

ЗМІНИ ІМУНОГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ПРИ ЕНДОМЕТРІОЗІ, ЩО АСОЦІЙОВАНИЙ ІЗ БЕЗПЛІДДЯМ

Г.Д. Коваль¹, В.В. Чоп'як², А.М. Камишний³

¹ Буковинський державний медичний університет

² Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького

³ Запорізький державний медичний університет

Резюме

Метою дослідження було встановити зміни імунорегуляції імунної відповіді при ендометріозі, асоційованому з безпліддям, шляхом визначення експресії чинників регуляції диференціювання Т-хелперів 1, 2-го типів та Т-регуляторних клітин у тканині ендометрія. Матеріали та методи. Експресію мРНК T-bet, GATA3, Foxp3 досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у тканині ендометрія 42 жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям, та 12 жінок із безпліддям трубного генезу. Результати. Встановлено зростання експресії мРНК T-bet та GATA-3 зі зниженням експресії мРНК Foxp3 в тканині ендометрія у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям. Висновки. Виявлені зміни свідчать про порушення імунорегуляції імунної відповіді при ендометріозі, асоційованому з безпліддям, із переважанням активації Т-хелперів 2-го типу при зниженні активності Т-регуляторних клітин.

Ключові слова

Ендометріоз, безпліддя, Т-хелпери, мРНК, T-bet, GATA-3, Foxp3.

Висока частота ендометріозу та асоціація з безпліддям роблять проблему його вивчення, діагностики та лікування надзвичайно актуальною [1, 2]. Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених цій проблемі, етіологія та патогенез ендометріозу достеменно не з'ясовані, залишаючись у багатьох аспектах на рівні теорій [1, 2]. У цьому контексті ендометріоз називають «хворобою-загадкою» [2]. Однак, враховуючи те, що захворювання за своєю природою є доброякісною ектопією, зрозуміло, що в патогенезі ендометріозу чільне місце відводиться імунному дисбалансу, адже основною задачею імунної системи є під-

тримка гомеостазу, в тому числі й шляхом контролю різноманітних ектопічних розростань [1-3].

На нашу думку, важливим питанням вивчення патогенезу ендометріозу є розуміння парадигми Т-хелперів 1 та 2-го типів (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 велика кількість робіт, які демонструють порушення балансу цитокінів Th1/Th2 у хворих з ендометріозом. Зокрема, встановлено, що при ендометріозі в перитонеальній рідині зростає кількість типових Th1-цитокінів — INF-γ та IL-2, рівень TNF-α корелює зі стадією ендометріозу.

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



метріозу, введення рекомбінантного людського TNF-інгібітора знижує розміри ектопій, а IL-12 знижує експериментальний ендометріоз у щурів та в природних умовах [3-5]. З іншого боку, є роботи, які вказують на посилення проліферації стромальних клітин ендометрія під дією типового Th2-цитокіну — IL-4 та зниженню ендометріодних розростань під впливом анти-IL-4 МКАТ [6]. Деякі дослідники публікують, що ендометріоз має асоціації та ознаки аутоімунного захворювання, пов'язуючи це з переважанням Th2. Таким чином, розвиток ендометріозу супроводжується порушенням цитокінів обох типів хелперів, і чи є ендометріоз типовим Th1- чи Th2-опосередкованим захворюванням, достеменно не зрозуміло. У світлі наукових подій останніх років вдосконалились знання про Th1 та Th2 та з'явилися нові погляди — наразі показано, що існує щонайменше чотири субпопуляції CD4+ Т-клітин: Th1, Th1, Th17 у поєднанні з регуляторними Т-клітинами CD4+ CD25+ Foxp3+ (Treg) [7, 8]. 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 [8-10]. Молекулярні механізми, за допомогою яких антигенна стимуляція Т-клітинного рецептора та сигналів, отриманих від ко-стимуляторних молекул, призводить до диференціювання наївних попередників Т-клітин у напрямку Th1 або Th2, були в центрі інтенсивних досліджень останніми роками. Стало відомо, що клональна експансія та диференціювання наївних Т-клітин являє собою складний процес, який регулюється взаємодією мережі транскрипційних чинників (ТЧ) та активаторів транскрипції — signal transducers in the cytoplasm and activators of transcription (STAT) [9, 10]. Для диференціювання кожного підтипу клітин необхідні свої ТЧ та STAT, які можуть взаємно посилювати чи пригнічувати диференціацію певних підтипів хелперів. Наприклад, для диференціювання Th1 потрібні T-bet (Tbox), STAT-1 та iSTAT-4, для диференціювання Th2 потрібні GATA-3 та iSTAT-5, для диференціювання Th17 потрібні ROR γ t та STAT-3 та для диференціювання nTreg та iTreg-клітин необхідні Foxp3 (Forkhead box protein P3) і STAT-5 [12-14]. У координації повної транскрипційної програми, окрім вищенаведених чинників, беруть участь й інші транскрипційні регулятори, а саме диференціювання Т-клітин характеризується значним ступенем гнучкості та пластичності щодо своєї долі, що показано як *in vitro*, так і *in vivo* [7, 8].

