

## **РОЛЬ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА, ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПОСЛЕРОДОВОГО ЭНДОМЕТРИТА**

**О.П. ЛЕБЕДЕВА<sup>1</sup>**  
**Н.И. САМБОРСКАЯ<sup>1</sup>**  
**В.Ю. БАШМАКОВ<sup>2</sup>**  
**С.П. ПАХОМОВ<sup>1</sup>**  
**В.Н. ПОПОВ<sup>2</sup>**  
**М.И. ЧУРНОСОВ<sup>3</sup>**  
**П.В. КАЛУЦКИЙ<sup>3</sup>**  
**О.Н. ИВАШОВА<sup>1</sup>**  
**П.Г. ДОВГИЙ<sup>1</sup>**  
**П.А. КАРПОВ<sup>1</sup>**

<sup>1)</sup> *Белгородский государственный национальный исследовательский университет*

<sup>2)</sup> *Воронежский государственный университет*

<sup>3)</sup> *Курский государственный медицинский университет*

*e-mail: safonova2@yandex.ru*

Статья посвящена роли Толл-подобных рецепторов (TLR) и ферментов антиоксидантной системы в развитии послеродового эндометрита.

Установлено, что у пациенток с послеродовым эндометритом наблюдается значительное снижение экспрессии TLR4 и TLR5, что способствует развитию воспалительного процесса даже при небольшом количестве патогена. Снижение уровня супероксиддисмутазы может способствовать большей деструкции тканей и утяжелению клинического течения эндометрита.

Ключевые слова: Толл-подобные рецепторы, врожденный иммунитет, супероксиддисмутазы, каталаза, послеродовый эндометрит.

Послеродовый эндометрит занимает лидирующее положение среди всех послеродовых гнойно-воспалительных заболеваний, составляя 6-8% после нормальных родов и до 15-20% после патологических [1]. Актуальность проблемы послеродового эндометрита связана с тем, что он приводит к повышению затрат на лечение пациенток, увеличению продолжительности их пребывания в стационаре. Акушерский перитонит, развившийся на фоне послеродового эндометрита, является показанием для экстирпации матки, что делает невозможным дальнейшее выполнение женщиной репродуктивной функции. В дальнейшем у пациенток, перенесших послеродовый эндометрит, возможно развитие бесплодия и невынашивания беременности.

Проблема своевременной диагностики послеродового эндометрита до сих пор остается актуальной, что связано с увеличением стертых и abortивных форм заболевания, составляющих до 40% [2]. При этом данные бактериологического исследования не всегда являются информативными, так как выделение возбудителя не всегда возможно из-за погрешностей в сборе и доставке материала и видового состава микроорганизмов (в частности, если это анаэробные бактерии). Также не всегда возможно спрогнозировать развитие эндометрита, если возбудитель выявляется в небольших количествах, так как в этом случае развитие воспаления зависит от иммунореактивности организма.

Наиболее пристального внимания заслуживает система врожденного иммунитета слизистых, которая является первым барьером на пути проникновения патогена. Первыми рецепторами, распознающими лиганды возбудителей, являются Толл-подобные рецепторы (TLR), расположенные на эпителиоцитах, макрофагах и дендритных клетках. Связываясь с лигандами, они запускают синтез в эпителии цитокинов, антимикробных пептидов, способствуют рекрутингу нейтрофилов в очаг воспаления [ ].

Кроме того, на тяжесть воспалительного процесса и степень деструкции тканей влияет состояние антиоксидантной системы, обеспечивающей защиту свободных радикалов. Наиболее важными ферментами антиоксидантной системы являются

ся супероксиддисмутаза и каталаза. Супероксиддисмутаза (SOD) – это фермент, катализирующий превращение супероксида в кислород и перекись водорода. Существует 3 типа SOD – цитоплазматическая (SOD1), митохондриальная (SOD2) и внеклеточная (SOD3). Супероксиддисмутаза обладает самой высокой известной каталитической скоростью реакции из всех известных ферментов с антиоксидантной активностью [11, 12]. Каталаза – это фермент, катализирующий разложение перекиси водорода на воду и кислород [8].

