

УДК 618.1-007.415-031.1-06:618.177:575.117
DOI: 10.24061/1727-0847.23.2.2024.28

О. В. Бакун

Кафедра акушерства та гінекології (зав. – проф. О. М. Юзько) закладу вищої освіти Буковинського державного медичного університету МОЗ України, м. Чернівці

ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНУ МРНК IL-1В У ЖІНОК З ГЕНІТАЛЬНИМ ЕНДОМЕТРІОЗОМ АСОЦІЙОВАНИМ ІЗ БЕЗПЛІДДЯМ

Резюме. Як відомо, ендометріоз розглядають як хронічне запальне захворювання. Саме завдяки IL1 можна провести асоціацію розвитку ендометріозу. Незважаючи на численну кількість досліджень виявлення та пошуку неінвазивних ранніх маркерів діагностики генітального ендометріозу, та лікування на сьогодні ця проблема залишається актуальною. Важливо запровадити ранню діагностику генітального ендометріозу з метою вчасної профілактики та лікування.

Мета дослідження. Дослідити рівень експресії генів мРНК IL-1 β у жінок з генітальним ендометріозом, асоційованим з безпліддям.

Матеріал і методи. Для аналізу експресії гену IL1 β та визначення відносної нормалізованої експресії мРНК IL1 β використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень методом ЗТ-ПЛР була фракція моноклеарних клітин, виділених з цільної крові хворих на ендометріоз. У цьому дослідженні ми провели ретроспективний аналіз медичних карток 30 жінок з безпліддям, які проходили програму допоміжних репродуктивних технологій. Основну групу становили 20 жінок з діагнозом зовнішній генітальний ендометріоз, які проходили допоміжні репродуктивні технології. Контрольна група охоплювала 10 жінок, у яких було безпліддя трубного генезу внаслідок попереднього запального захворювання, але за результатами комплексного клінічного та лабораторного обстеження вони були прирівняні до здорових жінок. Ці жінки віком від 21 до 42 років із середнім віком 29,75 років. Це дослідження було проведено в Буковинському державному медичному університеті та клініці «Yuzko Medical Center».

Результати. В основній групі рівень експресії генів мРНК IL-1 β становив $26,7877 \pm 0,01$, що був помітно вищим, ніж у жінок контрольної групи ($0,4512 \pm 0,01$). Отже, можна відмітити високий рівень експресії генів мРНК IL1 β в цільній крові жінок основної групи.

Висновки. Надзвичайно підвищена експресія генів мРНК IL-1 β свідчить про тісний зв'язок між патогенезом ендометріозу та запаленням.

Ключові слова: ендометріоз, допоміжні репродуктивні технології, безпліддя, IL-1 β , цитокіни, запалення, лікування.

Ендометріоз – це хронічний запальний стан, що характеризується розростанням тканини, яка подібна на слизову оболонку матки, поза маткою, зазвичай у таких ділянках, як очеревина, яєчники та шийка матки. Клінічні симптоми часто включають прогресуючу дисменорею, хронічний тазовий біль, глибоку диспареунію та безпліддя, що суттєво впливає на якість життя пацієнта [1]. Вважається, що приблизно 10 % жінок репродуктивного віку страждають на ендометріоз [2].

Як відомо, ендометріоз розглядають як хронічне запальне захворювання. Саме завдяки IL1 можна провести асоціацію розвитку ендометріозу.

Адже, родина цитокінів інтерлейкіну (IL)-1 пов'язане з імунною відповіддю та запаленням. Він складається з різних молекулярних форм: міжклітинний IL-1 α (IL-1F1), позаклітинний IL-1 β (IL-1F2), антагоніст рецептора IL-1 (IL-1Ra, IL-1F3). Нещодавні дослідження показали важливу роль сімейства цитокінів IL-1 у розладах, пов'язаних з ендометрієм, включаючи ендометріоз. Це хронічне естрогензалежне захворювання з невизначеним патогенезом, яке визначається як результат імплантації тканини ендометрію поза порожниною матки, переважно в черевну порожнину. Перитонеальна рідина жінок з ендометріозом створює специфічне мікроо-