Було показано, що вивчення ТЧ та їх співвідношення, тобто T-bet/GATA-3, більш об'єктивно відображають Th1/Th2-диференціацію, ніж лише вимірювання ТЧ клітин одного або іншого

типу (Th1-типу або Th2-типу) чи лише визначення рівнів відповідних цитокінів [15-17]. Таким чином, більш важливо досліджувати баланс Th1/Th2/Th17/Treg на рівні відповідних транскрипційних чинників.

Вивченню чинників транскрипції в регулюванні диференціювання Т-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, ряд пухлин та, звісно, проблеми репродукції [17, 18]. Однак робіт, присвячених проблемі транскрипційних чинників при ендометріозі, дуже мало, що до кінця не розкриває дане питання та зумовило мету даної роботи [20, 21].

Мета дослідження — вивчити зміни імуногенетичної регуляції імунної відповіді у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям, шляхом визначення експресії транскрипційних чинників T-bet, GATA-3, Foxp3 в тканині ендометрія.

Матеріали та методи. Протокол дослідження відповідав вимогам до біомедичних досліджень та затверджувався комітетом з біоетики 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.

Досліджуваними зразками була тканина еутопічного ендометрія, залитого в парафінові блоки. Досліджувані зразки ендометрія отримували від жінок з ендометріозом (n=42), а контрольні — від жінок із безпліддям трубного генезу (n=12). 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%). Визначення мРНК проводилось за допомогою молекулярно-генетичних досліджень. 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 і фенол з рН=4,0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК відповідно до інструкції виробника.

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

H₂O, очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5x реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотну транскрипцію проводили за 45 °C впродовж 45 хвилин із наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT впродовж 5 хв за температури 92 °C. Отриману к-ДНК відразу використовували в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) у кількості 1-10 мкл або зберігали за температури -20 °C, а також за -70 °C 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 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) (табл. 1).

Спочатку проводилася початкова денатурація протягом 10 хв за 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. Як референс-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. У даній роботі було уперше вивчено експресію транскрипційних чинників регуляції диференціювання Th1 —

T-bet та Th2 — GATA-3 в тканині ендометрія жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям. Діапазони коливань показників виділено у групи: пограничні з контрольною групою, нижчі від медіани (помірні відхилення) та вищі від медіани (значні відхилення).

Встановлено, що рівні відносної нормалізованої експресії мРНК генів T-bet та GATA-3 були вірогідно вищими у 3,76 раза (p<0,01) та у 2,86 раза (p<0,001) відповідно (табл. 2).

