

УДК 618.39-06:618.34-007.251]-092:612.017.11

DOI 10.11603/24116-4944.2019.1.10187

©К. С. Любомирська, О. М. Камишний, Ю. Я. Круть

Запорізький державний медичний університет

## РОЛЬ РЕЦЕПТОРІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ В ПАТОГЕНЕЗІ АСОЦІЙОВАНОГО З ПЕРЕДЧАСНИМИ ПОЛОГАМИ ПЕРЕДЧАСНОГО РОЗРИВУ ПЛОДОВИХ ОБОЛОНОК

**Мета дослідження** – розробити спосіб прогнозування розвитку ПРПО при недоношеній вагітності за результатами визначення рівня мРНК генів TLR2 і TLR4 на місцевому рівні та гематологічних показників рівня ендогенної інтоксикації.

**Матеріали та методи.** Обстежили 80 жінок із ПРПО в терміні гестації 26–34 тижні (основна група) і 50 вагітних із фізіологічним перебігом вагітності та терміновими пологами без ускладнень (група контролю). Для аналізу транскрипційної активності генів вродженого імунітету TLR2 та TLR4 у плаценті та плодових оболонках використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-RadLaboratories, Inc.», США) і набір реактивів Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (ThermoScientific, США).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Середній вік обстежених жінок склав (28,14±6,43) року. Середній термін виникнення ПРПО в основній групі дослідження становив (31,79±2,06) тижня, тривалість безводного проміжку мала велику розбіжність та в середньому склала 90,12 години (від 9 до 313 годин). Діапазон всіх отриманих значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена TLR2 у плаценті становив 0,79–163,44 (медіана – 31,06), у плодових оболонках – 1,1–126,06 (медіана – 10,22). Розмах всіх отриманих значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена TLR4 був нижчий, ніж TLR2, у плаценті й становив 0,39–43,85 (медіана – 7,74) та вищий у плодових оболонках – 0,18–216,01 (медіана – 40,04). В 33–34 тижні виникнення ПРПО рівень експресії TLR4 у плодових оболонках був у 53,53 раза більший порівняно із практично здоровими жінками з фізіологічним перебігом вагітності та пологів, в 31–32 тижні – у 24,77 раза відповідно. Найбільш чутливими лейкоцитарними індексами оцінки ступеня розвитку ендогенної інтоксикації у вагітних із передчасними пологами були NLR та LII Я. Я. Кальф-Каліфа, у новонароджених – LIII Кальф-Каліфа та I3H. NLR при госпіталізації перевищував норму майже в 2 рази та склав, відповідно, 6,12±2,57, при виписці після розродження, на тлі застосування антибактеріальної терапії – 3,25±1,28.

**Висновки.** У тканині плаценти та плодових оболонках жінок із ПРПО та передчасними пологами в 26–34 тижні гестації відмічається виражене підвищення експресії TLR2 та TLR4. Збільшення транскрипційної активності компонентів вродженого імунітету є фактором реалізації внутрішньоматкового та інтраамніального інфікування та є імунологічною складовою розвитку невиношування, асоційованого з ПРПО. Основними маркерами ступеня активності запального процесу та вираженості ендогенної інтоксикації при передчасних пологах на тлі ПРПО у вагітних виступають – загальна кількість лейкоцитів, LII Кальф-Каліфа та NLR. Комплексна оцінка інтегральних показників рівня інтоксикації дозволяє прогнозувати виникнення ПРПО при недоношеній вагітності у вагітних із груп ризику даного ускладнення, вчасно впровадити превентивні заходи, оптимізувати подальше лікування та оцінити його ефективність.

**Ключові слова:** передчасні пологи; передчасний розрив плодових оболонок; транскрипційна активність генів.

### РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ АССОЦИИРОВАННОГО С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО РАЗРЫВА ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК

**Цель исследования** – разработать способ прогнозирования развития преждевременного разрыва плодных оболочек при недоношенной беременности по результатам определения уровня мРНК генов TLR2 и TLR4 на местном уровне и гематологических показателей уровня эндогенной интоксикации.

**Материалы и методы.** Обследовали 80 женщин с ПРПО в сроке гестации 26–34 недели (основная группа) и 50 беременных с физиологическим течением беременности и срочными родами без осложнений (группа контроля). Для анализа транскрипционной активности генов вроджденного иммунитета TLR2 и TLR4 в плаценте и плодных оболочках использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-RadLaboratories, Inc.», США) и набор реактивов Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (ThermoScientific, США).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Средний возраст обследованных женщин составил (28,14±6,43) лет. Средний срок возникновения ПРПО в основной группе исследования составил (31,79±2,06) недели, продолжительность безводного периода имела широкий диапазон и в среднем составила 90,12 часа (от 9 до 313 часов). Диапазон всех полученных значений относительной нормализованной экспрессии мРНК гена TLR2 в плаценте составил 0,79–163,44 (медіана – 31,06), в плодных оболочках – 1,1–126,06 (медіана – 10,22). Размах всех полученных значений относительной нормализованной экспрессии мРНК гена TLR4 был ниже, чем TLR2, в плаценте и составлял 0,39–43,85 (медіана – 7,74) и выше в плодных оболочках – 0,18–216,01 (медіана – 40,04). В 33–34 недели возникновения ПРПО уровень экспрессии TLR4 в плодных оболочках был в 53,53 раза больше по сравнению с практически здоровыми женщинами с физиологическим течением беременности и родов, в 31–32 недели – в 24,77 раза соответственно. Наиболее чувствительными лейкоцитарными индексами оценки степени развития эндогенной интоксикации у беременных с преждевременными родами были NLR и лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) Я. Я. Кальф-Калифа, у новорожденных – ЛИИ Кальф-Калифа и NLR при госпитализации превышал норму почти в 2 раза и составил, соответственно, 6,12±2,57, при выписке после родоразрешения, на фоне применения антибактериальной терапии – 3,25±1,28.

