

ГІНЕКОЛОГІЯ

УДК 612.112:618.145-002-097-06:618.177-02

*Г.Д. Коваль**Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці***РЕГУЛЯТОРНІ Т-КЛІТИНИ ЕНДОМЕТРІЯ
ЯК ВАЖЛИВИЙ ФАКТОР ПАТОГЕНЕЗУ ЕНДОМЕТРІОЗУ
ТА СПРИЧИНЕНОГО НИМ БЕЗПЛІДДЯ**

Проведено дослідження фактора транскрипції регуляторних Т-лімфоцитів у тканині еутопічного ендометрія у 20 жінок з ендометріозом і безпліддям та у 20 жінок з безпліддям трубного генезу (контрольна група) в фолікулярну фазу менструального циклу. Визначено експресію мРНК фактора транскрипції регуляторних Т-лімфоцитів – FoxP3 методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції в реальному часі. Показано, що експресія FoxP3 в ендометрії безплідних жінок з ендометріозом була достовірно зниженою відносно контролю. На нашу думку, зниження експресії мРНК FoxP3 є вираженням недостатності функції регуляторних Т-лімфоцитів у ендометрії жінок з ендометріозом та може відігравати роль у патогенезі як самого ендометріозу, так і пов'язаного з ним безпліддя.

Ключові слова: регуляторні Т-лімфоцити, фактори транскрипції, ендометріоз, безпліддя, ендометрій.

Ендометріоз – це захворювання, що характеризується розростанням тканини, за морфологічними характеристиками схожої на ендометрій, поза межами порожнини матки [1, 2]. Ендометріоз є третім за частотою причинним фактором безпліддя. Загальновідомо, що дане захворювання розвивається на тлі гормональних порушень, генетичної схильності та імунологічного дисбалансу [3, 4]. Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених цій проблемі, імунопатогенез ендометріозу та спричиненого ним безпліддя достеменно не з'ясовані [1, 4, 5].

Оскільки ендометріодні ураження часто присутні в черевній порожнині, то вони знаходяться в безпосередньому контакті з перитонеальною рідиною, котра омиває порожнини малого тазу, матку, маткові труби та яєчники. Як відомо, перитонеальна рідина містить велику кількість елементів імунної системи, які повинні здійснювати контроль гомеостазу [6, 7]. Тим не менше при ендометріозі спостерігається не тільки вихід маткового ендометрія в позаматковий простір, а і його розростання. Тому дане захворювання може розглядатися з позицій «трансплантації» аутологічної тканини, або імунологічної толерантності до ектопічного ендометрія, що, безумовно, свідчить про порушення імунологічної регуляції. В процесах імунологічної регуляції важливу роль відіграє регулююча мережа Т-хелперів (ТCD4⁺-клітин-ефекторів), у яку входять такі субпопуляції Т-хелперів, як Т-хелпери 1-го типу (Th1), Т-хелпери 2-го типу (Th2), Т-хелпери 17-го типу (Th17) в поєднанні з Т-регуляторними клітинами CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) [8].

Останні клітини відіграють особливу роль у підтримці імунологічної толерантності та імунологічного гомеостазу. Особливістю Treg є експресія унікального транскрипційного фактора FoxP3⁺ (forkhead box P3), який регулює їх розвиток та функції [9, 10]. Проте дуже мало переконливих публікацій стосовно ролі регуляторних

© Г.Д. Коваль, 2015

Т-клітин CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) у небажаній імунологічній толерантності по відношенню до ендометріїдних ектопій та розвитку безпліддя, що й зумовило мету нашої роботи.

Мета дослідження – дослідити роль Т-регуляторних лімфоцитів у розвитку ендометріозу та асоційованого з ним безпліддя на основі визначення експресії мРНК FoxP3⁺ в ендометрії у жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям.

Матеріал і методи. Для дослідження використовувався матеріал тканини еутопічного ендометрія, залитого в парафінові блоки. В дослідженні використано зразки тканини ендометрія від 20 безплідних жінок з ендометріозом (досліджувана група) та 20 жінок з безпліддям трубного генезу внаслідок перенесеного запального процесу (контрольна група). Всім пацієнткам було проведено ретельне обстеження, на основі якого не було виявлено жодної іншої патології з боку репродуктивного тракту. Тканину ендометрія отримували інтраопераційно (під час гістероскопії, яку проводили одразу після лапароскопії, коли й встановлювалась візуальна картина ендометріозу та трубної непрохідності).

Матричну РНК фактора регуляції транскрипції регуляторних Т-лімфоцитів FoxP3 визначали за допомогою молекулярно-генетичних досліджень. Спочатку досліджувані зразки подрібнювали та гомогенізували за допомогою ступки та пестика, після чого зразки депарафінували в ксилолі та проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %; 96 %; 70 %).

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 гуанідинтіоціанат та фенол рН=4,0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно до протоколу до набору.