точення, яке містить імунні клітини та їх секреторні продукти, і сприяє росту та розвитку ектопічної тканини ендометрію. Перитонеальні макрофаги у пацієнтів з ендометріозом відіграють вирішальну роль у підтримці імунної відповіді та запалення. Ці клітини виділяють різні місцеві продукти, такі як члени родини цитокінів IL-1, 8, 9. IL-1 є цитокіном, який є невід'ємною частиною генерації швидкої та потужної запальної відповіді епітеліальними клітинами матки. IL-1 є прототипом прозапального цитокіну, який регулює широкий спектр імунологічних процесів, а також відіграє важливу роль в ендометрії та репродуктивних функціях, особливо тих, що пов'язані з сприйнятливістю ендометрію та імплантацією. IL-1 β індукує системну та місцеву відповідь на патогенну інвазію або пошкодження тканин шляхом індукції транскрипції або підвищення стабільності мРНК широкого спектру прозапальних генів. IL-1 β є основним фактором ініціації передчасних пологів, пов'язаних з інфекцією, і пов'язаний із преєклампсією. Рівні IL-1 β підвищені в амніотичній рідині під час вагітності, ускладненої інтраамніотичною інфекцією, і IL-1 β може спричинити передчасні пологи. IL-1 β також може відігравати важливу роль у патофізіології ендометріозу, гінекологічного захворювання, пов'язаного з хронічним імунозапальним процесом. Було виявлено, що у жінок з ендометріозом моноцити периферійної крові, а також перитонеальні макрофаги більш активовані, ніж у здорових жінок, і декретують підвищені рівні IL-1 β . Підвищені концентрації IL-1 були виявлені в перитонеальній рідині жінок, які страждають на ендометріоз [3, 4]. Цитокіни – це регуляторні пептиди або глікопротеїни, які можуть вироблятися практично кожним типом клітин із ядром в організмі та мають плейотропну регуляторну дію на багато типів клітин [5, 6]. На відміну від гормонів, цитокіни зазвичай діють як паракринні та/або аутокринні сигнали, лише іноді потрапляючи в кровообіг, де вони можуть діяти як ендокринні медіатори [7]. Макрофаги є одними з основних продуцентів цитокінів, особливо інтерлейкінів-1 і 6 (IL-1, IL-6) і фактора некрозу пухлин- α (TNF α); це, ймовірно, не так за звичайних умов, а після стимуляції різними речовинами [8]. Інтерлейкіни розглядаються як модулятори клітинної проліферації та як, як індуктори інших цитокінів, як каскад при гострому запаленні [9]. Цитокіни, що виробляються в матковому середовищі, беруть участь в регуляції росту ендометрія шляхом стероїдно-клітинної та міжклітинної взаємодії [10]. Цитокіни також можуть сприяти патофізіології ендометріозу щонайменше двома способами, а саме шляхом посилення встановлення та проліферації ектопічних ендометріальних імпланта-

тів та шляхом впливу на секрецію цитокінів макрофагами, що може призвести до несприятливих змін. Цитокіни IL-1 β , IL-6 і TNF α представляють великий інтерес, оскільки вони частково гормонально регулюються і відіграють важливу роль як медіатори запалення. IL-1 бере участь у регуляції імунної відповіді та запалення. Існують дві різні форми IL-1, α і β , з подібною біологічною активністю [11]. IL-1 α присутній в ендометрії, як в епітеліальних, так і в стромальних клітинах, принаймні в пізній секреторній фазі [12]. IL-1 β має такий самий розподіл, зазвичай з'являється в менших кількостях. мРНК IL-1 β експресується в ендометрії у пізній секреторній фазі та відповідає рівню IL-1 β у сироватці крові, який змінюється протягом циклу з максимальними значеннями під час секреторної фази.

Мета дослідження: дослідити рівень експресії гену мРНК IL-1 β у жінок з генітальним ендометріозом, асоційованим з безпліддям.

Матеріал і методи. Для аналізу експресії гену IL-1 β і визначення відносної нормалізованої експресії мРНК IL-1 β використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень методом ЗТ-ПЛР була фракція мононуклеарних клітин, виділених з цільної крові хворих на ендометріоз. У цьому дослідженні ми провели ретроспективний аналіз медичних карток 30 жінок з безпліддям, які проходили програму допоміжних репродуктивних технологій. Основну групу становили 20 жінок з діагнозом зовнішній генітальний ендометріоз, які проходили допоміжні репродуктивні технології. Контрольна група охоплювала 10 жінок, у яких було безпліддя трубного генезу внаслідок попереднього запального захворювання, але за результатами комплексного клінічного та лабораторного обстеження вони були прирівняні до здорових жінок. Ці жінки віком від 21 до 42 років із середнім віком 29,75 років. Це дослідження було проведено в Буковинському державному медичному університеті та клініці «Yuzko Medical Center».

Результати дослідження та їх обговорення. Середній вік жінок контрольної групи (28,78 \pm 5,09 років) та основної групи 29,54 \pm 2,04 (p>0,05).

