

ГІНЕКОЛОГІЯ

УДК 577.218:612.112]:618.145-002-097:618.177

*Г.Д. Коваль**ВДНЗУ «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці***ЕКСПРЕСІЯ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ РЕГУЛЯЦІЇ
ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ Т-ХЕЛПЕРІВ Т-ВЕТ ТА GATA-3
У ТКАНИНІ ЕНДОМЕТРІА В ЖІНОК З ЕНДОМЕТРІОЗОМ,
АСОЦІЙОВАНИМ З БЕЗПЛІДДЯМ**

Встановлювали експресію та співвідношення транскрипційних факторів регуляції диференціювання Т-хелперів 1-го та 2-го типів в ендометрії жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям. Досліджено експресію мРНК T-bet та GATA-3 методом полімеразної ланцюгової реакції в ендометрії 42 жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям, та 12 жінок з безпліддям трубного генезу. Виявлено зростання експресії мРНК T-bet та GATA-3 з переважанням експресії мРНК T-bet. Виявлені зміни експресії транскрипційних факторів свідчать про дисбаланс Т-хелперів 1-го та 2-го типів, що може бути однією з причин ендометріозу та відігравати негативну роль у розвитку безпліддя при цьому захворюванні.

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

Ендометріоз характеризується доброякісним розростанням тканини, за морфологічними та функціональними характеристиками подібної до ендометрія, поза межами порожнини матки на тлі гормональних порушень та генетичної схильності [1]. Частота та поширеність захворювання надзвичайно велика: ендометріоз діагностують у 7–59 % жінок із хронічним тазовим болем, у 20–30 % жінок зі зниженою фертильністю, у 2–22 % жінок при безсимптомному перебігу [2, 3]. У загальній популяції жінок захворюваність на ендометріоз сягає близько 10 % [1, 2]. Частота первинного та вторинного жіночого безпліддя при ендометріозі, за даними різних авторів, коливається від 40 до 80 % [4–7]. Встановлено, що 30–40 % хворих на ендометріоз страждають на безпліддя і близько 30 % – на невиношування вагітності [5, 6].

Враховуючи те, що захворювання по своїй суті є доброякісною ектопією, зрозуміло, що в патогенезі ендометріозу чільне місце відводиться імунному дисбалансу, адже основ-

ним завданням імунної системи є підтримка гомеостазу, в тому числі й шляхом контролю різноманітних ектопічних розростань [8–11].

У світлі наукових подій останніх років було вдосконалено знання про Т-хелпери 1-го та 2-го типів та з'явилися нові погляди на дихотомію Th1- чи Th2-лімфоцитів. Існує щонайменше чотири субпопуляції CD4⁺ Т-клітин: Т-хелпери 1-го типу (Th1), Т-хелпери 2-го типу (Th2), Т-хелпери 17-го типу (Th17) в поєднанні з регуляторними Т-клітинами CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) [12–16]. Молекулярні механізми, за допомогою яких антигенна стимуляція Т-клітинного рецептора та сигналів, отриманих від коштимуляторних молекул, призводить до диференціювання наївних попередників Т-клітин у напрямку Th1 або Th2, були в центрі інтенсивних досліджень в останні роки. Відомо, що клональна експансія та диференціювання наївних Т-клітин являє собою складний процес, який регулюється взаємодією мережі транскрипційних факторів та активаторів

© Г.Д. Коваль, 2015

транскрипції – signal transducers in the cytoplasm and activators of transcription (STAT) [17, 18]. Для диференціювання кожного підтипу клітин необхідні свої транскрипційні фактори та STAT, які можуть взаємно посилювати чи пригнічувати диференціацію певних підтипів хелперів. Наприклад, для диференціювання Th1 потрібні T-bet (T-box), STAT-1 та iSTAT-4, для диференціювання Th2 – GATA-3 та iSTAT-5, для диференціювання Th17 – RORgt і STAT-3 та для диференціювання nTreg та iTreg клітин необхідні FoxP3 (Forkhead box protein P3) і STAT-5 [15–17, 19]. У координації повної транскрипційної програми, окрім наведених факторів, беруть участь й інші транскрипційні регулятори, а саме: диференціювання Т-клітин характеризується значним ступенем гнучкості та пластичності щодо своєї подальшої диференціації, що показано як *in vitro*, так і *in vivo* [16, 18–20].