**Выводы.** В ткани плаценты и плодных оболочках женщин с ПРПО и преждевременными родами в 26–34 недели гестации отмечается выраженное повышение экспрессии TLR2 и TLR4. Увеличение транскрипционной активности компонентов врожденного иммунитета является фактором реализации внутриматочного и интраамниального инфицирования и является иммунологической составляющей развития невынашивания, ассоциированного с ПРПО. Основными маркерами степени активности воспалительного процесса и выраженности эндогенной интоксикации при преждевременных родах на фоне ПРПО у беременных выступают – общее количество лейкоцитов, ЛИИ Кальф-Калифа и NLR. Комплексная оценка интегральных показателей уровня интоксикации позволяет прогнозировать возникновение ПРПО при недоношенной беременности у беременных из групп риска данного осложнения, вовремя внедрить превентивные меры, оптимизировать дальнейшее лечение и оценить его эффективность.

**Ключевые слова:** преждевременные роды; преждевременный разрыв плодных оболочек; транскрипционная активность генов.

### THE ROLE OF RECEPTORS OF INNATE IMMUNITY IN THE PATHOGENESIS OF ASSOCIATED WITH PREMATURE RUPTURE OF MEMBRANES PRETERM LABOR

**The aim of the study** – to develop a method for predicting the development of premature rupture of membranes (PRM) in preterm labor (PTL) based on the results of determining the level of mRNA of TLR2 and TLR4 genes at the local level and hematological parameters of the level of endogenous intoxication.

**Materials and Methods.** We examined 80 women with PRM in the gestation period of 26–34 weeks (main group) and 50 pregnant women with a physiological course of pregnancy and term labor without complications (control group). For the analysis of transcriptional activity of genes of innate immunity TLR2 and TLR4 in the placenta and fetal membranes, the method of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction was used CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems amplifier (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) and Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix reagent kit (ThermoScientific, USA).

**Results and Discussion.** The average age of the examined women was (28.14±6.43) years. The average period of occurrence of PRM in the main group of the study was (31.79±2.06) weeks, the length of the anhydrous period had a wide range and averaged 90.12 hours (from 9 to 313 hours). The range of all obtained values of the relative normalized expression of mRNA of the TLR2 gene in the placenta was (0.79–163.44) (median – 31.06), in fetal membranes – 1.1–126.06 (median – 10.22). The range of all obtained values of the relative normalized expression of the mRNA of the TLR4 gene was lower than the TLR2 in the placenta and was 0.39–43.85 (median – 7.74) and higher in the fetal membranes – 0.18–216.01 (median – 40.04). At 33–34 weeks of the onset of PRM, the expression level of TLR4 in the fetal membranes was 53.53 times more compared to healthy women with physiological pregnancy and labor, at 31–32 weeks – 24.77 times, respectively. The most sensitive leukocyte indexes for assessing the degree of development of endogenous intoxication in pregnant women with preterm labor were NLR and the leukocyte intoxication index (LII) of Kalf-Kalif. In newborns – LII Kalf-Kalif and NLR during hospitalization exceeded the norm by almost 2 times and amounted to respectively, (6.12±2.57), when discharged after labor, against the background of the use of antibacterial therapy – (3.25±1.28).

**Conclusions.** A marked increased expression of TLR2 and TLR4 is observed in the tissue of the placenta and fetal membranes of women with PRM and PTL in the 26–34 weeks of gestation. An increase in the transcriptional activity of the components of innate immunity is a factor in the implementation of intrauterine and intra-amniotic infection and is an immunological component of the development of miscarriage associated with PRM. The main markers of the degree of activity of the inflammatory process and the severity of endogenous intoxication in preterm labor against the background of PRM in pregnant women are total leukocyte count, LII Kalf-Kalif and NLR.

**Key words:** preterm labor; premature rupture of the fetal membranes; gene transcription activity.

**ВСТУП.** Незважаючи на вдосконалення знань про фактори ризику та механізми розвитку передчасних пологів, а також сучасні превентивні заходи, частота народження недоношених дітей неухильно зростає (в середньому 15 млн щороку) та є провідною причиною перинатальної смертності в розвинутих країнах [2, 9].

Передчасні пологи відносяться до великих акушерських синдромів із залученням у патологічний процес, окрім загальноновідомих гормональних, тромбофілічних, інфекційно-запальних, механічних, стресових факторів, також генетичних батьківських, плодових та епігенетичних компонентів [10]. Саме ця підпорядкована взаємодіюча система обумовлює складність вирішення проблеми передчасних пологів, особливо залежно від двох фенотипів: спонтанні передчасні пологи з інтактним плодовим міхуром та з передчасним розривом плодових оболонок (ПРПО) як фактором ініціації пологової діяльності [10]. Залишені 20–25 % припадають на частку ситуацій, коли медичні показання з боку матері або плода диктують необхідність пологозбудження або кесаревого розтину на термінах вагітності менше 37 тижнів [10].

Основною причиною розриву плодових оболонок є внутрішньоматкова та інтраамніальна інфекція, яка має хронічний та субклінічний характер [3, 5]. Імунна система жіночого репродуктивного тракту представлена як вродженими, так і адаптивними механізмами, і має дві основні, але різноспрямовані функції. Важливу роль серед факторів вродженого імунітету відіграють патерн-розпізнавальні рецептори – Pattern recognition receptors (PRRs). PRRs розпізнають патоген-асоційовані патерни (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)), які еволюційно розвивалися як консервативні вроджені рецептори зі здатністю розпізнавати специфічні мікробні детермінанти, з наступною передачею інформації про патоген імунним клітинам, запуском адаптивного імунітету та медіацією продукції цитокінів, необхідних для розвитку ефективного імунітету [8].

Серед PRRs особливе місце займають Toll-like receptors (TLRs), 9 типів з яких представлені в ендометрії та піддаються циклічному гормональному регулюванню. В репродуктивному процесі це має надзвичайне значення і відмічено, що на фетоплацентарному кордоні та трофобласті TLRs експресуються великою кількістю не

тільки імунних, але й неімунних клітин [7, 8]. Експериментальні роботи вказують на негативну роль активації TLR4 у розвитку передчасних пологів, викликаних, зокрема, введенням антигенів кишкової палички мишам. Показано, що в клітинах слизової цервікального каналу у вагітних із невиношуванням вагітності інфекційного генезу експресія гена TLR2 зростала в декілька разів порівняно з групою здорових вагітних [6].

Для своєчасного прогнозування невиношування вагітності необхідна оцінка реакції організму на інфекційний процес. Одним із найбільш простих і доступних методів визначення реакції імунної системи при різних захворюваннях є визначення лейкоцитарних індексів інтоксикації (ЛІІ) – співвідношення популяцій клітин крові, які дозволяють судити про переважання про- або протизапальної імунної відповіді. Водночас аналіз даних літератури свідчить про недостатнє висвітлення значущості ЛІІ при прогнозуванні передчасних пологів, що робить доцільним вивчення діагностичних можливостей активності лейкоцитарних індексів при даному ускладненні гестації.