При аналізі залежно від ступеню тяжкості ендометріозу I та II стадії було об'єднано у так звані «малі» форми ендометріозу, або легкий ступінь, III стадія відповідала середній тяжкості ендометріозу, а IV – тяжкому ступеню захворювання.

Результати дослідження відносної нормалізованої експресії мРНК IL-1 β в цільній крові жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям, демонструє рисунок.

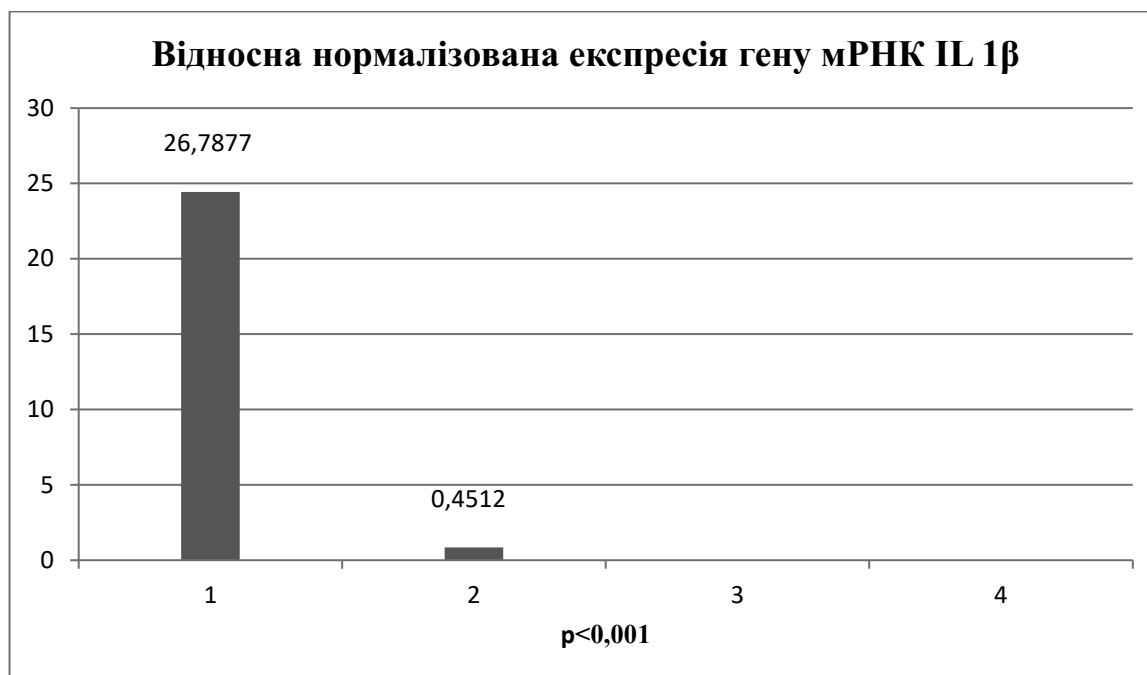


Рисунок. Відносна нормалізована експресія гену мРНК ІЛ-1β. Нормалізація за методом ΔΔCt з референс-геном Actin, βeta

На основі проведеного нами дослідження, встановлено, що експресія мРНК ІЛ-1β в крові жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям значно підвищена порівняно з показниками контрольної групи ($p < 0,001$).

Діапазон всіх отриманих значень відносної нормалізованої кількості мРНК гена ІЛ-1β становив 0,004-153,01 (медіана – 7,56). За для ширшої характеристики особливостей рівня експресії мРНК ІЛ-1β у крові жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям, а не лише обмеженням даних середнього значення, умовно, діапазони коливань показника виділено у наступні групи: пограничні з контрольною групою, нижчі від медіани (помірне зростання рівня мРНК експресії ІЛ-1β) та вищі від медіани (значне зростання рівня

мРНК експресії ІЛ-1β). Як видно, нижній діапазон значень гена ІЛ-1β нижчий за контроль, однак такий показник виміряний лише у 1 із 20 досліджуваних зразків крові, що становило 5 % випадків ($p < 0,001$). Результатів, що незначно вирізнялись від контролю ($>0,55$ - $<1,15$) отримано лише два, що становило 10 % ($p < 0,001$). Кількість зразків крові, у яких встановлено невисокі значення ($>1,15$ - $<7,56$) відносної нормалізованої експресії становило 5 випадків (25 %). Відносна нормалізована експресія вище медіани ($>7,56$) виявлена у 12 зразках крові, що становило більше половини випадків – 60 %. Отже, у зразках крові у 95 % жінок досліджуваної групи виявлялася підвищена експресія гена ІЛ-1β відносно контролю з перевагою високих значень ($p < 0,001$).