Зворотну транскрипцію та отримання кДНК проводили, використовуючи набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Росія). Реакційна су-

міш загальним об'ємом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої H₂O, 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 подальшим нагріванням для інактивації MMLV-RT впродовж 5 хв при температурі 92 °С. Отриману кДНК відразу використовували в полімеразно-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 барвник SYBR Green, ДНК-полімеразу Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального об'єму 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), таблиця.

Ампліфікацію, яка складалася з 45–50 циклів, проводили після початкової денатурації протягом 10 хв при 95 °С та за таких умов: денатурація – 95 °С, 15 с, віджиг – 59–61 °С, 30–60 с, елонгація – 72 °С, 30 с. Як референс-ген 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 ΔΔCt. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

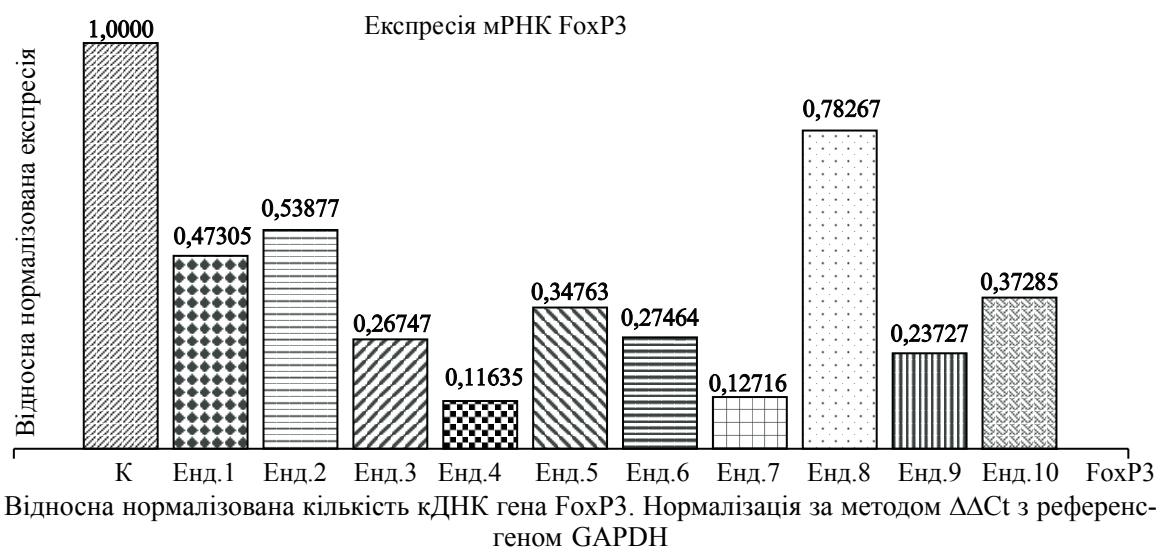
Результати та їх обговорення. Встановлено, що експресія мРНК FoxP3 в ендометрії

Пари праймерів, що використовувалися для визначення мРНК FoxP3

Ген	Праймер	Температура, °С	Розмір	Екзон
FoxP3	F: 5'-TCTGCACCTTCCCAAATCCC-3'	59.96	48	730/731
	R: 5'-AAAGGGTGCTGTCTTCCCTG-3'	59.89		

безплідних жінок з ендометріозом була достовірно зниженою в порівнянні з такою у контрольній групі (рисунок).

ної відповіді [13–15]. Зокрема, є роботи [16], де показано, що експресія мРНК FoxP3 в ендометрії жінок з безпліддям невиясненого



На нашу думку, зниження експресії мРНК FoxP3 є вираженням недостатності функції регуляторних Т-лімфоцитів. Це, у свою чергу, може підтримувати імунологічну толерантність по відношенню до ендометріюїдних ектопій та сприяти їх збільшенню поза межами фізіологічної локалізації. Наші дані узгоджуються з результатами досліджень, де, зокрема, показано наявність поліморфізму гаплотипів FoxP3, пов'язаних з ендометріозом [11]. При цьому існують роботи, у яких указується на підвищення експресії мРНК FoxP3 в ендометрії жінок з ендометріозом, проте названі дослідження проводились за інших умов (у переїмплантаційну фазу) [12]. З іншого боку, сприйнятливості ендометрія до імплантації вимагає адекватної імунологічної толерантності для захисту ембріона від імунного відторгнення з боку материнської імун-

генезу вдвічі нижча, ніж у здорових жінок, що чітко вказує на роль Т-регуляторних лімфоцитів у розвитку безпліддя.

Висновки

В ендометрії жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям, відмічається зниження експресії мРНК FoxP3, що може відігравати роль у розвитку як самого ендометріозу, так і асоційованого з ним безпліддя.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані зумовлюють необхідність подальших досліджень ролі Т-регуляторних лімфоцитів у патогенезі ендометріозу та спричиненого ним безпліддя в контексті їх взаємодії з іншими імунними молекулами [17] та з перспективою вирішення питань діагностичного використання та терапевтичного впливу.