Отже, вивчення ролі компонентів вродженого імунітету та рівня ендогенної інтоксикації при передчасних пологах, ініційованих ПРПО, є важливим напрямом для розуміння імунологічних аспектів формування невиношування вагітності.

**МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ** – розробити спосіб прогнозування розвитку ПРПО при недоношеній вагітності за результатами визначення рівня мРНК генів TLR2 і TLR4 на місцевому рівні та гематологічних показників рівня ендогенної інтоксикації.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Для реалізації мети обстежили 80 жінок із ПРПО при недоношеній вагітності (основна група) і 50 вагітних із фізіологічним перебігом вагітності та терміновими пологами без ускладнень (група контролю). Дослідження виконали на базі кафедри акушерства та гінекології Запорізького державного медичного університету в Запорізькому обласному перинатальному центрі. Критерій залучення у дослідження – добровільна інформована згода на участь у дослідженні, наявність ПРПО в терміні гестації 26–34 тижні, підтвердженого відповідно до наказу МОЗ України від 29.12.2005 р. № 782, та відсутність тяжкої екстрагенітальної патології. Середній вік обстежених жінок склав (28,14±6,43) року. Середній термін виникнення ПРПО в основній групі дослідження становив (31,79±2,06) тижня, тривалість безводного проміжку мала велику розбіжність та в середньому склала 90,12 години (від 9 до 313 годин).

Для аналізу транскрипційної активності генів вродженого імунітету TLR2 та TLR4 використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (ThermoScientific, США). Об'єктом дослідження були плацента і плодові оболонки, фіксовані у нейтральному формаліні. Виділення тотальної РНК проводили з використанням набору «NucleoZOL» (Macherey-Nagel, Німеччина). Для цього попередньо відмиті від формаліну шматочки плаценти та плодових оболонок гомогенізували (100 мг тканини/1 мл «NucleoZOL»). Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторях. Визначення

мРНК досліджуваних генів проводилось із розрахунком відносної нормалізованої кількості кДНК досліджуваних генів, коли дані контрольної групи приймалися за «1», відповідно, дані досліджуваної групи визначалися відносно показників контрольної групи. Нормалізацію відносної кількості кДНК проводили за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH). Дослідження проводили на базі відділу молекулярно-генетичних досліджень навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакета програм «Statistica 13.0». (StatSoft Software № JPZ8041382130ARCN10-J) за загальноприйнятою методикою. Основні отримані дані наведені у вигляді: кількості спостережень (n), середньої арифметичної величини (M), стандартної помилки середньої ( $\pm m$ ), відносних величин (абс., %), рівня статистичної значущості (p). Відмінності вважали статистично значимими при  $p < 0,05$ . Нормальність розподілу кількісних ознак оцінювали за допомогою критеріїв Шапіро – Уїлка та Колмогорова – Смірнова. Статистичні характеристики між групами порівняли з використанням непараметричного критерію Mann-Whitney U test.

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.**

Жінки з передчасними пологами, ініційованими ПРПО, мали такі гінекологічні захворювання в анамнезі, як: патологія шийки матки – 41,38 %, хронічні запальні процеси придатків матки 17,24 %, кісти яєчників – 10,34 %. Самовільними викиднями попередні вагітності завершилися у 13,79 % обстежених пацієнток. Слід зазначити, що майже кожна 4 жінка (24,14 %) з основної групи дослідження в анамнезі вже мала передчасні пологи, що вказує на особисту схильність до виникнення даного ускладнення. Жителями сільської місцевості були 65,52 % пацієнток, міста – 34,48 % відповідно.

Істміко-цервікальна недостатність була виявлена у 17,24 % вагітних, що потребувало застосування акушерського песарія. Бактеріологічне дослідження сечі проводилось у 58,62 % вагітних, з яких у 82,35 % етіологічно значимої флори виділити не вдалось. Серед бактеріальних інфекцій (у 17,65 % вагітних), які вдалося виявити, лідирували E.coli та Kl. pneumoniae. Отже, коротка шийка матки та безсимптомна бактеріурія як фактори ризику передчасних пологів виявлені лише у 17,24 % та 17,65 % відповідно, що вказує на необхідність подальших досліджень у цьому напрямі для розширення скринінгу та стратифікації груп ризику невиношування.

На тлі існуючої парадигми про значення порушеної вагінальної екосистеми в генезіс невиношування наступним обґрунтованим завданням дослідження були оцінка біоценозу пологових шляхів та виявлення найбільш значимих інфекційних агентів у розвитку ПРПО та ініціації передчасних пологів у термінах гестації 26–34 тижні. У 44,83 % жінок основної групи було проведено бактеріологічне дослідження піхви з визначенням чутливості до антибіотиків. У 76,92 % обстежених пацієнток у мікробіомі піхви були виявлені значимі титри представників умовно-патогенної та патогенної флори. Структура мікробного пейзажу у відсотковому співвідношенні виглядала так: Staphylococcus haemolyticus – 28,57 %, Enterococcus faecalis та Klebsiella oxytoca – по 21,43 %, Klebsiella pneumonia та Staphylococcus epidermidis – по 14,28 %.

Проведене бактеріоскопічне дослідження мазків з піхви дозволило визначити ознаки кольпіту в 31,03 % вагітних. Але варто зазначити, що нормалізація біоценозу пологових шляхів у вагітних із ПРПО в терміні недоношеної вагітності на фоні застосування місцевої та системної антибактеріальної терапії не впливала на зниження частки передчасних пологів і як наслідок показника перинатальної захворюваності, адже процес інфікування плодових оболонок був уже запущений. Отримані дані підтверджуються проведеними раніше дослідженнями R. Romero et al. [10].

