

О.С. Попова ¹, Л.А. Гордеева ¹, И.В. Шаталина ¹, Е.Н. Воронина ², Р.В. Оленникова ³,
С.Л. Нерсисян ³, М.Л. Филиппенко ², А.Н. Глушков ¹

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННОГО ГЕНЕЗА

¹ Институт экологии человека СО РАН (Кемерово)

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

³ Областная клиническая больница (Кемерово)

Изучали ассоциации полиморфизмов генов цитокинов с инфекционной формой невынашиванием беременности. Установили, что у женщин генотип AA гена TNFA (rs1800629) и сочетание генотипов *1/*1 гена IL1RN и GG гена IL6 (rs1800795) вовлечены в патогенез невынашивания беременности.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, невынашивание беременности, инфекция

ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISMS IN CYTOKINE GENES WITH THE INFECTIOUS GENESIS OF RECURRENT MISCARRIAGE

O.S. Popova ¹, L.A. Gordeyeva ¹, I.V. Shatalina ¹, E.N. Voronina ², R.V. Olennikova ³,
S.L. Nersesyan ³, M.L. Filippenko ², A.N. Glushkov ¹

¹ Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³ Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo

The associations of polymorphisms in cytokine genes with the infectious form recurrent miscarriage were investigated. Have established, that at the women a genotype AA of a gene TNFA (rs1800629) and combination of genotypes *1/*1 genes IL1RN and GG of a gene IL6 (rs1800795) are involved in pathogenesis recurrent miscarriage.

Key words: genetic polymorphisms, recurrent miscarriage, infection

Как показали клинические исследования, одной из наиболее частых причин невынашивания беременности (НБ) у женщин может быть урогенитальная бактериально-вирусная инфекция. Между тем, вопрос об этиологической роли инфекции при НБ до сих пор дискутируется. Предполагается, что инфекция, скорее, играет первостепенную роль при спорадическом прерывании беременности, чем при привычном НБ [6]. Имеются данные о том, что инфицированность матери может не нарушать нормального хода беременности и не влияет на развитие плода при отсутствии существенных изменений параметров иммунной системы [3].

Согласно современным представлениям, выживаемость плода зависит от сложной цитокиновой регуляции иммунного ответа матери, при этом во время беременности возникает колеблющееся равновесие между двумя типами цитокинов, которое может смещаться в любом направлении [10]. При нормально развивающейся беременности иммунная система матери более ориентирована на выработку регуляторных цитокинов Т-хелперами II типа (IL-4, IL-10 и др.). Однако исследования показали, что у женщин с НБ цитокиновый профиль направлен на выработку провоспалительных цитокинов Т-хелперами I типа (TNF-α, IL-1 и др.), способных вызывать гибель фетоплацентарной единицы вследствие чрезмерной цитотоксической активации НК-клеток и фагоцитарной активности макрофагов в эндометрии и децидуальной ткани [6].

В настоящее время выявлен полиморфизм генов многих цитокинов. Установлено, что отдельные аллельные варианты генов цитокинов оказывают

влияние на скорость транскрипции, стабильность или качество мРНК, а также активность кодируемых ими белковых продуктов [2]. Взаимосвязь генов цитокинов с НБ активно изучается. Однако, взаимосвязь генов цитокинов с НБ инфекционного генеза остается недостаточно изученной. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение ассоциаций полиморфизмов генов цитокинов (IL1B, IL1RN, TNFA и IL6) с НБ инфекционного генеза.

Проведено обследование 153 женщин репродуктивного возраста, проживающих на территории Кемеровской области и принадлежащих к русской этнической группе. Группу сравнения (контроль) составили 116 женщин с физиологическим течением беременности в сроки беременности 15–35 недель, у которых во время настоящей и предыдущих беременностей отсутствовали спонтанные выкидыши и врожденные аномалии развития у плода (ребенка). Средний возраст женщин был 29,6 года.

В исследуемую группу (НБ) были включены 37 женщин с верифицированной урогенитальной инфекцией, обратившихся в Медико-генетическую консультацию г. Кемерово в связи с невынашиванием беременности. Из них 5 женщин были беременными (9–21 недель), настоящая беременность протекала на фоне угрозы прерывания, а 32 женщины были вне беременности и находились на реабилитации после очередного выкидыша. Основанием для включения в эту группу было отсутствие анатомических и гормональных аномалий, нарушений в спермограмме супруга, а также указаний на медицинские аборт, роды, внематочную беременность и наличие в анамнезе 2 или

3 выкидышей. По результатам ДНК-типирования и ИФА 18 женщин (48,6 %) являлись носителями бактериальных инфекций (*Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*), а 19 (51,4 %) женщин были носителями инфекции смешанного генеза (бактерии + вирусы). Средний возраст женщин этой группы был 29,9 года.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью метода фенол — хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом [15], образцы ДНК хранили при -20°C .