Список літератури

1. Theories of endometriosis / D. Vinatier, G. Orazi, M. Cosson, P. Dufour // *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*. – 2001. – V. 96, № 1. – P. 21–34.
2. Endometriosis, quality of life and work / E. Nnoaham, L. Hummelshoj, P. Webster, T. d'Hooghe // *Fertility and Sterility*. – 2011. – V. 96, № 2. – P. 366–372.
3. 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.
4. Ozkan S. 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>.

5. Некоторые иммунологические аспекты эндометриоза у женщин детородного возраста с нарушением фертильности / Н. М. Калинина, Е. А. Михнина, Н. И. Давыдова [и др.] // Russian Journal of Immunology. – 2005. – V. 9, suppl. 2. – P. 24–33.
6. Immune cells in the female reproductive tract / S. K. Lee, C. J. Kim, D. J. Kim, J. H. Kang // Immune Netw. – 2015. – V. 15 (1). – P. 16–26.
7. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina / A. L. Givan, H. D. White, J. E. Stern [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. – 1997. – V. 38. – P. 350–359.
8. Zhu J. CD4 T cells: fates, functions, and faults / J. Zhu, W. E. Paul // Blood. – 2008. – V. 112 (5). – P. 1557–1569.
9. Sakaguchi S. FoxP3⁺ regulatory T cells in the human immune system [Электронный ресурс] / S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino // Nature Reviews Immunol. – 2010. – V. 10. – P. 490–500. – Режим доступа : <http://www.nature.com/nri/journal/v10/n7/full/nri2785.html/>.
10. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease / S. Sakaguchi, M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi // Immunological Reviews. – 2006. – V. 212, iss. 1. – P. 8–27.
11. Analysis of FoxP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis / G. M. Andre, C. P. Barbosa, J. S. Teles [et al.] // Fertility and Sterility. – 2011. – V. 95, iss. 7. – P. 2223–2227.
12. 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.] // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2012. – V. 10. – P. 34–41.
13. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site / G. Mor, I. Cardenas, V. Abrahams, S. Guller // Reproductive Science. – 2011. – V. 1221. – P. 80–87.
14. Tilburgs T. Elsevier trophoblast research award lecture: unique properties of decidual T cells and their role in immune regulation during human pregnancy [Электронный ресурс] / T. Tilburgs, F. H. Claas, S. A. Scherjon // Placenta. – 2010. – V. 31. – P. S82–S86. – Режим доступа : [http://www.placentajournal.org/article/S0143-4004\(10\)00023-8/pdf](http://www.placentajournal.org/article/S0143-4004(10)00023-8/pdf).
15. Control of uterine microenvironment by Foxp3⁺ cells facilitates embryo implantation [Электронный ресурс] / A. Teles, A. Schumacher, M.-C. Kühnle [et al.] // Front Immunol. – 2013. – V. 4. – Режим доступа : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689029/>.
16. 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. – V. 12, iss. 5. – P. 301–308.
17. Guerin L. R. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? / L. R. Guerin, J. R. Prins, S. A. Robertson // Hum. Reprod. Update. – 2009. – V. 15, № 5. – P. 517–535.

Г.Д. Коваль

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ КАК ВАЖНЫЙ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ЭНДОМЕТРИОЗА И ВЫЗЫВАЕМОГО ИМ БЕСПЛОДИЯ

Проведено исследование фактора транскрипции регуляторных Т-лимфоцитов в ткани эутопического эндометрия у 20 женщин с эндометриозом и бесплодием и 20 женщин с бесплодием трубного генеза (контрольная группа) в фолликулярной фазе менструального цикла. Определена экспрессия мРНК фактора транскрипции регуляторных Т-лимфоцитов – FoxP3 методом количественной полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Показано, что экспрессия FoxP3 в эндометрии бесплодных женщин с эндометриозом была достоверно сниженной относительно контроля. По нашему мнению, снижение экспрессии мРНК FoxP3 является выражением недостаточности функции регуляторных Т-лимфоцитов в эндометрии женщин с эндометриозом и может играть роль в патогенезе как самого эндометриоза, так и связанного с ним бесплодия.

Ключевые слова: регуляторные Т-лимфоциты, факторы транскрипции, эндометриоз, бесплодие, эндометрий.

G.D. Koval

REGULATORY T-CELLS OF ENDOMETRIUM AS IMPORTANT PATHOGENETIC FACTORS OF ENDOMETRIOSIS AND RELATED INFERTILITY

The expression of mRNA transcription factor of regulatory T-lymphocytes – FoxP3 has been investigated by the method of quantitative real-time PCR in eutopic endometrium tissue of 20 women with endometriosis and infertility as well as 20 women with infertility of tubal genesis (control group). It has been shown, that FoxP3 expression in the endometrium of infertile women with endometriosis was significantly reduced comparing with the control group. In our opinion, the decreased mRNA expression of FoxP3 is related with insufficient functioning of regulatory T-lymphocytes in the endometrium of women with endometriosis and may play a role in the pathogenesis of endometriosis as well as the related infertility.

Key words: *regulatory T-cells, transcription factors, FoxP3, endometriosis, infertility, endometrium.*

Поступила 27.02.15