Таблиця

Порівняльна характеристика відносної нормалізованої експресії мРНК гена ІЛ-1β у крові жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям

| Групи | мРНК ІЛ-1β | p |
|--------------------|-----------------|----------|
| Досліджувана група | 26,47877 ± 0,01 | p < 0,05 |
| Контрольна група | 0,4512 ± 0,01 | * |

Примітка: Відносна нормалізована кількість мРНК гена ІЛ-1β. Нормалізація за методом ΔΔCt з референс-геном Actin beta $p < 0,05$ відображає вірогідну відмінність. * – нормалізація за відносною кількістю

Отже, отримані результати вказують на зростання у крові жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям, відносної нормалізованої кількості мРНК гена ІЛ-1β (таблиця).

Отримане підвищення експресії ІЛ-1β можна пояснити з позицій паттернів, які вони розпізна-

ють. Мікроорганізми з відповідними паттернами часто присутні в репродуктивному тракті при бактеріальних дисбіозах, причому частіше знаходяться мікробні агенти, що є лігандами для TLR2. Власне, з цієї позиції ми і пояснюємо отримані результати підвищення мРНК ІЛ-1β в крові жінок на ендоме-

тріоз. Дана гіпотеза підтверджується результатами мікробіологічного обстеження вагінального вмісту жінок досліджуваної групи, згідно яких виявлялися ознаки різного ступеня дисбіозу, а дані цитоморфологічного обстеження епітелію за ПАП тестом у 89,9 % жінок вказували на II тип, що демонстрував запальний процес у шийці матки або піхві.

У цьому дослідженні нашою основною метою було вивчити рівень експресії гену мРНК IL-1 β в цільній крові у пацієнтів з ендометріозом, асоційованим із безпліддям.

Ендометріоз – це поширене доброякісне гінекологічне захворювання, що характеризується наявністю ектопічного ендометрія, що викликає дисменорею, хронічний тазовий біль та безпліддя, а також пов'язані із запаленням та імунними порушеннями, а також зміни вироблення стероїдних гормонів яєчників. Ріст і підтримка ендометрія та ендометріюїдної тканини регулюється кількома цитокінами та факторами росту, такими як інтерлейкін (IL) 6, 8, фактор некрозу пухлин (TNF) α

та судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF). Ретроградна менструація в черевну порожнину через Фаллопієві труби відіграє важливу роль у патогенезі ендометріозу. Менструальна рідина складається з клітин крові, тканини ендометрія та відходами, які є джерелами клітин ендометрія. Однак, профіль біоактивних молекул у менструальній крові неясний.

Отже, наше дослідження мало на меті вивчити цей зв'язок та його потенційні наслідки для клініко-патологічних особливостей. Наші результати показують, що рівень експресії гену мРНК IL-1 β може слугувати неінвазивним маркером у жінок з ендометріозом, асоційованим із безпліддям.

Висновок. У крові жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям, спостерігається значне зростання рівня експресії мРНК гену IL-1 β .

Перспективи подальших досліджень. Дослідження рівня експресії мРНК IL-1 β в ектопічному ендометрії у жінок з ендометріозом, асоційованому із безпліддям.

