

# ЕКСПРЕСІЯ мРНК ГЕНІВ ЗАПАЛЬНОГО КОМПОНЕНТУ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ В ПЕРІОД ПЕРЕДБАЧУВАНОВОГО ВІКНА ІМПЛАНТАЦІЇ У ЖІНОК ЗІ ЗВИЧНИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ В ПРОГРАМАХ ДРТ



## К.П. ГОЛОВАТЮК

к. мед. н., директор ТОВ «Медичний центр репродуктивного здоров'я «Гамета», м. Одеса  
ORCID: 0000-0002-9033-3583

## В.Г. ДУБІНА

д. мед. н., професор кафедри онкології з курсом променевої діагностики, терапії та радіаційної медицини Одеського національного медичного університету  
ORCID: 0000-0002-8405-4457

## О.М. НОСЕНКО

д. мед. н., професор кафедри акушерства та гінекології №1 ОНМедУ  
ORCID: 0000-0002-7089-2476

## Е.Т. МАКШАЄВА

к. мед. н., завідувачка молекулярно-генетичною лабораторією ТОВ «Медичний центр репродуктивного здоров'я "Гамета"», м. Одеса  
ORCID: 0000-0001-7578-6747

## І.Л. ГОЛОВАТЮК-ЮЗЕФПЛЬСЬКА

к. мед. н., асистент кафедри акушерства та гінекології №1 ОНМедУ, головний лікар пологового будинку №1 м. Одеси  
ORCID: 0000-0002-9144-9676

### Контакти:

Головатюк Катерина Петрівна  
Медичний центр репродуктивного здоров'я «Гамета»  
65039, Одеса, Сліпниова, 3-А  
тел.: +38 (048) 738 68 69  
e-mail: info@gameta.od.ua

## ВСТУП

Звичний викидень виникає у 1–5% вагітностей [3] і визначається як виникнення двох або більше втрат вагітності до 20-го тижня. Після програм допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) понад 50% вагітних стикаються з проблемою звичного невиношування вагітності (ЗНВ), особливо в першому триместрі [2]. ЗНВ обумовлено декількома чинниками, включаючи хромосомні, анатомічні, ендокринологічні, інфекційні та аутоімунні аномалії [1, 14].

## АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ТА ПОСТАНОВКА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

В останні роки численні дослідження виявили, що імунний дисбаланс в інтерфейсі між матерями та плодами відіграє певну роль у патогенезі ЗНВ, і, як вважають, взаємодія між масивом цитокінів сприяє здатності материнської імунної системи переносити генетично несумісний плід. Децидуальна тканина, важлива складова інтерфейсу мати-плід, містить децидуальні стромальні та імунні клітини, включаючи Т-клітини, клітини маткових природних кілерів і макрофаги [8]. Децидуальні клітини, які розвиваються з ендометрія, регулюються стероїдними гормонами яєчників після імплантації бластоцисти. Децидуальна тканина має важливе значення для імплантації зародку та організації його розвитку. Крім того, вона має функції живлення бластоцист, регулювання ендокринного середовища, регулювання вторгнення трофобласту та захисту ембріона від відторгнення матері, відіграючи важливу роль під час вагітності. В інтерфейсі мати-плід баланс місцевих прозапальних та протизапальних цитокінів важливий для успішної вагітності. Тому зміни у схемі експресії цитокінів в ендометрії в час передбачуваного вікна імплантації можуть призвести до запалення мікросередовища ендометрія, і як наслідок – до спонтанного абортів [9, 14, 15].

Найбільш інформативними маркерами при запаленні в ендометрії серед цитокінів є інтерлейкін-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), інтерлейкін-2 (IL-2), інтерлейкін-10 (IL-10), транскрипційний фактор Foxp3, toll-подібний рецептор-9 (TLR-9), клітинний маркер імунної системи – рецептор- $\alpha$  інтерлейкіну-2 (IL-2R $\alpha$ ) [1].