При гестаційній патології дисрегуляційні зрушення можуть стати підґрунтям для виникнення патологічного субстрату. При цьому природа і механізми саногенетичних процесів залежать від патогенетичної структури захворювання, тобто від того, які органи і системи охоплені патологічним процесом. Аналіз будь-якого процесу, у сенсі дисрегуляційної патології, потребує розуміння біологічної значущості змін, що виявляють – чи є вони патогенетичними або саногенетичними. Водночас дослідження стану експресії генів мають певні переваги як для ретроспективної оцінки характеру перебігу патогенетичних і саногенетичних процесів, так і для прогнозування подальшого розвитку новонародженого. У проведеному нами раніше дослідженні [11] задля виділення імунітопосередкованих ланок розвитку ПРПО при недоношеній вагітності ми дослідили транскрипційну активність гена системних прозапальних цитокінів IL1 $\beta$  та IL17A на місцевому рівні. Враховуючи, що для вивчення імунологічної складової розвитку передчасних пологів визначення рівня експресії компонентів адаптивного імунітету недостатньо, в даному дослідженні з метою об'єднання про- та

протизапальної ланки патогенезу ми вирішили визначити рівень мРНК генів вродженого імунітету транскриптів плаценти та плодових оболонок при передчасних пологах, ініційованих ПРПО. Особливості транскрипційної активності генів TLR2 та TLR4 на місцевому рівні представлені на рисунках 1–4.

За результатами нашого дослідження, у тканині плаценти та плодових оболонок жінок із ПРПО та передчасними пологами в 26–34 тижні гестації відмічається виражене підвищення інтенсивності експресії TLR2 та TLR4. Діапазон всіх отриманих значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена TLR2 у плаценті становив 0,79–163,44 (медіана – 31,06), в плодових оболонках – 1,1–126,06 (медіана – 10,22). В одному зразку тканини плодових оболонок (3,70 %) реєструвалися значення, пограничні з даними контрольної групи (< 1–1,15). Коливання діапазонів значень нижчих від медіани (0,79–23,86), які відображали помірно виражене зростання порівняно з групою в цілому, спостерігалися у 19 зразках тканини плаценти, що становило 70,37 % спостережень. Значення рівня експресії вищі від медіани (35,06–163,44), які демонстрували найбільші відхилення від контролю, спостерігалися у 29,63 % усіх досліджуваних зразків тканини плаценти. У тканині плодових оболонок найбільші відхилення від контролю були виявлені в 11,11 % зразків (експресія вище медіани 27,46–126,06). Таким чином, збільшення відносної нормалізованої експресії (окрім пограничних значень) TLR2 виявлені у 96,3 % випадків усієї вибірки, з переважанням значних відхилень ( $p < 0,001$ ).

При аналізі експресії гена TLR2 залежно від терміну маніфестації ПРПО встановлено, що її мінімальні значення 3,27 (2,32–5,49) спостерігались у плодових

**TLR2 mRNA expression fetal membranes**

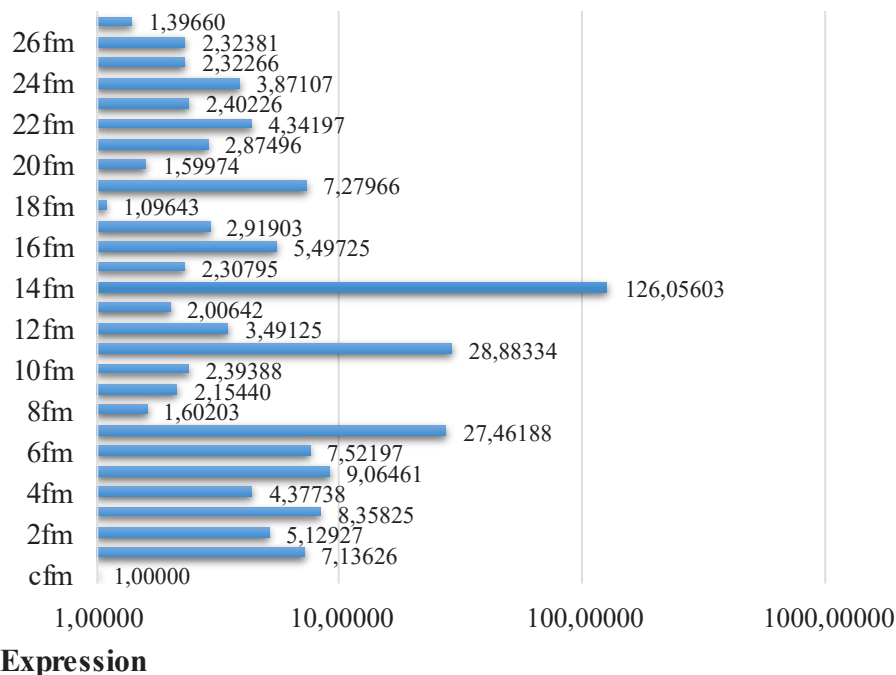


Рис. 1. Відносна нормалізована експресія mRNA TLR2 у плодових оболонках у вагітних із ПРПО при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом  $\Delta\Delta C_t$  із референс-геном GAPDH).

