

УДК 618.39-021.3: 571.27

DOI: 10.18413/2075-4728-2018-41-1-24-29

## ТОЛЛ-ПОДОБНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЛИГАНДАМИ, В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ И САМОПРОИЗВОЛЬНЫХ ВЫКИДЫШЕЙ

### TOLL-LIKE RECEPTORS, ACTIVATED BY BACTERIAL LIGANDS, IN PATHOGENESIS OF MISSED AND SPONTANEOUS ABORTIONS

О.П. Лебедева, О.Н. Ивашова, И.О. Жукова, С.П. Пахомов  
O.P. Lebedeva, O.N. Ivashova, I.O. Zhukova, S.P. Pakhomov

Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
Россия, 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85

Belgorod National Research University, Russia, 308015, Belgorod, Pobedi St., 85

E-mail: safonova2@yandex.ru

#### Аннотация

Статья посвящена исследованию роли Толл-подобных рецепторов (TLR), активируемых бактериальными лигандами, в патогенезе неразвивающейся беременности и самопроизвольных выкидышей ранних сроков. Методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследована экспрессия мРНК TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10 в эндометрии у 34 пациенток с неразвивающейся беременностью, 34 пациенток с самопроизвольными выкидышами ранних сроков и 57 пациенток с прогрессирующей беременностью, поступивших для проведения медицинского аборта (контрольная группа). Срок беременности во всех группах составил 6-10 недель. Из исследования были исключены пациентки с эндокринными причинами невынашивания, тяжелыми экстрагенитальными заболеваниями и антифосфолипидным синдромом. В эндометрии пациенток и с неразвивающейся беременностью, и с самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК TLR6 (лиганд – липопептиды грамположительных бактерий) была достоверно ниже (0.026 (0.0003; 0.128) и 0.074 (0.013; 0.129) соответственно), чем в группе контроля (7.14 (0.15; 10.30) ( $p < 0.01$ )). Экспрессия в эндометрии пациенток обеих групп мРНК TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR10 не имела достоверных различий с группой контроля. Экспрессия в эндометрии мРНК TLR5 у пациенток с неразвивающейся беременностью была в 3 раза выше, чем в группе с самопроизвольными выкидышами, что, вероятно, связано с присутствием в эндометрии бактерий, содержащих флагеллин.

#### Abstract

The article describes the role of Toll-like receptors, activated by bacterial ligands, in pathogenesis of missed abortions and spontaneous miscarriages of early stages pregnancy. 34 patients with missed abortions, 34 patients with spontaneous abortions and 57 patients with progressive pregnancy (control group, admitted for medical abortion) were examined by quantitative polymerase chain reaction (PCR). Gestational age of termination of pregnancy in all cases was 6-10 weeks. Patients with endocrine diseases, severe extragenital disorders and antiphospholipid syndrome were excluded from research. Endometrial tissue was taken by uterine abrasion. Expression of mRNA of TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 in endometrium was performed by quantitative polymerase chain reaction (PCR). In endometrium of patients with missed abortions and with spontaneous miscarriages expression of mRNA of TLR6 (ligand – lipopeptides of gram-positive bacteria) was significantly lower (0.026 (0.0003; 0.128) and 0.074 (0.013; 0.129) accordingly), than in the control group (7.14 (0.15; 10.30)) ( $p < 0.01$ ). Expression of mRNA of TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR10 has no significant difference compared with control group. Expression of mRNA of TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR10 in endometrium of patients with missed and spontaneous abortion also has no significant difference compared with control group. Expression of mRNA of TLR5 was 3 times higher in patients with missed abortions compared with patients with spontaneous abortions, which may be because of the presence of flagellin-containing bacteria.

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность, самопроизвольный выкидыш, Толл-подобные рецепторы, TLR, эндометрий.