Мета проведеного дослідження – виявити особливості експресії мРНК-генів запального компонента імунної відповіді в період передбачуваного вікна імплантації у жінок із ЗНВ в програмах ДРТ.

## МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під наглядом перебувало 240 пацієнток основної групи (група Н) із ЗНВ в програмах ДРТ і 100 умовно здорових фертильних жінок контрольної групи (група К) з наявністю в анамнезі хоча б одних термінових пологів і відсутністю епізодів самовільного переривання вагітності. Всі пацієнтки були мешканками Південно-Західного регіону України.

У всіх жінок була проведена пайпель-біопсія ендометрія в період передбачуваного вікна імплантації. Зразки були заморожені при  $t = -70$  °C до проведення дослідження.

На основі методу зворотної транскрипції-полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) проведено дослідження представленості генів цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, транскрипційного фактора Foxp3, TLR9, IL-2R $\alpha$  [1].

При визначенні транскрипційного профілю генів імунної відповіді для виділення нуклеїнових кислот використовували набори «Проба НК» (Росія). Отримані клітини лизували в 4 М розчині гуанідинтіоціанату, нуклеїнові кислоти осаджували ізопропанолом в присутності соосаджувача з подальшим відмиванням етанолом і ацетоном. У зв'язку з наявністю в зразках тканини ендометрія використовували метод фенол-хлороформної екстракції [13]. Реакцію зворотної транскрипції (синтез комплементарної ДНК із отриманої РНК) проводили в обсязі 40 мкл. Як праймери для зворотної транскрипції використовували оригінальні специфічні олігонуклеотиди і зворотну транскриптазу M-MuLV. Реакцію проводили при  $t = 40$  °C протягом 30 хвилин з подальшою інактивацією зворотної транскриптази при  $t = 95$  °C протягом 5 хвилин. Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу з вимірюванням рівня флуоресценції по каналу FAM на кожному циклі при температурі відпалу праймерів. Реакцію ставили в двох повторах для кожної точки.

Нормування здійснювалося методом порівняння порогових циклів (Cp) для визначених

цитокінів (метод  $\Delta\Delta Cq$ ) за двома нормувальними генами (B2M, GUSB). B2M – ген  $\beta 2$ -мікроглобуліну, компонент легкого ланцюга головного комплексу гістосумісності класу I (MHC I), представлений на всіх ядерних клітинах організму людини (крім еритроцитів). GUSB – ген, що забезпечує продукцію ферменту  $\beta$ -глюкуронідази.

Відносний рівень експресії мРНК досліджуваних генів вираховували за формулою (1):

$$[I] = 2 \times (NF - C_{pi}),$$

де [I] – відносний рівень представленості мРНК досліджуваного гена,  $C_{pi}$  – значення порогового циклу відповідного досліджуваного гена в зразку, що визначається автоматично програмним забезпеченням приладу;

NF – фактор нормування, який вираховували за формулою (2):

$$NF = (1/2)_{(C_{pi}(B2M) + C_{pi}(GUSB))},$$

де  $C_{pi}$  – значення порогових циклів відповідних референсних генів у зразку, що визначаються автоматично програмним забезпеченням приладу.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми Microsoft Excel. Визначали середнє значення  $M$  і помилку стандартного відхилення SE. Для зіставлення двох груп за кількісними ознаками використаний U-критерій Манна-Уїтні. Різницю між групами вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Середній вік обстежених жінок групи Н склав  $29,80 \pm 0,30$  року, групи К –  $30,09 \pm 0,32$  року ( $p > 0,05$ ). Середня кількість випадків мимовільного переривання вагітності після проведення ДРТ в групі Н дорівнювала  $3,24 \pm 0,11$ , середній термін переривання вагітності –  $8,15 \pm 0,65$  тижнів.

При аналізі дослідженого транскрипційного профілю генів імунної відповіді в ендометрії в день передбачуваного вікна імплантації встановлено, що відносний рівень експресії мРНК генів IL-1 $\beta$ , IL-2, Foxp3, TLR9, IL-2Ra статистично значуще не відрізнявся у пацієток основної та контрольної груп (табл.).