**Цель работы:** оценить роль Толл-подобных рецепторов 1, 2, 4 и 5 и ферментов антиоксидантной системы SOD3 и каталазы в патогенезе послеродового эндометрита.

**Материалы и методы.** Основную группу составили 48 пациенток с признаками послеродового эндометрита, контрольную – 56 пациенток с нормально протекающим послеродовым периодом. Все пациентки были родоразрешены через естественные родовые пути. Группы были сопоставимы по возрасту и паритету, на момент обследования у них отсутствовали тяжелые формы гестоза, экстрагенитальной патологии, острые и обострения хронических заболеваний.

Материалом для оценки экспрессии Толл-подобных рецепторов служили эпителиальные клетки, взятые из цервикального канала на 3-4 сутки послеродового периода. Полученный материал помещали в консервирующую среду RNeasy Lysis Buffer (“Ambion”, США), пробирки оставляли в холодильнике при температуре 4 °C на 1 сутки, затем помещали в морозильную камеру и в дальнейшем хранили при температуре – 28 °C.

Выделение, обратную транскрипцию и количественную ПЦР в режиме реального времени проводили согласно рекомендациям MIQE [6].

После размораживания проб экстракцию РНК выполняли методом фенол-хлороформной экстракции по методу Chomchinsky P. and Sacchini N. (1987) [7], с использованием реагента Тризол (“Invitrogen”, США). Качество РНК проверяли методом электрофореза в агарозном геле. Для удаления геномной ДНК использовали набор DNase I RNase free (“Fermentas”, США). Для проведения обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу Mint (“Евроген”, Россия) и oligoDT, в реакцию вносили 500 нг мРНК.

Для количественной ПЦР был произведен подбор специфических праймеров в базе данных Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Реакцию ПЦР проводили с использованием смеси qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия) с интеркалирующим красителем SYBR I. В качестве генов-нормировщиков были выбраны бета-актин (beta-actin) и пептидилпропилизомераза A(PPIA). Количественную ПЦР проводили на амплификаторе SFX96 (“Bio-rad”, США).

Полученные результаты выражали в относительных единицах (relative units, RU), вычисляя их по формуле в которой учитывается среднее арифметическое значение двух генов – нормировщиков.

$$R = \frac{2^{-\Delta C_P \text{ target (MEAN control - MEAN sample)}}}{2^{-\Delta C_P \text{ Ref index (MEAN control - MEAN sample)}}},$$

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica 6.0».

**Результаты.** Средний возраст женщин основной группы составил 27,8±7,8 года, средний возраст группы контроля 25,2±5,7 года. Доля первородящих в основной группе составила 62%, в контрольной – 56%.

Было установлено, уровни экспрессии TLR1 и TLR2 (лиганды – липопротеины и липополисахариды бактерий) в обеих группах достоверно не отличались (рис.1).

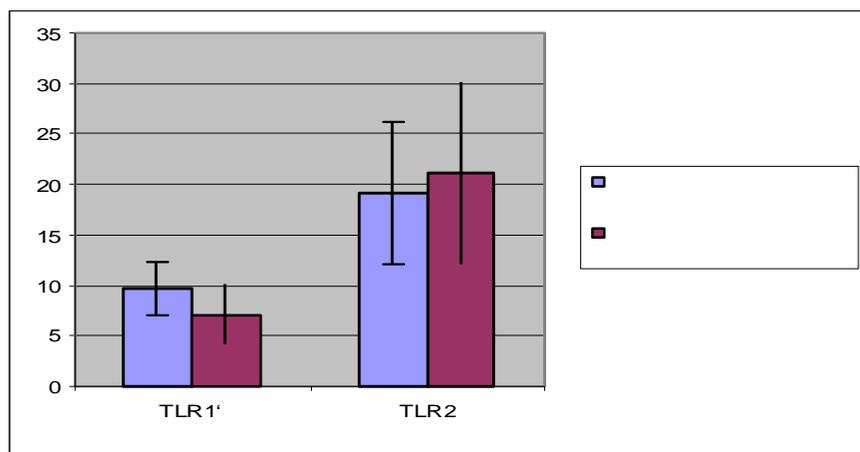


Рис. 1. Уровень экспрессии Толл-подобных рецепторов 1 и 2 в норме и у пациенток с послеродовым эндометритом