**Keywords:** missed abortion, spontaneous abortion, Toll-like receptors, TLR, endometrium.

### Введение

До 80% репродуктивных потерь происходят в I триместре беременности [Carp, 2012]. Случаи потери беременности могут быть обусловлены хромосомными аномалиями [Calleja-Agius et al., 2011], тромбофилиями, иммунными и эндокринными заболеваниями [Радзинский и др., 2009]. Одной из ведущих причин невынашивания является хронический эндометрит [Kitaya, 2011; Воропаева и др., 2009]. Однако во многих случаях причину самопроизвольных выкидышей установить не удастся [Kochhar, Ghosh, 2013]. Поэтому изучение причин невынашивания беременности остается одной из наиболее сложных проблем в акушерстве и гинекологии.

Система врожденного иммунитета способна отличать свое от чужого и обеспечивать иммунную толерантность путем активации Толл-подобных рецепторов (TLR), связывание с которыми приводит к секреции антимикробных пептидов, провоспалительных цитокинов, хемокинов, активации натуральных киллеров и лимфоцитов [Iwasaki, Medzhitov, 2015].

TLR, распознающие бактериальные структуры, являются мембранными рецепторами, которые через MyD88-зависимый сигнальный путь активируют синтез провоспалительных цитокинов [Medvedev, 2013]. TLR1, TLR2 и TLR6 распознают липопептиды грамположительных бактерий и грибов. TLR4 распознает липополисахариды грамотрицательных бактерий, TLR5 – бактериальный флагеллин (рис.1). Для TLR10 лиганд не установлен, однако предполагают, что он имеет бактериальную природу [Pandey et al., 2015]. Установлено, что TLR играют значительную роль в защите организма от инфекции во время беременности [Koga et al., 2014; Mor et al., 2017].

### Цель

Цель исследования – установить особенности экспрессии TLR, активируемых бактериальными лигандами (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10), в эндометрии пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами ранних сроков.

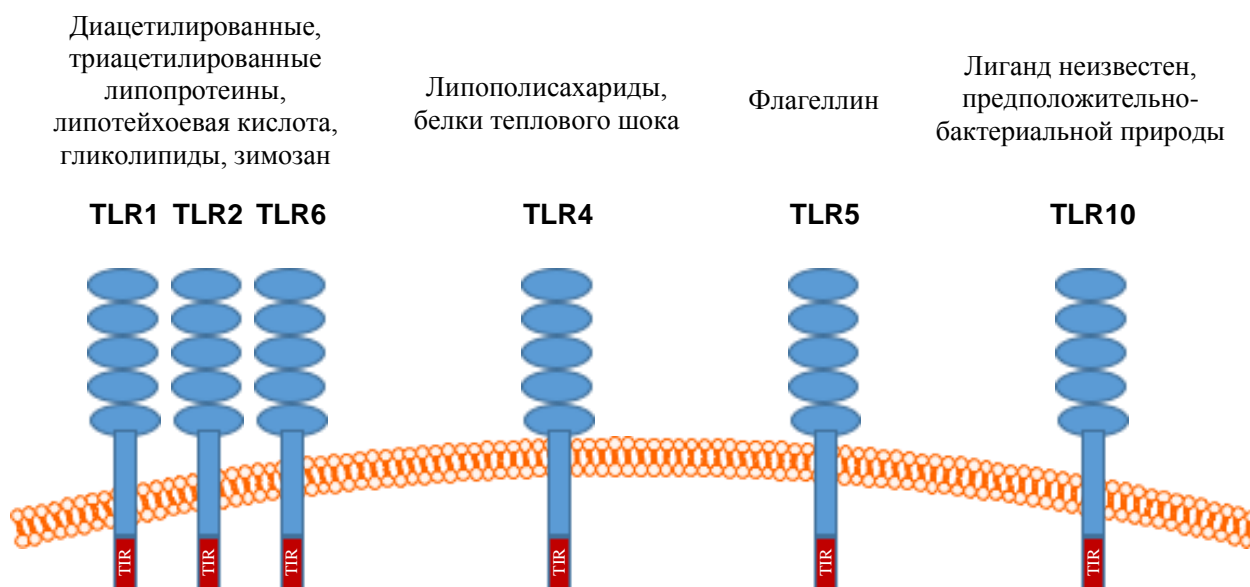


Рис. 1. Толл-подобные рецепторы, активируемые бактериальными лигандами  
Fig.1. Toll-like receptors, activated by bacterial ligands