Таблиця 2

Відносна нормалізована кількість кДНК генів T-bet та GATA-3 в тканині ендометрія жінок з ендометріозом та безпліддям

№	Групи хворих	мРНК транскрипційних чинників		
		T-bet	GATA-3	T-bet/GATA-3
1	Жінки з ендометріозом, асоційованим із безпліддям (n=42)	3,76±0,54	2,86±0,39	1,31
2	Контрольна група (n=12)	1,00±0,11	1,01±0,10	*-
P		p<0,001	p<0,001	

Примітка: p<0,001 — вірогідна відмінність. Нормалізація за методом ΔΔCt з референс-геном GAPDH. * — не може бути об'єктивно відображеном.

Діапазон значень відносної нормалізованої кількості мРНК відносно контролю для гена T-bet коливався у межах 0,89-6,24 (медіана — 3,13). Кількість кДНК гена T-bet нижча, ніж у контролі (<1), виявлена лише у 2 жінок, що склало 4,76% від досліджуваної когорти (p<0,001). Кількість зразків ендометрія зі значеннями >1,24-<3,13 склало 18 (42,85%) випадків. Відносна нормалізована кількість вища за медіану (>3,13) була виявлена у 22 випадках, що склало переважну більшість — 52,38% (p<0,001). Таким чином, в ендометрії жінок досліджуваної групи у 95,23% виявлялася підвищена відносна нормалізована кількість мРНК гена T-bet з перевагою високих значень (p<0,001).

Діапазон значень відносної нормалізованої кількості мРНК гена GATA-3 складав 0,81-6,15 (медіана — 2,23). Показники нижчі від середнього значення контролю були виміряні лише у 4 із 42 досліджуваних зразків ендометрія, що склало 9,52% випадків (p<0,001). Кількість зразків ендометрія, в яких було встановлено невисокі значення (>1,22 <2,23) відносної нормалізованої кількості, склало 15 (35,71%) випадків. Екс-

Таблиця 1

Специфічні пари праймерів для визначення мРНК Foxp3, Tbox21 (T-bet), GATA-3

Гени	Праймери	Температура плавлення (°C)	Довжина продукту ампліфікації	Екзонний перехід
FOXp3	F: 5'-TCTGCACCTCCCAAATCCC-3'	59,96	48	730/ 731
	R: 5'-AAAGGGTGTCTCCTCCCTG-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'-CACACTCCCTGCTCTGTG-3'	60,6		

пресія вища за медіану (>2,23) була виявлена у 21 зразку тканини ендометрія, що складало половину випадків — 50,01 %. Таким чином, у тканині ендометрія жінок досліджуваної групи у 88,1 % виявлялася підвищена експресія гена GATA-3 з перевагою високої експресії ($p < 0,001$).

При порівнянні T-bet та GATA-3 отримано статистично значущу відмінність ($p < 0,05$) у бік зростання рівня експресії T-bet. Співвідношення T-bet/GATA-3, згідно з отриманими результатами, складало 1,31. Однак підхід до інтерпретації цих даних не може бути буквальним, адже визначення мРНК проводилось із розрахунком відносної нормалізованої кількості кДНК досліджуваних генів, а результати контрольної групи приймалися за «1» в обох випадках, тому співвідношення T-bet/GATA-3 в контрольній групі не може бути об'єктивно відображеним.

Враховуючи практично відсутність даних у літературі про нормальні рівні цих чинників, орієнтувались на єдину відому роботу групи D. Inman et. al. (2008) як на авторитетне джерело, які досліджували експресію T-bet та GATA-3 в ендометрії здорових жінок у різні фази менструального циклу. Відповідно до даних D. Inman et. al., у проліферативну фазу менструального циклу (саме в цій фазі проводилось дослідження даних хворих) співвідношення було 5 частин T-bet до 1 частини GATA-3 [20]. Таким чином, незважаючи на зростання відносної нормалізованої кількості кДНК обох досліджуваних транскрипційних чинників, слід говорити про переважне зростання GATA-3 та зниження співвідношення T-bet/GATA-3, що збігається з висновками P. Chen et. al. (2012) [21]. Інших робіт, на які можна було б орієнтуватись, в медичних та біологічних базах знайдено не було (нами на попередніх етапах було встановлено зміни цитокінів перитонеальної рідини, які повністю корелюють з отриманими результатами змін на рівні транскрипційних чинників [22]).