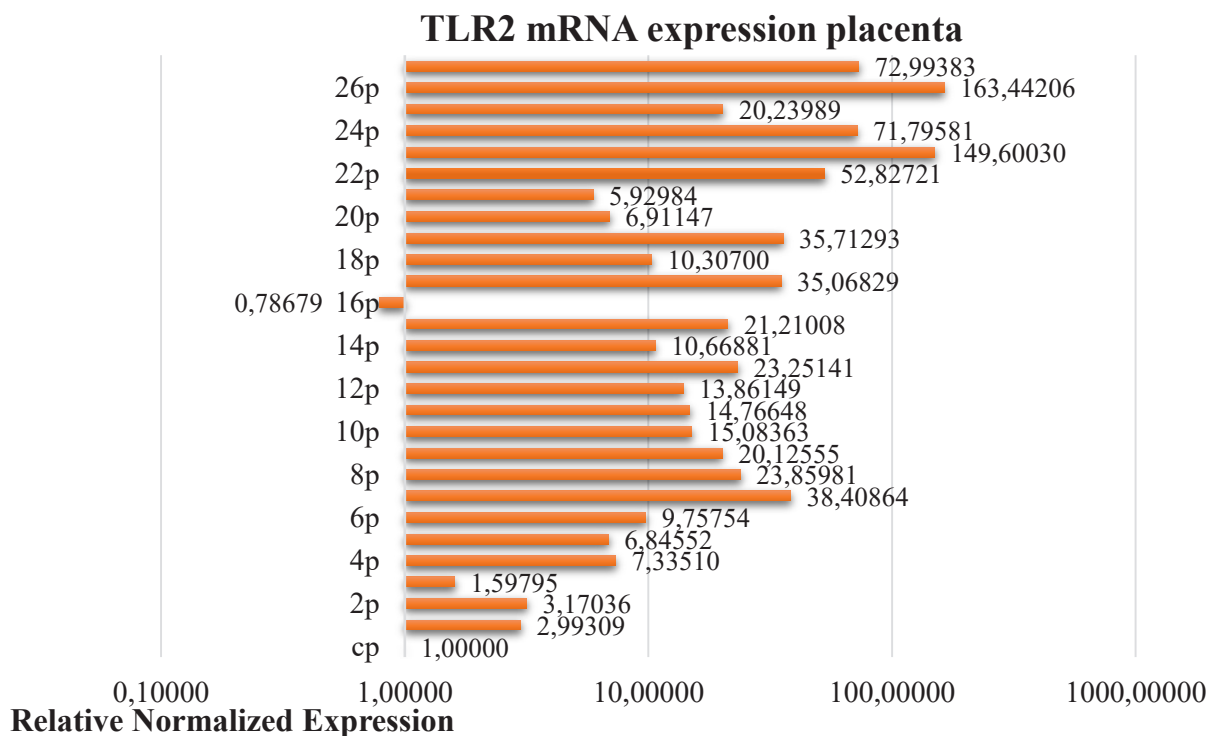


Рис. 2. Відносна нормалізована експресія mRNA TLR2 у плаценті у вагітних із ПРПО при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  із референс-геном GAPDH).

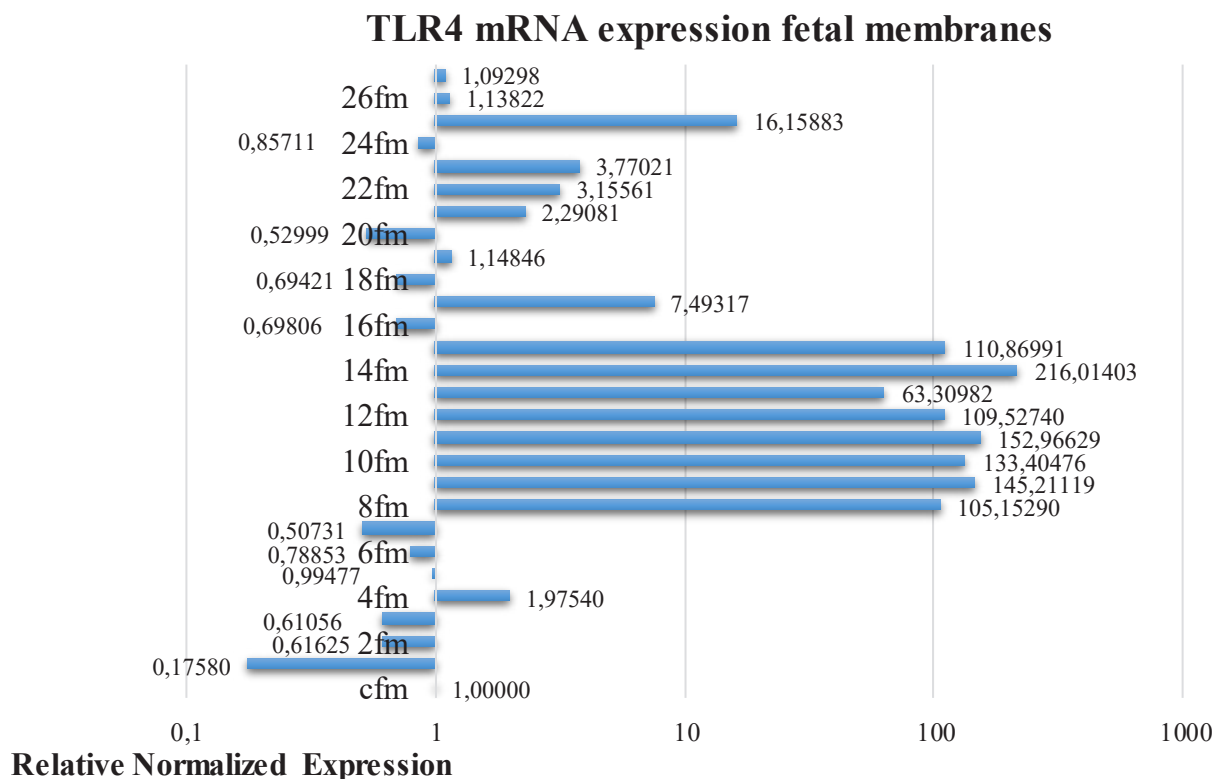


Рис. 3. Відносна нормалізована експресія mRNA TLR4 у плодових оболонках у вагітних із ПРПО при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  із референс-геном GAPDH).