Було показано, що вивчення транскрипційних факторів та їх співвідношення, тобто T-bet/GATA-3, більш об'єктивно відображають Th1/Th2 диференціацію, ніж лише вимірювання транскрипційних факторів клітин одного або іншого типу (Th1- або Th2-типу) чи лише визначення рівнів відповідних цитокінів [21, 22]. Таким чином, більш важливо досліджувати баланс Th1/Th2/Th17/Treg на рівні відповідних транскрипційних факторів.

Вивченню факторів транскрипції в регулюванні диференціювання Th-клітин людини Th1/Th2/Th17/Treg приділяється велика увага. Було 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 [21, 22]. Звісно, що в процесах репродукції баланс Th1/Th2/Th17/Treg відіграє важливу роль [23, 24]. Однак відома лише одна робота, присвячена проблемі транскрипційних факторів при ендометріозі, що до кінця не відкриває даного питання, що й зумовило мету даної роботи [25].

Мета дослідження – встановити співвідношення Th1/Th2 на основі експресії транскрипційних факторів T-bet та GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям.

Матеріал і методи. Протокол дослідження відповідав вимогам до біомедичних

досліджень та був затверджений 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.

Досліджували матеріал тканини еутопічного ендометрія, залитого в парафінові блоки. Досліджувані зразки ендометрія отримували від 42 жінок з ендометріозом, а контрольні – від 12 жінок з безпліддям трубного генезу. Тканину ендометрія забирали у проліферативну фазу менструального циклу, інтраопераційно під час гістероскопії.

Матричну РНК визначали за допомогою молекулярно-генетичних досліджень. Для виділення тотальної РНК використовували набір «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лабораторія Изоген», Росія), який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціанат і фенол з рН=4,0) та ExtraGene E (супензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно до протоколу 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 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 полімеразній ланцюговій реакції 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-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 об'єму 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), табл. 1.

Таблиця 1. Специфічні пари праймерів для визначення мРНК T-box 21 (T-bet), GATA-3

Ген	Праймер	Температура плавлення (°C)	Довжина продукту ампліфікації	Екзонний перехід
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 проводили початкову денатурацію протягом 10 хв при 95 °C. Після цього виконували ампліфікацію, яка складалася з 45–50 циклів, за таких умов: денатурація – 95 °C, 15 с, віджиг – 59–61 °C, 30–60 с, елонгація – 72 °C, 30 с. 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 $\Delta\Delta Ct$. Статистичний аналіз даних полімеразної ланцюгової реакції проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (BioRad, США).

Результати та їх обговорення. Результати експресії мРНК T-bet, GATA-3 та їх співвідношення в ендометрії жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям, у порівнянні з контролем подано в табл. 2.

Таблиця 2. Відносна нормалізована кількість кДНК генів FoxP3, T-bet, GATA-3 в ендометрії жінок з ендометріозом та безпліддям

Група хворих	мРНК транскрипційних факторів		
	T-bet	GATA-3	T-bet/GATA-3
Жінки з ендометріозом, асоційованим з безпліддям (n=42)	3,76±0,54	2,86±0,39	1,31
Контрольна група (n=12)	1,00±0,11	1,01±0,10	*
p	<0,01	<0,01	

Примітки: 1. $p < 0,01$ – достовірна відмінність.

2. * Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном GAPDH.

Отримані дані вказують на зміни експресії обох досліджуваних транскрипційних факторів в ендометрії жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям, у порівнянні з

контролем. Зокрема, рівень експресії мРНК T-bet збільшився у 3,76 разу в порівнянні з контролем ($p < 0,01$).