Імуногенетичні чинники можуть визначати відображення не лише прояву ознаки, але й ступеня її прояву [15-17]. Тому були досліджені зміни вираження маркерів диференціювання Th1 та Th2 залежно від вираженості морфологічних проявів ендометріозу — стадій захворювання (табл. 3).

Статистичні відмінності відносної нормалізованої експресії мРНК T-bet були знайдені лише між групами з легким та важким перебігом ендометріозу ($p^3 < 0,001$), однак тенденції свідчать про зниження цього показника прямо пропорційно зростанню ступеня ендометріозних уражень (табл. 3).

При порівнянні між групами з різними ступенями ендометріозу рівня експресії мРНК GATA-3 отримано тенденції до зростання прямо пропорційно до збільшення ступеня важкості ендометріозу (табл. 3). Проте вірогідна різниця ($p^3 < 0,05$) була лише між групами з легким та важким пе-

Таблиця 3

Експресія мРНК T-bet, GATA-3 та співвідношення в тканині ендометрія хворих із різними ступенями важкості ендометріозу (M±m)

№	Групи хворих	Показники		
		T-bet	GATA-3	T-bet/GATA-3
1	1-а група: жінки з ендометріозом легкого ступеня («малі» форми) (n=16)	5,14±0,48	2,11±0,21	3,12
2	2-а група: жінки з ендометріозом середнього ступеня (n=11)	3,13±0,31	2,49±0,32	1,8
3	3-я група: жінки з ендометріозом важкого ступеня (n=15)	2,48±0,26	3,43±0,44	1,08
	P	$p^1 > 0,05$ $p^2 > 0,05$ $p^3 < 0,001$	$p^1 > 0,05$ $p^2 > 0,05$ $p^3 < 0,05$	$p^1 > 0,05$ $p^2 > 0,05$ $p^3 < 0,05$

Примітки: p — відображає статистичну вірогідність різниці між показниками досліджуваної та контрольної груп; $p < 0,05$, $p < 0,01$ — вірогідна різниця, $p > 0,05$ — немає вірогідної різниці. p^1 — вірогідність різниці між показниками 1-ї та 2-ї групи, p^2 — вірогідність різниці між показниками 2-ї та 3-ї групи, p^3 — вірогідність різниці між показниками 1-ї та 3-ї групи.

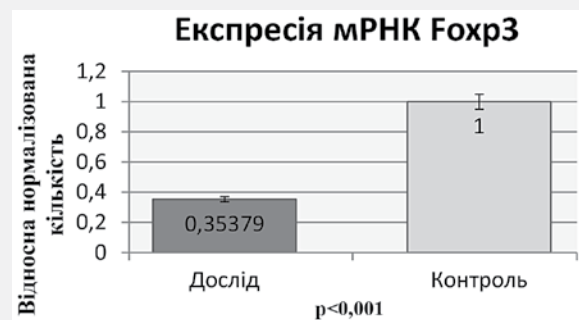
ребігом ендометріозу, що свідчить про відмінності лише при значних різницях у ступені ендометріозного ураження (як відомо, класична класифікація ступенів важкості ендометріозу базується на кількості та площі морфологічних елементів еktopічних розростань).

Співвідношення T-bet/GATA-3 також мало статистично значущу різницю лише у порівнянні першої та третьої групи та демонструвало зниження цього математичного співвідношення прямо пропорційно зростанню ступеня важкості ендометріозу.

Встановлено, що експресія мРНК Foxp3 в ендометрії безплідних жінок з ендометріозом була значно зниженою порівняно з показниками контрольної групи ($p < 0,001$) — див. рис.