Однако у пациенток с послеродовым эндометритом наблюдалось снижение местной иммунореактивности за счет уменьшения экспрессии TLR4 (лиганд – липополисахариды грамотрицательных бактерий) и TLR5 (лиганд – флагеллин бактерий). (рис. 2).

У пациенток с послеродовым эндометритом наблюдалось достоверное снижение уровня экспрессии мРНК супероксиддисмутазы ( $0,173 \pm 0,052$  у женщин с эндометритом против  $0,576 \pm 0,182$  у пациенток группы контроля) ( $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии мРНК каталазы достоверно не изменялся.

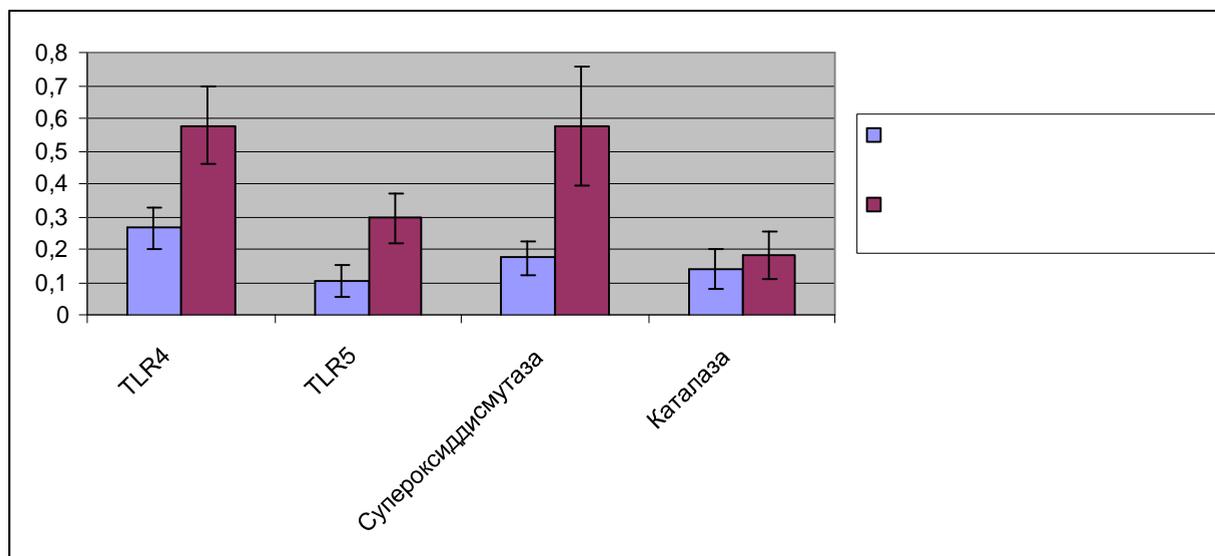


Рис. 2. Уровень экспрессии антиоксидантных ферментов и Толл-подобных рецепторов 4 и 5 в норме и у пациенток с послеродовым эндометритом

Уровень экспрессии супероксиддисмутазы при эндометрите коррелировал с уровнями TLR4 ( $R=0,63$ ;  $p < 0,01$ ) и TLR5 ( $R=0,74$ ;  $p < 0,01$ ), а каталазы – с коррелировал с уровнями экспрессии TLR1 ( $R=0,43$ ;  $p < 0,05$ ) и TLR2 ( $R=0,55$ ;  $p < 0,05$ ).