Як видно з таблиці, в жінок із ЗНВ у період передбачуваного вікна імплантації відзначалися зміни транскрипційного профілю, пов'язані зі статистично значущим знижен-

Таблиця. Відносний рівень експресії мРНК досліджуваних генів,  $M \pm SE$

Ген	Група Н (n = 240)	Група К (n = 100)
IL-1 $\beta$	$15,35 \pm 0,22$	$15,99 \pm 0,19$
IL-2	$29,53 \pm 0,30$	$29,65 \pm 0,18$
IL-2Ra	$24,23 \pm 0,17$	$23,74 \pm 0,17$
IL-10	$22,67 \pm 0,27^*$	$23,84 \pm 0,15$
Foxp3	$22,26 \pm 0,22$	$21,13 \pm 0,33$
TLR-9	$22,34 \pm 0,17$	$22,43 \pm 0,15$

\* значуща різниця з показником групи К,  $p < 0,05$

ням рівня експресії мРНК гена IL-10 –  $22,67 \pm 0,27$  проти  $23,84 \pm 0,15$ .

IL-10 є Th2-цитокіном і, як відомо, селективно пригнічує Th1-опосередковану клітинну реакцію, інгібує продукцію запальних цитокінів [4], а також опосередковує інгібуючі ефекти Treg-клітин. Treg-клітини є суттєвими для підтримки імунологічної реакції на автоантигени та для пригнічення надмірних імунних реакцій [10–12], у тому числі при запаленні, які негативно впливають на організм людини. Treg-клітини секретують цитокін IL-10, який може інгібувати секрецію різних запальних цитокінів і пригнічувати активацію Th1 та Th17 клітин [7]. Зокрема, IL-10 здійснює сигнал-ефект через рецептор IL-10, що призводить до інгібування експресії білка Th17-цитокінів та ретиноевої кислоти залежного органного рецептору- $\gamma$  (ROR $\gamma$ t), що зменшує кількість продукованого IL-17 і запобігає збільшенню запальної та імунної реакції [6]. Тобто, IL-10 функціонує як життєво важливий міст, що пов'язує імунітет, плацентарний ангиогенез, запалення та гіпоксію в материнсько-плодовому інтерфейсі [5]. Отримане в нашому дослідженні зниження рівня експресії мРНК гена IL-10 підтверджує його роль у розвитку запалення при ЗНВ. Дані літератури також показують дефіцит кількості та/або функції Treg-клітин у випадках викиднів при ЗНВ [13, 16].

### ВИСНОВОК

ЗНВ при лікуванні безплідних жінок в програмах ДРТ тісно пов'язане зі змінами транскрипційного профілю ендометрія в період передбачуваного вікна імплантації, а також зі зниженням рівня експресії мРНК гена IL-10.

## EXPRESSION OF THE mRNA OF THE INFLAMMATORY COMPONENT OF THE IMMUNE RESPONSE IN THE PERIOD OF THE EXPECTED WINDOW OF IMPLANTATION IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS IN THE PROGRAMS OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

### INTRODUCTION

The usual miscarriage occurs in 1–5% of pregnancies [3], defined as the occurrence of two or more pregnancy loss before the 20th week of pregnancy. After supplementary reproductive technologies (ART), more than 50% of pregnant women are faced with the problem of the recurrent pregnancy loss (RPL), especially in the first trimester [2]. RPL is due to several factors, including chromosomal, anatomical, endocrinologic, infectious and autoimmune anomalies [1, 14].

### ANALYSIS OF LITERATURE DATA

#### AND RESPONSE TO THE RESEARCH TASK

In recent years, numerous studies have found that the imbalance in the maternal-fetal interface plays a role in the pathogenesis of RPL, and the interaction between the array of cytokines is believed to contribute to the ability of the maternal immune system to transfer genetically incompatible fetuses. Decidual tissue, an important component of the uterine and fetal interface, contains decidual stromal cells