Підвищення експресії мРНК T-bet корелює з підвищенням рівня Т-хелперів 1-го типу в ендометрії жінок з ендометріозом. Як відомо з даних [12, 13, 18], диференціації наївних Т-клітин у Th1 сприяють два основних сигнальних шляхи – один за участю IL-12/STAT-4

та другий за участю IFN- γ /STAT-1/T-bet. Це узгоджується з відомими роботами, які вказують на підвищення рівнів IL-12 та IFN- γ у перитонеальній рідині у хворих на ендометріоз [26]. Також є роботи, в яких вказується на те, що IL-12 призводить до підвищеної експресії транскрипційного фактора T-bet [26–28]. Підвищення експресії мРНК T-bet в ендометрії супроводжується підвищенням рівнів цитокінів, притаманних Th1 (IL-2, INF- γ , TNF- α), у перитонеальній рідині, про що є дані в літературі та що підтверджується результатами обстежених хворих (результати, отримані нами в попередніх дослідженнях у цих самих пацієнток, вказували на достовірне ($p < 0,01$) збільшення рівнів IL-2, INF- γ , TNF- α , а також IL-12 у перитонеальній рідині [29]) [25, 27]. Підвищення рівня експресії мРНК T-bet в ендометрії жінок з ендометріозом також можна пояснити необхід-

ністю 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 вище, ніж у контролі, а саме – у 2,86 рази.

Ці дані також узгоджуються з результатами відомих робіт, які вказують на підвищення рівнів цитокинів, що продукуються Th2 [16]. (Нами у попередніх дослідженнях у даних пацієток отримані результати достовірно знижених рівнів IL-4 ($p < 0,05$) та достовірно підвищених рівнів IL-6 ($p < 0,01$) у 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 [25]. При цьому у даному дослідженні результати вказують на нижчий рівень експресії транскрипційних факторів GATA-3, ніж T-bet, при збільшенні рівнів мРНК обох транскрипційних факторів ($p < 0,01$), що, однак, не заперечує результатів Chen et al. (2012), бо відомо, що T-bet переважає в кількісному еквіваленті [21, 22, 25, 26]. Цю думку підтверджує також

зниження співвідношення T-bet до GATA-3, яке за отриманими даними становило 1,31, що свідчить про важливість збільшення експресії GATA-3.

Висновки

1. Ендометріоз, асоційований з безпліддям, супроводжується підвищенням експресії в тканині ендометрія мРНК генів T-bet та GATA-3.

2. В тканині ендометрія жінок з ендометріозом, асоційованим з безпліддям, спостерігається зниження співвідношення T-bet/GATA-3.

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

Список літератури

1. Баскаков В. П. Эндометриозная болезнь / В. П. Баскаков, Ю. В. Цвелев, Е. Ф. Кира. – СПб., 2002. – 452 с.
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. Retzliff // Clin. Obstet. Gynecol. – 2010. – V. 53 (2). – P. 389–396.
4. Айламазян Э. К. Гинекология от пубертата до постменопаузы : практическое руководство / Э. К. Айламазян. – М. : Медпресс, 2007. – 495 с.
5. Allaire C. Endometriosis and infertility: a review / C. Allaire // J. Reprod. Med. – 2006. – V. 51, № 3. – P. 164–168.
6. Реабілітація репродуктивної функції жінок із безпліддям при ендометріозі після лапароскопічних операцій / О. М. Юзько, С. Г. Приймак, І. А. Приймак, Л. В. Бегаль // 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. – V. 98. – P. 511–519.
9. 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.
10. Acien P. Endometriosis: a disease that remains enigmatic [Електронний ресурс] / P. Acien, I. Velasco // Obstet., Gynecol. – 2013. – Режим доступу : <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/242149/>.
11. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis / С. М. Kyama, S. Debrock, J. M. Mwenda, T. M. D'Hooghe // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – № 1. – P. 123.
12. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs / X. O. Yang, R. Nurieva, G. J. Martinez [et al.] // Immunity. – 2008. – № 29. – P. 44–56.

13. Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx / W. F. Wong, K. Kohu, T. Chiba [et al.] // *Immunology*. – 2011. – V. 132, № 2. – P. 157–164.
14. Transcriptional control of T-cell development / T. Naito, H. Tanaka, Y. Naoe, I. Taniuchi // *International Immunology*. – 2011. – V. 23, № 11. – P. 661–668.
15. *Evans C. M.* Transcription factor interplay in T helper cell differentiation / C. M. Evans, R. G. Jenner // *Briefings in functional genomics*. – 2013. – V. 12, № 6. – P. 499–511.
16. *Murphy K. M.* The lineage decisions of helper T cells / K. M. Murphy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – V. 2. – P. 933–944.
17. 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.
18. 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, W. Strober. // *Immunity*. – 2003. – № 18 (3). – P. 415–428.
19. STAT6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment / W. Ouyang, M. Löhning, Z. Gao [et al.] // *Immunity*. – 2000. – V. 12. – P. 27–37.
20. GATA-3 in human T cell helper type 2 development / A. Skapenko, J. Leipe, U. Niesner [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 199 (3). – P. 423–428.
21. 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 [et al.] // *Immunol. Methods*. – 2003. – V. 278, № 1–2. – P. 157–169.
22. The diagnostic value of transcription factors T-bet/GATA-3 ratio in predicting antibody-mediated rejection [Електронний ресурс] / X. Li, Q. Sun, M. Zhang [et al.] // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – V. 2013. – P. 4603–4616. – Режим доступу : <http://www.hindawi.com/journals/jir/2013/460316/>.
23. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy / S. Saito, A. Nakashima, T. Shima, M. Ito // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – V. 63 (6). – P. 601–610.
24. *Chaouat G.* The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? / G. Chaouat // *Semin. Immunopathol.* – 2007. – № 29. – P. 95–113.
25. 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 [et al.] // *Acta Histochem.* – 2012. – V. 114 (8). – P. 779–784.
26. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment / S. J. Szabo, S. T. Kim, G. L. Costa [et al.] // *Cell*. – 2000. – V. 100. – P. 655–669.
27. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4 T cells / M. Afkarian, J. R. Sedy, J. Yang [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2002. – V. 3. – P. 549–557.
28. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription / T. Usui, J. C. Preiss, Y. Kanno [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203. – P. 755–766.
29. 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.] // *Современные исследования медико-биологических наук: совершенствование диагностики, разработка средств профилактики и терапии болезней : Междунар. науч. конф., Россия, г. Киров, 26–28 июня 2013 г. : сборник материалов конф.* – Киров, 2013. – С. 67–73.

Г.Д. Коваль

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ХЕЛПЕРОВ Т-ВЕТ И GATA-3 В ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С БЕСПЛОДИЕМ

Устанавливали экспрессию и соотношение транскрипционных факторов регуляции дифференцировки Т-хелперов 1-го и 2-го типов в эндометрии женщин с эндометриозом, ассоциированным с бесплодием. Исследована экспрессия мРНК Т-bet и GATA-3 методом полимеразной цепной реакции в эндометрии 42 пациенток с эндометриозом, ассоциированным с бесплодием,

и 12 женщин с бесплодием трубного генеза. Выявлен рост экспрессии мРНК T-bet и GATA-3 с преобладанием экспрессии мРНК T-bet. Обнаруженные изменения экспрессии транскрипционных факторов свидетельствуют о дисбалансе T-хелперов 1-го и 2-го типов, что может быть одной из причин эндометриоза и играть негативную роль в развитии бесплодия при этом заболевании.

Ключевые слова: эндометриоз, бесплодие, T-хелперы, мРНК, T-bet, GATA-3.

H.D. Koval

EXPRESSION OF TRANSCRIPTION REGULATION FACTORS IN DIFFERENTIATION OF T-HELPERS T-BET AND GATA-3 IN THE ENDOMETRIUM TISSUE OF WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS ASSOCIATED WITH INFERTILITY

The expression and correlation of transcription regulation factors in differentiation of T-helpers of 1st and 2nd types in the endometrium have been determined at women with endometriosis associated with infertility. Expression of mRNA T-bet and GATA-3 was examined by the method of polymerase chain reaction in the endometrium of 42 women with endometriosis associated with infertility and 12 women with infertility of tubal genesis. Increase of expression of mRNA T-bet and GATA-3 with prevailing expression of mRNA T-bet has been ascertained. Changes of transcription factors expression found indicative about the imbalance of T-helpers of 1st and 2nd types which can be one of the causes of endometriosis and play a negative role in the development of infertility in case of this disease.

Key words: endometriosis, infertility, T-helpers, mRNA, T-bet, GATA-3.

Поступила 29.04.15