### Объекты и методы исследования

Были обследованы 34 пациентки с неразвивающейся беременностью, 34 пациентки с самопроизвольными выкидышами и 57 пациенток, поступивших для проведения медицинского аборта. Срок беременности во всех группах составил 6–10 недель. Пациентки с эндокринными причинами невынашивания, тяжелыми экстрагенитальными заболеваниями и антифосфолипидным синдромом были исключены из исследования. Материалом для исследования являлась ткань эндометрия, которую получали при выскабливании полости матки.

Эпителиальные клетки помещали в консервирующий раствор (Ambion, USA). Экспрессию мРНК TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение РНК, обратную транскрипцию и амплификацию проводили по описанной ранее методике [Лебедева и др., 2015]. Последовательность праймеров подбирали в базе данных BLAST (NCBI, USA). В качестве генов-нормировщиков были выбраны наиболее стабильно экспрессируемые  $\beta$ -актин и пептидилпролилизомераза А.

Результаты вычисляли по формуле:

$$R = 2^{-((Cq_{target} - (Cq_{ref1} + Cq_{ref2})/2))}$$

Где R – нормализованная экспрессия мРНК изучаемого гена,  $Cq_{target}$  –  $Cq$  изучаемого гена,  $Cq_{ref1}$  и  $Cq_{ref2}$  –  $Cq$  генов-нормировщиков [Pffafel, 2002]. Результат выражали в относительных единицах (отн.ед.).

Статистическая обработка результатов была выполнена в программе Statistica 13.1 (StatSoft, USA), лицензия No.AXXR505C705306FAN12. Нормальность распределения оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Так как данные не подчинялись нормальному распределению, результаты представляли как медиану (нижний квартиль; верхний квартиль); достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при  $p < 0.05$ .

### Результаты и их обсуждение

У пациенток с неразвивающейся беременностью экспрессия мРНК TLR6 в эндометрии была достоверно выше, чем в контрольной группе (см. таблицу). Экспрессия в эндометрии пациенток с неразвивающейся беременностью мРНК TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR10 не имела достоверных различий с контрольной группой.

В эндометрии пациенток с самопроизвольными выкидышами экспрессия мРНК TLR6 была также выше, чем в группе пациенток с прогрессирующей беременностью. Экспрессия мРНК TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR10 не имела достоверных различий с группой контроля.

Экспрессия мРНК TLR5 при неразвивающейся беременности была в 3 раза выше, чем у пациенток с самопроизвольными выкидышами. Других достоверных различий между данными группами выявлено не было.

В литературе есть данные, которые касаются роли TLR, активируемых бактериальными лигандами, в патогенезе невынашивания беременности ранних сроков. В культуре клеток было показано, что стимуляция TLR4 липополисахаридами в I триместре приводит к незначительной продукции цитокинов. В то же время активация TLR2 пептидогликаном индуцирует преимущественно апоптоз клеток трофобласта, а не продукцию цитокинов [Abrahams et al., 2008; Ilievski et al., 2007]. В исследованиях на животных было установлено, что стимуляция TLR1/TLR2 пептидогликаном ведет к апоптозу трофобласта через активацию каспазы-3, в то время как стимуляция TLR6 может переключить тип ответа на синтез провоспалительных цитокинов через сигнальный белок NF- $\kappa$ B [Mor et al., 2011]. Таким образом, активация TLR6 защищает трофобласт от апоптоза. Поэтому недостаточная экспрессия TLR6 в эндометрии может привести к неразвивающейся беременности и самопроизвольным выкидышам из-за активации апоптоза.

Таблица  
Table

Экспрессия мРНК Толл-подобных рецепторов, распознающих бактериальные лиганды, в эндометрии у пациенток с неразвивающейся беременностью и самопроизвольными выкидышами на сроке 6-10 недель, Me (25%; 75%), отн. ед.

