопичного эндометрия 20 женщин с эндометриозом ассоциированным с бесплодием и 20 женщин с бесплодием трубного генеза.

Результаты: выявлен рост экспрессии мРНК T-bet и GATA-3 с преобладанием экспрессии мРНК T-bet и снижение экспрессии мРНК Foxp3. Выводы: обнаруженные изменения экспрессии транскрипционных факторов могут свидетельствовать о дисбалансе Т-хелперов 1-го и 2-го типов и снижение регуляторной функции Т-клеток, что может быть одной из причин эндометриоза и играть отрицательную роль в развитии бесплодия при этом заболевании.

Ключевые слова: эндометриоз, бесплодие, Т-хелпери, мРНК, T-bet, GATA-3, Foxp3.

SUMMARY

**IMBALANCE OF TRANSCRIPTION REGULATORY
FACTORS IN DIFFERENTIATION OF T-HELPER
CELLS IN ENDOMETRIAL TISSUE OF WOMEN WITH
ENDOMETRIOSIS**

H.D. Koval

HSEI of Ukraine "Bukovinian State Medical University"
(Chernivtsi)

Abstract. The objective of the research was to find study of Th1 and Th2 cells as well as the expression of T-regulatory cells in the endometrium of women with endometriosis associated with infertility. Gene expression of Tbet, GATA3 and Foxp3 was examined by the method of polymerase chain reaction (PCR) in the endometrial samples of 20 women with endometriosis associated with infertility and 20 women with infertility of tubal origin. Results: increase of expression mRNA for Tbet and GATA3 with prevailing expression of mRNA for Tbet and decrease of mRNA Foxp3 expression was observed. Conclusions: changes in transcription factors expression found can indicate the imbalance of T-helper cells of the Th1 and Th2 type and elimination of regulatory function of T-cells, which can be one of the causes of endometriosis playing a negative role in the development of infertility assisted with this disease.

Key words: endometriosis, infertility, T-helpers, mRNA, Tbet, GATA3, Foxp3.