### TLR4 mRNA expression placenta

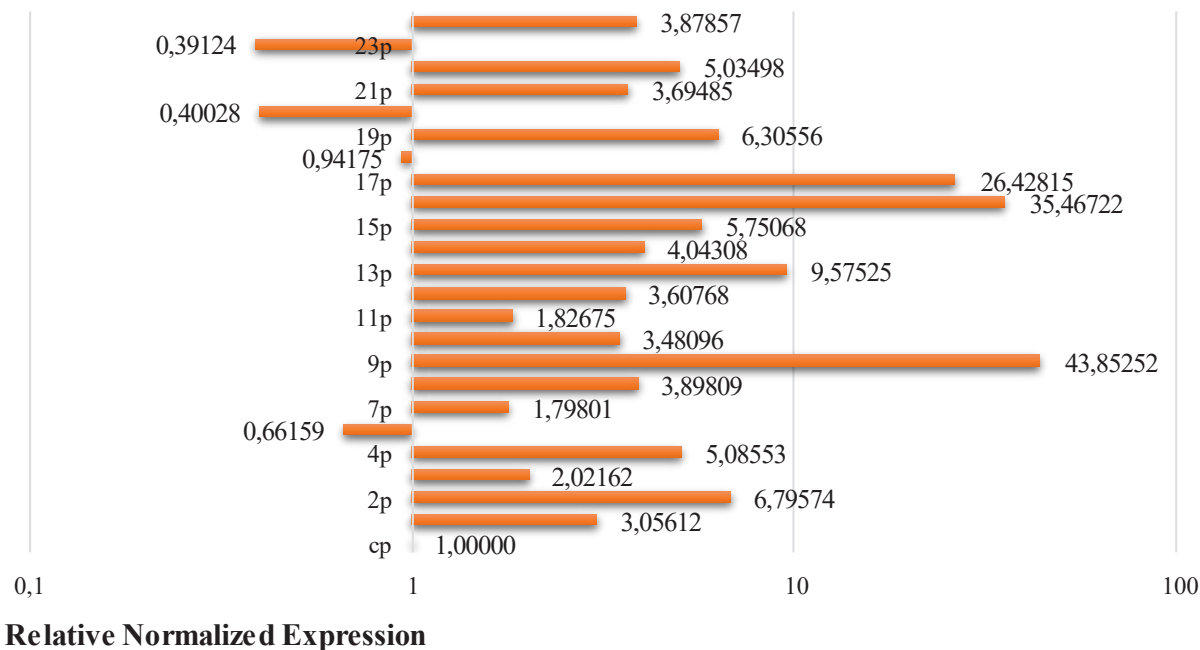


Рис. 4. Відносна нормалізована експресія mRNA TLR4 у плаценті у вагітних із ПРПО при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  із референс-геном GAPDH).

оболонках в терміні гестації 26–30 тижнів, тимчасом як максимальне значення – 46,31 (0,79–163,44) в плацентарній тканині також у 26–30 тижнів (табл. 1). У плодових оболонках ми визначили в 15,61 раза вищу порівняно з групою контролю експресію м-РНК TLR2 в 33–34 тижні вагітності та в 5,99 раза в 31–32 тижні відповідно. Така широка амплітуда коливань свідчить про те, що у вагітних з ПРПО при недоношеній вагітності рівень запальних процесів у тканині варіює в широких межах. Але варто відзначити, що незалежно від терміну виникнення ПРПО при недоношеній вагітності середній рівень мРНК TLR2 був вищим у плаценті, а експресія TLR4, навпаки, була вірогідно вищою в плодових оболонках ( $p < 0,05$ ).

Розмах всіх отриманих значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена TLR4 був нижчий, ніж TLR2, у плаценті й становив 0,39–43,85 (медіана – 7,74) та вищий у плодових оболонках – 0,18–216,01 (медіана – 40,04). У чотирьох зразках тканини плаценти та тринадцяти зразках плодових оболонок (33,33 %) реєструвалися значення, пограничні з даними контрольної групи ( $< 1-1,15$ ). Коливання діапазонів значень вищих від медіани, які відображали дуже виражене зростання порівняно з групою в цілому, спостерігалися у 8 зразках плодових оболонок, що становило 29,63 % спостережень. У тканині плаценти найбільші відхилення від контролю були виявлені у 16,67 % зразків (експресія вище медіани 9,58–43,85).

Таблиця 1. Транскрипційний профіль генів вродженого імунітету в клітинах плаценти та плодових оболонках залежно від терміну виникнення передчасного розриву плодових оболонок (Mean (L-H))

Локалізація	26–34 тижні n=27	26–30 тижнів n=4	31–32 тижні n=10	33–34 тижні n=13
TLR2, плацента	31,06 (0,79–163,44)	46,31 (0,79–163,44)	37,74 (6,91–149,60)	21,22 (1,59–52,83)
TLR2, плодові оболонки	10,22 (1,1–126,06)*	3,27 (2,32–5,49)*	5,99 (1,1–28,88)*	15,61 (1,39–126,06)*
TLR4, плацента	7,74 (0,39–43,85)	11,09 (1,82–26,43)	3,08 (0,40–6,30)	10,00 (0,39–43,85)
TLR4, плодові оболонки	40,04 (0,18–216,01)*	34,38 (0,69–133,4)*	24,77 (0,53–152,97)*	53,53 (0,18–216,01)*

Примітка. \* – статистично значущі відмінності  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U test) порівняно з рівнем експресії досліджуваного TLR у плаценті.

Механізми протизапальної медіації через активацію TLR2 та TLR4 можуть бути причиною розвитку ПРПО в 26–34 тижні гестації та розглядаються як можливі індуктори прогресування захворювання. При аналізі експресії гена TLR4 нами були визначені певні особливості у вигляді суттєвого зростання показника в плодових оболонках порівняно з плацентарною тканиною. В 33–34 тижні виникнення ПРПО рівень експресії TLR4 у плодових оболонках був в 53,53 раза більший порівняно із практично здоровими жінками з фізіологічним перебігом вагітності та пологів, в 31–32 тижні – в 24,77 раза відповідно.

Тривалість безводного проміжку залежно від терміну маніфестації була вищою в підгрупі з ПРПО в 26–30 тижнів вагітності та склала, відповідно, 145,4 години (L 11 – Н 290 годин). Зі збільшенням терміну виникнення ПРПО при недоношеній вагітності зменшувалася тривалість безводного проміжку, так, у підгрупі з ПРПО в 31–32 тижні вона склала 82,1 години (L 14 – Н 259 годин) та в підгрупі з ПРПО в 33–34 тижні – 75,29 години (L 9 – Н 213 годин) відповідно.

Загальновідомо, що ендогенна інтоксикація (EI) є одним із провідних факторів порушення гомеостатичного балансу в організмі внаслідок активації катаболічних процесів і зниження процесів природної детоксикації. Оскільки кров є «дзеркалом» гомеостазу, вищевказані розлади можуть бути оцінені за вмістом середніх молекулярних пептидів, як гуморальна складова; за концентрацією циркулюючих імунних комплексів, як імунна складова; і як клітинна складова EI зі зміни кількості лейкоцитів і їх співвідношення в периферичній крові. З опублікованих

раніше досліджень видно, що в даних діагностичних цілях можуть бути використані так звані лейкоцитарні індекси (ЛІ). Дані інтегральні показники лейкограми дозволяють оцінити тяжкість запального процесу, механізми і ступінь компенсації резистентності організму, в тому числі при передчасних пологах, ініційованих ПРПО. Враховуючи, що методи ПЛР-ЗТ, на жаль, не впроваджені на сьогодні широко в клінічну практику, задля апробації отриманих даних про напруженість вродженого імунітету за допомогою рутинного аналізу периферичної крові на гематологічному аналізаторі були визначені та розраховані індекси EI в динаміці у жінок із передчасними пологами на тлі ПРПО та їх новонароджених (таблиці 2 та 3).