Expression of mRNA of Toll-like receptors, recognizing bacterial ligands, in endometrium of patients with missed and spontaneous abortions at 6-10 weeks of gestation, Me (25%; 75%), relative units

Ген	Пациентки с неразвивающейся беременностью (n=34)	Пациентки с самопроизвольными выкидышами(n=34)	Пациентки, поступившие для медаборта (контрольная группа) (n=57)	P 1-3	P 2-3	P 1-2
TLR1	9.16 (1.85; 53.08)	4.67 (1.33; 21.63)	6.68 (3.76; 23.92)	0.72	0.14	0.31
TLR2	0.73 (0.30; 1.46)	0.97 (0.29; 2.11)	0.55 (0.32; 0.88)	0.23	0.20	0.75
TLR4	0.19 (0.06; 0.35)	0.17 (0.06; 0.42)	0.18 (0.09; 0.33)	0.50	0.65	0.94
TLR5	0.0003 (0.0001; 0.0008)	0.0001 (0.00003; 0.0003)	0.0002 (0.00009; 0.0007)	0.32	0.11	0.04
TLR6	0.03 (0.0003; 0.13)	0.07 (0.01; 0.13)	7.14 (0.15; 10.30)	0.0001	0.0002	0.33
TLR10	1.59 (0.40; 2.97)	1.27 (0.73; 4.50)	1.40 (0.61; 3.08)	0.72	0.67	0.75

Данные о роли TLR5 в патогенезе осложнений беременности противоречивы. В культуре клеток было показано, что стимуляция TLR5 флагеллином не приводит увеличению уровня циклооксигеназы-2 и простагландинов соответственно [Salvi et al., 2016]. В то же время стимуляция TLR5 снижает адгезию трофобласта к клеткам эндометрия [Aboussahoud et al., 2010], что происходит за счет продукции хемокинов (интерлейкина-8 и моноцитарного хемотаксического протеина) [Aboussahoud et al., 2010]. В нашем исследовании не было выявлено достоверных различий в экспрессии TLR5 между пациентками с невынашиванием и группой контроля. Но пациентки с неразвивающейся беременностью имели достоверно более высокую экспрессию TLR5 по сравнению с женщинами, у которых произошел самопроизвольный выкидыш. Можно предположить, что увеличение TLR5 у пациенток с неразвивающейся беременностью может быть связано с наличием микроорганизмов, содержащих флагеллин (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Clostridium*) [Haiko, Westlund-Wikstrom, 2013].

### Заключение

И у пациенток с неразвивающейся беременностью, и у пациенток с самопроизвольными выкидышами ранних сроков было выявлено значительное снижение экспрессии мРНК TLR6 в эндометрии по сравнению с контрольной группой (пациентки с прогрессирующей беременностью, поступившие для проведения медицинского аборта). Известно, что TLR6 защищает клетки от апоптоза, поэтому снижение его экспрессии может привести к клеточной гибели и как следствие – к выкидышу.

Экспрессия мРНК TLR5 не имела достоверных различий у пациентов двух изученных групп по сравнению с контролем, однако была достоверно выше у пациенток с неразвивающейся беременностью по сравнению с женщинами с самопроизвольными выкидышами. Возможно, это связано с присутствием в эндометрии микроорганизмов, содержа-

щих флагеллин (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Clostridium*) у пациенток с неразвивающейся беременностью. Экспрессия в эндометрии мРНК TLR1, TLR2, TLR4 и TLR10 у пациенток с невынашиванием не имело достоверных различий с группой контроля. Полученные данные в дальнейшем могут быть использованы для профилактики невынашивания беременности ранних сроков.

### Благодарность

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МД-2326.2017.7.