Список використаної літератури

1. Zhu X, Jin L, Zou S, Shen Q, Jiang W, Lin W, et al. Immunohistochemical expression of RAGE and its ligand (S100A9) in cervical lesions. *Cell Biochem Biophys*. 2013 Jul;66(3):843-50. doi: 10.1007/s12013-013-9515-x.
2. Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression and function is down-regulated during monocyte-derived dendritic cell maturation with zymosan: involvement of IL-10 and prostaglandins. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6778-87. doi: 10.4049/jimmunol.0901800.
3. Chung HW, Lee SG, Kim H, Hong DJ, Chung JB, Stroncek D, et al. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *J Transl Med*. 2009 May 28;7:38. doi: 10.1186/1479-5876-7-38.
4. Lee H, Song M, Shin N, Shin CH, Min BS, Kim HS, et al. Diagnostic significance of serum HMGB1 in colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2012;7(4): e34318. doi: 10.1371/journal.pone.0034318. Epub 2012 Apr 4.
5. Sheng X, Du X, Zhang X, Li D, Lu C, Li Q, et al. Clinical value of serum HMGB1 levels in early detection of recurrent squamous cell carcinoma of uterine cervix: comparison with serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA levels. *Croat Med J*. 2009 Oct;50(5):455-64. doi: 10.3325/cmj.2009.50.455.
6. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Sep;58(9):2675-85. doi: 10.1002/art.23729.
7. Yun BH, Chon SJ, Choi YS, Cho S, Lee BS, Seo SK. Pathophysiology of Endometriosis: Role of High Mobility Group Box-1 and Toll-Like Receptor 4 Developing Inflammation in Endometrium. *PLoS One*. 2016 Feb 12;11(2): e0148165. doi: 10.1371/journal.pone.0148165. Erratum in: *PLoS One*. 2018 Sep 5;13(9): e0203741.
8. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response – the evidence mounts. *J Leukoc Biol*. 2009 Sep;86(3):505-12. doi: 10.1189/jlb.0409230. Epub 2009 May 28.
9. Kang R, Tang D, Schapiro NE, Loux T, Livesey KM, Billiar TR, et al. The HMGB1/RAGE inflammatory pathway promotes pancreatic tumor growth by regulating mitochondrial bioenergetics. *Oncogene*. 2014 Jan 30;33(5):567-77. doi: 10.1038/onc.2012.631.
10. Sun W, Jiao Y, Cui B, Gao X, Xia Y, Zhao Y. Immune complexes activate human endothelium involving the cell-signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis. *Lab Invest*. 2013 Jun;93(6):626-38. doi: 10.1038/labinvest.2013.61.
11. Mita S, Shimizu Y, Notsu T, Imada K, Kyo S. Dienogest inhibits Toll-like receptor 4 expression induced by costimulation of lipopolysaccharide and high-mobility group box 1 in endometrial epithelial cells. *Fertil Steril*. 2011 Dec;96(6):1485-9.e4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.09.040.

12. Yun BH, Chon SJ, Choi YS, Cho S, Lee BS, Seo SK. Pathophysiology of Endometriosis: Role of High Mobility Group Box-1 and Toll-Like Receptor 4 Developing Inflammation in Endometrium. *PLoS One*. 2016 Feb 12;11(2): e0148165. doi: 10.1371/journal.pone.0148165. Erratum in: *PLoS One*. 2018 Sep 5;13(9): e0203741.

DETERMINATION OF IL1 β MRNA GENE EXPRESSION IN WOMEN WITH GENITAL ENDOMETRIOSIS ASSOCIATED WITH INFERTILITY

Abstract. As you know, endometriosis is considered as a chronic inflammatory disease. It is thanks to IL that it possible to make an association with the development of endometriosis. Despite the large number of studies to identify and search for noninvasive early diagnostic markers of genital endometriosis, and treatment this problem remains relevant today. It is important to introduce early diagnosis of genital endometriosis for the purpose of timely prevention and treatment.

Objective: to study the level of IL-1 β mRNA gene expression in women with genital endometriosis associated with infertility.

Material and methods. To analyze gene expression IL-1 β and determination of relative normalized mRNA expression IL-1 β used the polymerase chain reaction method with real-time reverse transcription (RT-PCR). The object for molecular genetic studies by the RT-PCR method was the fraction of mononuclear cells isolated from the whole blood of patients with endometriosis. In this study, we performed a retrospective analysis of the medical records of 30 women with infertility undergoing an assisted reproductive technology program. The main group consisted of 20 women diagnosed with external genital endometriosis who underwent assisted reproductive technologies. The control group consisted of 10 women who had tubal infertility due to a previous inflammatory disease, but according to the results of a comprehensive clinical and laboratory examination, they were compared to healthy women. These women, aged 21 to 42 years, with a mean age of 29.75 years. This study was conducted at the Bukovynian State Medical University and the clinic «Yuzko Medical Center».

Results. In the main group, the IL-1 β mRNA gene expression level before was 26.7877 \pm 0.01, which was significantly higher than the level in women of the control group (0.4512 \pm 0.01*). Therefore, it is possible to note a high level of IL-1 β mRNA gene expression in the whole blood of women of the main group.

Conclusions. Extremely high expression of mRNA genes IL-1 β indicates a close connection between the pathogenesis of endometriosis and inflammation.

Key words: endometriosis, assisted reproductive technologies, infertility, IL-1 β , cytokines, inflammatory, treatment.

Відомості про автора:

Бакун Оксана Валеріанівна – кандидат медичних наук, доцент кафедри акушерства та гінекології закладу вищої освіти Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці.

Information about the author:

Bakun Oksana V. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology of the Higher Education Institution of Bukovinian State Medical University, Chernivtsi;

Надійшла 12.04.2024 р.

Рецензент – проф. О. В. Кравченко (Чернівці)