Лейкоцити виконують роль клітинного імунітету, і їх співвідношення може цілком об'єктивно характеризувати основні етапи розвитку EI при передчасних пологах на тлі ПРПО. Як видно з таблиці 2, загальна кількість лейкоцитів у вагітних при маніфестації ПРПО в терміні недоношеної вагітності була вірогідно вище норми і склала  $14,53 \pm 4,9$ , а при виписці зі стаціонару на фоні застосування антибактеріальної терапії –  $9,45 \pm 2,96$  відповідно. У новонароджених (табл. 3) спостерігалася подібна тенденція, що також набула статистичної значущості – рівень лейкоцитів при народженні був в 1,5 раза вищим за цей показник при виписці або переводі новонародженого.

Найбільш чутливими лейкоцитарними індексами оцінки ступеня розвитку ендогенної інтоксикації у вагітних з передчасними пологами, за даними дослідження, були NLR та ЛІІ Я. Я. Кальф-Каліфа, які достовірно перевищували інші показники у породіль при виписці, у новонароджених

Таблиця 2. Гематологічні показники рівня EI в жінок із ПРПО при недоношеній вагітності (M±m)

Показник/індекс, ум. од.	При госпіталізації	При виписці	Норма
WBC, $10^9/л$	$14,53 \pm 4,9$ *#	$9,45 \pm 2,96$	3,5–10,0
ANC, кл/мм <sup>3</sup>	$11976,92 \pm 4308,25$ *#	$7270,83 \pm 2405,7$	1200–8000
ALC, кл/мм <sup>3</sup>	$2057,69 \pm 553,65$ *	$2258,33 \pm 488,05$	500–5000
NLR	$6,12 \pm 2,57$ *#	$3,25 \pm 1,28$	0,78–3,53
ЛІІ Я. Я. Кальф-Каліфа	$3,29 \pm 3,07$ *#	$1,99 \pm 1,41$	≤1
ЛІІ В. К. Островського	$3,83 \pm 2,6$ #	$2,85 \pm 1,22$	1,0–1,6
ІЗН	$0,21 \pm 0,09$	$0,17 \pm 0,05$	<0,3

Примітка. WBC (white blood cells) – загальна кількість лейкоцитів; ANC (absolute neutrophil count) – абсолютна кількість гранулоцитів; ALC (absolute lymphocyte count) – абсолютна кількість лімфоцитів; NLR (neutrophil-to-lymphocyte ratio) – індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів; ЛІІ (лейкоцитарний індекс інтоксикації) Я. Я. Кальф-Каліфа =  $(4 \text{мієл} + 3 \text{ю} + 2 \text{п} + \text{с}) / (\text{пл} + 1) / (\text{мон} + \text{лімф})$  (еоз+1); ЛІІ (лейкоцитарний індекс інтоксикації) В. К. Островського =  $(\text{мієл} + \text{пл} + \text{юн} + \text{п} + \text{ся}) / (\text{лімф} + \text{мон} + \text{еоз} + \text{баз})$ ; ІЗН (індекс зсуву нейтрофілів) =  $(\text{мон} + \text{юн} + \text{п} + \text{ся}) / \text{ся}$ . \* – статистично значущі відмінності  $p < 0,05$  порівняно з рівнем ендогенної інтоксикації при виписці; # – статистично значущі відмінності  $p < 0,05$  порівняно з нормою.

Таблиця 3. Гематологічні показники рівня EI у новонароджених від породіль із ПРПО при недоношеній вагітності (M±m)

Індекс, ум. од.	1 доба життя	При виписці/переводі	Норма
WBC	$15,51 \pm 11,11$ *#	$10,93 \pm 3,71$	3,5–10,0
NLR	$2,47 \pm 1,15$	$1,32 \pm 0,86$	0,78–3,53
ЛІІ Я. Я. Кальф-Каліфа	$1,94 \pm 1,48$ *	$0,43 \pm 0,42$	≤1
ЛІІ В. К. Островського	$2,24 \pm 0,76$	$1,03 \pm 0,58$	1,0–1,6
ІЗН	$0,72 \pm 0,52$ *#	$0,17 \pm 0,13$	<0,3

Примітка. \* – статистично значущі відмінності  $p < 0,05$  порівняно з рівнем ендогенної інтоксикації при виписці; # – статистично значущі відмінності  $p < 0,05$  порівняно з нормою.

– ЛІІ Кальф-Каліфа та ІЗН. За даними I. Jung, H. Y. Cho [1, 4], основними предиктивними маркерами хоріоамніоніту у вагітних із ПРПО при передчасних пологах до 36 тижнів є WBC, NLR, CRP (C-reactive protein) та DNI (delta neutrophil index). Визначення дельта-нейтрофільного індексу, на жаль, обмежено можливостями гематологічного аналізатора, який був використаний у даному дослідженні. При оцінці NLR у вагітних було відмічено тенденцію, що набула статистичної значущості, так, NLR при госпіталізації перевищував норму майже в 2 рази та склав, відповідно,  $6,12 \pm 2,57$ , при виписці після розродження, на тлі застосування антибактеріальної терапії –  $3,25 \pm 1,28$ . У новонароджених даний показник виявився неінформативним та був у референтних межах норми при народженні та при виписці –  $2,47 \pm 1,15$  і  $1,32 \pm 0,86$  відповідно.