### Список литературы References

1. Воропаева Е.Е., Медведев Б.И., Коваленко В.Л., Казачков Е.Л., Казачкова Э.А. 2009. Клинико-морфологические аспекты синдрома потери беременности ранних сроков инфекционно-воспалительного генеза. Уральский медицинский журнал, 3 (57): 21-25.  
Voropaeva E.E., Medvedev B.I., Kovalenko V.L., Kazachkov E.L., Kazachkova E.A. 2009. Kliniko-morfologicheskie aspekty sindroma poteri beremennosti rannih srokov infekcionno-vozpалitel'nogo geneza [Clinico-morphological aspects of the syndrome of loss of pregnancy of early terms by infectionally-inflammatory genesis]. Ural medical journal, 3 (57): 21-25. (in Russian)
2. Лебедева О.П., Пахомов С.П., Ивашова О.Н., Старцева Н.Ю., Чурносков М.И. 2015. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета в индукции апоптоза при невынашивании беременности ранних сроков. Акушерство и гинекология, 2: 39-43.  
Lebedeva O.P., Pakhomov S.P., Ivashova O.N., Starceva N.Y., Churnosov M.I. 2015. Signal'nye receptory vrozhdennogo immuniteta v indukcii apoptoza pri nevyvashivanii beremennosti rannih srokov [Innate immunity signaling receptors in the induction of apoptosis in early miscarriages]. Akusherstvo i ginekologiya, 2: 39-43. (in Russian)
3. Радзинский В.Е., Димитрова В.И., Майскова И.Ю. 2009. Неразвивающаяся беременность. М., ГЭОТАР-Медиа, 196.  
Radzinskij V.E., Dimitrova V.I., Majskova I.Ju. 2009. Nerazvivajushhajasja beremennost' [Missed abortion]. Moscow, GEOTAR-Media, 196. (in Russian)
4. Aboussahoud W., Aflatoonian R., Bruce C., Elliott S., Ward J., Newton S., Hombach-Klonisch S., Klonisch T., Fazeli A. 2010. Expression and function of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cell lines. Journal of reproductive immunology, 84 (1): 41-51.
5. Aboussahoud W., Bruce C., Elliott S., Fazeli A. 2010. Activation of Toll-like receptor 5 decreases the attachment of human trophoblast cells to endometrial cells in vitro. Human reproduction, 25: 2217-2228.
6. Abrahams V.M., Aldo P.B., Murphy S.P., Visintin I., Koga K., Wilson G., Romero R., Sharma S., Mor G. 2008. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. J. Immunol., 180: 6035-6043.
7. Calleja-Agius J., Jauniaux E., Pizzey A.R., Muttukrishna S. 2011. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. Human reproduction, 27 (2): 349-357.
8. Carp H.J.A. 2012. Systematic review of dydrogesterone for treatment of threatened miscarriage. Gynecol. Endocrinol., 28: 938-990.
9. Haiko J., Westerlund-Wikström B. 2013. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. Biology, 2 (4): 1242-1267.
10. Ilievski V., Lu S. J., Hirsch E. 2011. Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse. Reproductive Sciences, 14 (4): 315-320.
11. Iwasaki A., Medzhitov R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system Nature immunology, 16 (4): 343-353.
12. Kitaya K. 2011. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages. Fertil. Steril., 95: 1156-1158.
13. Kochhar P.K., Ghosh P. 2013. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 39 (1): 113-120.

14. Koga K., Izumi G., Mor G., Fujii T., Osuga Y. 2014. Toll-like Receptors at the Maternal-Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Complications. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(2): 192-205.
15. Medvedev A. E. 2013. Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33 (9): 467-484.
16. Mor G., Cardenas I., Abrahams V., Guller S. 2011. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.*, 1221: 80–87.
17. Mor, G., Aldo, P., Alvero, A. B. 2017. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17 (8): 469-482.
18. Pandey S., Kawai T., Akira, S. 2015. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7 (1), a016246.
19. Pfaffl M.V., Relative quantification. 2002. In: *Real Time PCR*. Int. University Line: 63-82.
20. Salvi V., Vaira X., Gianello V., Vermi W., Bugatti M., Sozzani S., Bosisio D. 2016. TLR Signalling Pathways Diverge in Their Ability to Induce PGE<sub>2</sub>. *Mediators of Inflammation*, 5678046.