У пациенток с нормально протекавшим послеродовым периодом наблюдалась высоко значимая корреляция уровня экспрессии супероксиддисмутазы с TLR4 ( $R=0,79$ ;  $p < 0,01$ ), TLR5 ( $R=0,046$ ;  $p < 0,05$ ) и отрицательная корреляция с уровнем TLR2 ( $R=-0,048$ ;  $p < 0,05$ ). Уровень каталазы имел высокую корреляционную связь с экспрессией TLR4 ( $R=0,65$ ;  $p < 0,01$ ), а также умеренную связь с уровнями TLR1 и супероксиддисмутазы (во обоих случаях  $R=0,54$ ;  $p < 0,05$ ).

По-видимому, снижение экспрессии TLR4 и TLR5 является одной из основных причин развития послеродового эндометрита, вне зависимости от бактериальной об-

семенности. Этот механизм можно считать одним из ведущих, так как причиной развития послеродовой инфекции является активация собственной, условно-патогенной микрофлоры.

Вопреки нашим предположениям, при эндометрите не наблюдалось увеличения экспрессии TLR, лигандами которых являлись другие структуры бактерий, в том числе патогенных – липопроотеины и липополисахариды, а также пептидогликан. Вероятно, особенностью функционирования врожденного иммунитета при эндометрите является не активация, а подавление звеньев местной иммунореактивности, что облегчает инвазию возбудителя.

Полученные результаты подтверждаются данными литературы о роли Толл-рецепторов в воспалительных процессах другой локализации. Так, в экспериментах на линии мышей, нокаутированной по TLR5, было показано, что отсутствие экспрессии этого рецептора способствует быстрому развитию и тяжелому течению пневмонии по сравнению с нормальной линией мышей, несмотря на одинаковое количество возбудителя. Это было связано со снижением уровней провоспалительных цитокинов, в частности, фактора некроза опухоли- $\alpha$ , вследствие отсутствия активации TLR5 [10].

Отсутствие TLR4 и TLR5у нокаутированных мышей также способствует развитию инфекций мочевыводящих путей, вызванных кишечной палочкой, даже при небольших количествах возбудителя, а также более тяжелому их течению [3]. Также у мышей этих линий высок риск развития кератита и пневмонии (в модели муковисцидоза) [4,13].

Нами также была выявлена положительная корреляционная связь между уровнем экспрессии Толл-подобных рецепторов 4 и 5 и уровнем супероксиддисмутазы у пациенток с послеродовым эндометритом. Полученные результаты соотносятся с новейшими исследованиями, проведенными на животных. Так, в экспериментах на грызунах и приматах было показано, что флагеллин-индуцированная экспрессия TLR5 ассоциирована с гранулоцитопозом и антиапоптозным эффектом супероксиддисмутазы [5]. По этой же причине агонист TLR5 флагеллин способствует уменьшению деструкции почечной ткани при острой почечной недостаточности [9].

Таким образом, TLR4 и TLR5 играют важную роль в патогенезе послеродового эндометрита. В случае снижения их экспрессии возрастает риск активации условно-патогенной флоры из-за нарушений местной иммунореактивности. Кроме того, вышеуказанные типы рецепторов, по-видимому, участвуют в регуляции активности антиоксидантной системы, в частности, экспрессии супероксиддисмутазы. Поэтому уменьшение экспрессии TLR4 и TLR5 в женских половых путях в послеродовом периоде приводит к развитию послеродового эндометрита как вследствие снижения антиинфекционной защиты, так и вследствие повышенной деструкции тканей.