Рисунок

Відносна нормалізована кількість кДНК гена Foxp3 в тканині ендометрія жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном GAPDH



Умовно діапазони коливань показника виділено у наступні групи: вищі, ніж у контрольній групі, пограничні, більші від медіани (незначні відхилення) та менші від медіани (значні відхилення). Діапазон всіх отриманих значень відносної нормалізованої кількості експресії гена Foxp3 складає 0,11-1,12 (медіана — 0,46). Значення відносної нормалізованої кількості вищі, ніж у контрольній групі ($>1 < 1,12$), були виявлені лише у 2 зразках тканини ендометрія, що складало 4,76%. Пограничні значення (0,997-0,994) також були виявлені у 2 (4,76%) випадках. Коливання діапазонів значень вищі за медіану (0,88-0,46) спостерігалися в 35,71% випадків, тоді як значення нижчі за медіану ($<0,46$), які демонстрували найбільші відхилення від контролю, спостерігалися у 52,38% всіх досліджуваних зразків тканини ендометрія ($p < 0,05$). Таким чином, зниження відносної нормалізованої експресії Foxp3 були виявлені у 88,09% випадків усієї вибірки з переважанням значних відхилень ($p < 0,001$).

Водночас рівні відносної нормалізованої експресії мРНК Foxp3 не продемонстрували статистично вірогідної різниці між групами пацієнток із легким, середнім та важким ступенями ендометріозу ($p > 0,05$), що ще раз підтверджує роль цього показника у спільній для всієї вибірки ознаки — безплідді.

Отже, можна зробити висновок, що прогресування ендометріозу відбувається на тлі змін транскрипційної програми на рівні одного з етапів сигнального шляху диференціювання T-хелперів, що спричиняє порушення механізмів імунологічного контролю над розростаннями ектопій. Результати підтверджують припущення багатьох авторів про захисну роль імунних функцій, зумовлених Th1, за ендометріозу та про декомпенсацію або поляризацію у бік іншого типу запальної відповіді в процесі прогресування захворювання. Підвищення експресії T-bet на «старті» захворювання у пацієнток із «малими» формами ендометріозу можна трактувати двояко — якщо брати за основу те, що ендометріоз обов'язково буде прогресувати, то підвищення експресії T-bet є визначальним для розвитку захворювання з по-

дальшою декомпенсацією або переключенням під впливом мережі інших транскрипційних чинників. Але якщо взяти за основу, що першочергово ендометріоз розвивається за сценаріями «легкий», «середній», «важкий» перебіг, то, очевидно, протизапальна спрямованість T-bet-регульованої імунної відповіді є захисною.

Особливість характеру експресії GATA-3 можна трактувати з позицій прийнятої багатьма авторами концепції автоімунного компоненту при ендометріозі, вираженість якого, ймовірно, наростає в процесі збільшення стадії патологічного ураження. Якщо прийняти таке припущення, то, ймовірно, зростання експресії GATA-3 через активацію диференціації Th2 запускає гуморальний тип імунної відповіді.

Зниження експресії мРНК Foxp3 є виразом недостатності функції регуляторних T-лімфоцитів. Це, у свою чергу, може підтримувати імунологічну толерантність відносно ендометріїдних ектопій та сприяти їх росту поза межами фізіологічної локалізації. З іншого боку, сприйнятливості ендометрія до імплантації вимагає адекватної імунологічної толерантності для захисту ембріона від імунного відторгнення з боку материнської імунної відповіді [23-25]. Зокрема, є роботи, в яких показано, що експресія мРНК FoxP3 в ендометрії жінок із безпліддям нез'ясованого генезу у двічі нижча, ніж у здорових жінок, що чітко вказує на роль T-регуляторних лімфоцитів у розвитку безпліддя [26, 27].

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

Надійшла до редакції 02.03.2016 р.