Серед досліджуваних показників рівня ЕІ слід відзначити ЛІІ Кальф-Каліфа, який був інформативним та показовим як для вагітних, породіль, так і для новонароджених. Так, у вагітних при виникненні ПРПО в терміні гестації 26–34 тижні даний показник перевищував норму в 3 рази, вказував на бактеріальний компонент запалення та склав  $3,29 \pm 3,07$ , після розродження –  $1,99 \pm 1,41$ . У новонароджених на фоні застосування комплексної антибактеріальної терапії спостерігалася позитивна динаміка зниження ЛІІ Кальф-Каліфа – з  $1,94 \pm 1,48$  при народженні до  $0,43 \pm 0,42$  при виписці.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The Delta Neutrophil Index as a predictive marker of histological chorioamnionitis in patients with preterm premature rupture of membranes: A retrospective study / H. Y. Cho, I. Jung, J. Y. Kwon [et al.] // *Plos One*. – 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0173382.
2. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome / M. Tchirikov, N. Schlabritz-Loutsevitch, J. Maher [et al.] // *J. Perinat. Med.* – 2018. – Vol. 46 (5). – P. 465–488.
3. Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabour rupture of membranes / I. Musilova, R. Kutová, L. Pliskova [et al.] // *Plos One*. – 2015. – Vol. 10 (7). – P. e0133929.
4. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? / P. Forget, C. Khalifa, J.-P. Defour [et al.] // *BMC Research Notes*. – 2017. doi: 10.1186/s13104-016-2335-5.
5. Onset of human preterm and term birth is related to unique inflammatory transcriptome profiles at the maternal fetal interface / R. Bukowski, Y. Sadovsky, H. Goodarzi [et al.] // *Peer J*. – 2017. – Vol. 5. – P. e3685. doi: 10.7717/peerj.3685.
6. Lashkari B. S. Toll-like receptor 2 and 4 expression in the pregnant and non-pregnant human uterine cervix /

### REFERENCES

1. Cho, H.Y., Jung, I., Kwon, J.Y., Kim, S.J., Park, Y.W., & Kim, Y.H. (2017). The Delta Neutrophil Index as a predictive marker of histological chorioamnionitis in patients with preterm premature rupture of membranes: A retrospective study. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0173382.
2. Tchirikov, M.N., Schlabritz-Loutsevitch, J., Maher, J., Buchmann, Y., Naberezhnev, A., Winarno S., & Seliger, G. (2017).

**ВИСНОВКИ.** 1. У тканині плаценти та плодових оболонках жінок із ПРПО та передчасними пологами в 26–34 тижні гестації відмічається виражене підвищення експресії TLR2 та TLR4. Збільшення транскрипційної активності компонентів вродженого імунітету є фактором реалізації внутрішньоматкового та інтраамніального інфікування та є імунологічною складовою розвитку невиношування, асоційованого з ПРПО.

2. Основними маркерами ступеня активності запального процесу та вираженості ендогенної інтоксикації при передчасних пологах на тлі ПРПО у вагітних виступають – загальна кількість лейкоцитів, ЛІІ Кальф-Каліфа та NLR. Комплексна оцінка інтегральних показників рівня інтоксикації дозволяє прогнозувати виникнення ПРПО при недоношеній вагітності у вагітних з груп ризику даного ускладнення, вчасно впровадити превентивні заходи, оптимізувати подальше лікування та оцінити його ефективність.

**ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.** У майбутньому ми плануємо визначити експресії адаптивних компонентів імунітету, зокрема кількості матричної РНК диференційних регуляторів Th1, Th17, Treg у плацентарній тканині та плодових оболонках, що покращить розуміння імунопатогенезу ПРПО та передчасних пологів, сприятиме формулюванню обсягу патогенетичних профілактичних заходів.

- B. S. Lashkari, S. Shahana, D. O. Anumba // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2015. – Vol. 107. – P. 43–51. doi: 10.1016/j.jri.2014.10.001.
7. The role of toll like receptors in pregnancy / E. Amirchaghmaghi, S. A. Taghavi, F. Shapouri [et al.] // *International Journal of Fertility and Sterility*. – 2013. – Vol. 7 (3). – P. 147–154.
8. Koga1 K. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders / K. Koga1, G. Mor // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2011. – Vol. 63 (6). – P. 587–600.
9. FIGO Working Group on Good Clinical Practice in Maternal-Fetal Medicine. Good clinical practice advice: Prediction of preterm labor and preterm premature rupture of membranes // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* – 2019. – Vol. 144 (3). – P. 340–346. doi: 10.1002/ijgo.12744.
10. Romero R. Preterm labor: One syndrome, many causes / R. Romero, S. K. Dey, S. J. Fisher // *Science*. – 2014. – Vol. 345 (6198). – P. 760–765. doi:10.1126/science.1251816.
11. Любомирська К. С. Імуногенетичні чинники розвитку передчасного розриву плодових оболонок при недоношеній вагітності в Запорізькій області / К. С. Любомирська // *Патологія*. – 2018. – № 3. – С. 309–318.

Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *J. Perinat. Med.*, 46(5), 465-488.

3. Musilova, I., Kutová, R., Pliskova, L., Stepan, M., & Menon, R. (2015). Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabour rupture of membranes. *Plos One*. doi: 10.1186/s13104-016-2335-5.



4. Forget, P., Khalifa, C., Defour, J.-P., Latinne, D., Van Pel, M.-C., & Kock, M.D. (2017). What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Research Notes*. doi: 10.1186/s13104-016-2335-5.
5. Bukowski, R., Sadovsky, Y., Goodarzi, H., Zhang, H., & Biggio, J.R. (2017). Onset of human preterm and term birth is related to unique inflammatory transcriptome profiles at the maternal fetal interface. *Peer J.*, 5, e3685. doi: 10.7717/peerj.3685.
6. Lashkari, B.S., Shahana S., & Anumba, D.O. (2015). Toll-like receptor 2 and 4 expression in the pregnant and non-pregnant human uterine cervix. *Journal of Reproductive Immunology*, 107, 43-51. doi: 10.1016/j.jri.2014.10.001.
7. Amirchaghmaghi, E., Taghavi, S.A., Shapouri, F., Saeidi, S., Rezaei, A., & Aflatoonian, R. (2013). The role of toll like receptors in pregnancy. *International Journal of Fertility and Sterility*, 7 (3), 147-154.
8. Koga, K., & Mor, G. (2011). Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63 (6), 587-600.
9. FIGO Working Group on Good Clinical Practice in Maternal-Fetal Medicine. (2019). Good clinical practice advice: Prediction of preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 144 (3), 340-346. doi: 10.1002/ijgo.12744.
10. Romero, R., Dey, S.K., & Fisher, S.J. (2014). Preterm labor: One syndrome, many causes. *Science*, 345 (6198), 760-765. doi:10.1126/science.1251816.
11. Liubomyrska, K.S. (2018). Immunohenetychni chynnyky rozvytku peredchasnoho rozryvu plodovykh obolonok pry nedonoshenii vahitnosti v Zaporizkii oblasti [Immunogenic factors of development of premature rupture of membranes in preterm pregnancies in Zaporizhzhia region]. *Patolohiia – Pathology*, 3, s.309-318 [in Ukrainian].

Отримано 07.03.19