Статья подготовлена при поддержке госконтракта №№ 14.740.11.0248 от 17.09.10г.игрантаПрезидентаРФМК.1564.2010.7

### **Список литературы**

1. Горин В.С., Серов В.Н., Бирюкова Л.А., Степанов В.В. Оптимизация диагностики и лечения послеродового эндометрита// Российский вестник акушера-гинеколога. -2009.- № 1. – С. 21- 29.
2. Краснопольский В.И., Буянова С.Н., Щукина Н.А. Акушерский сепсис как репродуктивная проблема// Акуш и гин. - 2007. – №3. - С. 38–42.
3. Andersen-Nissen E., Hawn T.R., Smith K.D. et al. Cutting Edge: Tlr5<sup>-/-</sup> Mice Are More Susceptible to Escherichia coli Urinary Tract Infection// J. Immunol. -2007. – Vol. 178. – P. 4717 - 4720.
4. Blohmke C.J., Park J., Hirschfeld A.F. et al. TLR5 as an Anti-Inflammatory Target and Modifier Gene in Cystic Fibrosis// The Journal of Immunology. - December 15, 2010. - Vol. 185, № 12. –P. 7731-7738).
5. Burdelya, L. G., Krivokrysenko V. I. , Tallant T. C. et al. An agonist of Toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models// Science. - 2008. – Vol. 320. – P. 226–230.
6. Bustin S. A. , Benes V., Garson G. et al. The MIQE Guidelines : Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments// Clinical Chemistry. – 2009. – №55, Vol. 4. – P. 611-622.

7. Chomchinsky P., Saccini N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction// *Annal. Biochem.* – 1987. – Apr. 162 (1) – P. 156-159.
8. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. Diversity of structures and properties among catalases// *Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61 (2). – P. 192–208.
9. Fukuzawa N., Petro M., Boldwin W.M. et al. A TLR5 Agonist Inhibits Acute Renal Ischemic Failure // *J. Immunol.* - Oct 2011. – Vol. 187. – P. 3831 - 3839.
10. Hawn T., Berrington W., Smith I. et al. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice, infected with *Legionella pneumophila*// *J. Immunol.* - 2007. – Vol. 179. – P. 6981-6987.
11. Lakshminrusimha S., Russell J.A., Wedgwood S. et al. Superoxide Dismutase Improves Oxygenation and Reduces Oxidation in Neonatal Pulmonary Hypertension// *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2006. – Vol. 174. – P. 1370 - 1377.
12. Pierce A., Whitlark J., and Dory L. Extracellular Superoxide Dismutase Polymorphism in Mice// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - Oct 2003. – Vol. 23. – P. 1820 - 1825.
13. Sun Y., Karmakar M., Roy S. et al. TLR4 and TLR5 on Corneal Macrophages Regulate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by Signaling through MyD88-Dependent and -Independent Pathways// *J. Immunol.* - Oct 2010. – Vol. 185. – P. 4272 – 4283.

## **ROLE OF INNATE IMMUNITY SYSTEM, GENETICS FACTORS AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN PATHOGENESIS OF POSTPARTUM ENDOMETRITIS.**

**O.P. LEBEDEVA<sup>1</sup>**

**N.I. SAMBORSKAYA<sup>1</sup>**

**V.YU. BASHMAKOV<sup>2</sup>**

**S.P. PACHOMOV<sup>1</sup>**

**V.N. POPOV<sup>2</sup>**

**M.I. CHURNOSOV<sup>1</sup>**

**P.V. KALUTSKY<sup>3</sup>**

**O.N. IVASHOVA<sup>1</sup>**

**P.G. DOVGIIY<sup>1</sup>**

**P.A. KARPOV<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Belgorod State National Research University*

<sup>2</sup> *Voronezh State University*

<sup>3</sup> *Kursk State Medical University e-mail: safonova2@yandex.ru*

---

The article is devoted to the role of Toll-like receptors (TLR) and enzymes of antioxidant system in development of postpartum endometritis.

It is established, that at patients with postpartum endometritis significant decrease of TLR4 и TLR5 is observed. It leads to inflammation development even in the presents of small amounts of pathogens. Decreasing of superoxide dismutase level can promote tissue destruction and progression of clinical severity of disease.

Key words: Toll-like receptors, innate immunity, superoxide dismutase, catalase, postpartum endometritis.