**Робота виконана в Буковинському державному медичному університеті на клінічній базі Центру лікування безпліддя. Попередні дослідження проводилися у Львівському національному університеті ім. Д. Галицького, безпосередньо ПЛР тканини ендометрія проводилась в молекулярно-генетичній лабораторії Запорізького державного медичного університету.*

***Подяки: висловлюємо щирі подяки професору Олександрі Михайлівчич Юзьку та директору Центру лікування безпліддя, доценту Тамарі Анатоліївні Юзько за допомогу в підборі і дослідженні пацієнтів.*

Список використаної літератури

1. Burney R.O. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis / R.O. Burney, L.C. Giudice // Fertil. Steril. — 2012. — Vol. 98. — P. 511-519.
2. Acién P. Endometriosis: A Disease That Remains Enigmatic [Електронний ресурс] / P. Acién, I. Velasco // Obstet. Gynecol. — 2013. Режим доступу: <http://www.hindawi.com/journals/ism/2013/242149/>
3. Kuama C.M. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis / C.M. Kuama, S. Debrock, J.M. Mwenda et al. // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2003. — № 1. — P. 123.
4. Koninckx P.R. Anti-TNF- α 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.
5. 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.
6. Yang Zhuo Ou. Interleukin-4 Stimulates Proliferation of Endometriotic Stromal Cells / Z.O. Yang, Y. Hirota, Y. Osuga, K. Hamasaki et al. // Am. J. Pathol. — 2008. — Vol. 173 (2). — P. 463-469.



7. 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>
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Li X. The Diagnostic Value of Transcription Factors T-bet/GATA3 Ratio in Predicting Antibody-Mediated Rejection [Електронний ресурс] / X. Li, Q. Sun, M. Zhang, J. Chen, Z. Liu // *Clin. Dev. Immunol.* — 2013. — Vol. 2013. — P. 4603-4616. Режим доступу: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2013/460316/>
17. Ze-Wei Lin. The Expression Levels of Transcription Factors T-bet, GATA-3, ROR γ t 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/>
18. 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.
19. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? / G. Chaouat // *Semin. Immunopathol.* — 2007. — № 29. — P. 95-113.
20. Cyclic Regulation of T-Bet and GATA-3 in Human Endometrium / D. Inman, K. Kawana, D. Schust [et al.] // *Reprod. Sci.* — 2008. — Vol. 15, № 1. — P. 83-90.
21. 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.
22. 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.
23. André G.M. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis / G.M. André, C.P. Barbosa, J.S. Teles, et al. // *Fertility and Sterility*. — 2011. — Vol. 95. — Iss. 7. — P. 2223-2227.
24. 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.
25. 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.
26. Teles A. Control of Uterine Microenvironment by Foxp3+ Cells Facilitates Embryo Implantation [Електронний ресурс] / A. Teles, A. Schumacher, M. — C. Kühnle et al. // *Front. Immunol.* — 2013. — Vol. 4. Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689029/>
27. 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.

The changes of immune regulation of immune response in endometriosis associated with infertility

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

Summary

The aim of the study was to establish changes in the regulation of immune response in endometriosis-associated infertility by identifying the factors regulating the expression of differentiation of Th1, Th2 and Treg cells in the endometrial tissue. Materials and methods: mRNA expression Tbet, GATA-3, Foxp3 examined by polymerase chain reaction (PCR) in 42 endometrial tissue of women with endometriosis associated with infertility and 12 women with infertility of tubal origin. Results: The mRNA expression revealed growth T-bet and GATA-3 with decreased Foxp3 mRNA expression in endometrial tissue of women who have endometriosis associated with infertility. Conclusions: The observed changes indicate a breach immunogenetic regulation of the immune response in endometriosis-associated infertility dominated the activation of T-helper type 2 with reduced activity of T regulatory cells.

Keywords: endometriosis, infertility, T-helper cells, mRNA, T-bet, GATA-3, Foxp3.