В работе исследовали полиморфизмы G(-308) A гена *TNFA* (rs1800629), T(+3953)C гена *IL1B* (rs1143634), G(-174)C гена *IL6* (rs1800795), содержащие однонуклеотидные замены (SNP), и минисателлитные маркеры, характеризующиеся различным числом tandemных повторов (VNTR) во 2 интроне гена *IL1RN*. Тест-системы для молекулярно-генетического анализа данных полиморфизмов были разработаны в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Генотипирование *TNFA* (rs1800629) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Зонды отличались по структуре на один нуклеотид, соответствующий SNP (находится в центре олигонуклеотидного зонда). Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров (5'-TTCCGAGGGGGGTCTTCTG-3' и 5'-GTTCTATCTTTTTCCTGCATCCTGT-3') и двух зондов (5'-FAM-CCCGTCCTCATGCC-RTQ-3' и 5'-R6G-CCCGTCCCATGCC-FQ-3'), несущих «гаситель» на 3'-конце и разные флуоресцентные красители (FAM и R6G) на 5'-конце. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала 40 — 100 нг ДНК; 300 нМ каждого праймера; по 100 — 200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ-ные dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу — 0,5 ед. акт./реакц.

Амплификация проводилась с помощью амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: начальная денатурация 3' при 96°C ; затем 40 циклов, включающих денатурацию при 96°C - 8'', отжиг праймеров и последующую элонгацию при 60°C — 35'' (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазонах, соответствующих интервалам флуоресценции флуорофоров FAM и R6G).

Полиморфизм генов *IL1RN* (VNTR интрона 2) изучали с помощью аллель-специфичной ПЦР с последующей детекцией в электрофорезе. VNTR аллели в гене *IL1RN*, обозначали следующим образом: аллель *IL1RN**1 содержал четыре tandemных повтора по 86 н.п.; аллель *IL1RN**2 — два tandemных повтора; аллель *IL1RN**3 — пять tandemных повтора; аллель *IL1RN**4 три tandemных повтора.

Типирование SNP полиморфизмов генов *IL1B* (rs1143634) и *IL6* (rs1800795) проводили с помощью

сайт-специфической рестрикции ферментом TaqI (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск) продуктов ПЦР с последующей детекцией в электрофорезе. Детальное описание генотипирования полиморфизмов *IL1B*, *IL1RN*, *IL4* и *IL6* приведено в работах [7, 8].

Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов, а также соответствие распределения наблюдаемых частот генотипов исследуемых генов теоретически ожидаемым по равновесию Харди-Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Вычисление проводили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Попарное сравнение частот генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* и их сочетаний в изучаемых группах проводили при помощи четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации при числе степеней свободы, равном 1, а также двустороннего точного теста Фишера, если значение хотя бы в одной ячейке таблицы сопряженности было меньше 5 (ППП "STATISTICA 6.0", номер серии: № 31415926535897). Ко всем экспериментально установленным значениям уровня значимости была применена поправка Бонферрони. Отличия между группами считали статистически значимыми, если экспериментально установленные значения уровня значимости были меньше уровня значимости по Бонферрони:

$$p < \frac{0,05}{m}$$

где m — количество независимых статистических тестов на уровне значимости α .

Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины отношения шансов (OR). Для OR рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95 % уровне значимости. Ассоциацию считали: отрицательной, если OR было меньше 1; нейтральной (отсутствующей), если OR было равно 1; положительной, если OR было больше 1. Коэффициент OR высчитывали только для значимых по Бонферрони экспериментальных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распределения частот генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* у женщин изучаемых групп показал их соответствие ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Характер распределения частот генотипов генов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрон 2), *TNFA* (rs1800629) и *IL6* (rs1800795) у женщин изучаемых групп в нашем исследовании в целом соответствовал результатам других авторов относительно характера их распределения у жителей Западной Сибири [5, 9].

На первом этапе методом «случай-контроль» отдельно изучали ассоциации материнских генотипов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрон 2), *TNFA* (rs1800629) и *IL6* (rs1800795) с НБ инфекционного генеза. Данные представлены в таблице 1.

Наше исследование показало, что отдельно для полиморфных вариант генов *IL1B*, *IL1RN* и *IL6*

статистически значимые ассоциации с НБ инфекционного генеза у женщин отсутствовали (табл. 1). В то же время установлена единственная высоко значимая положительная ассоциация генотипа AA гена *TNFA* (rs1800629) с НБ инфекционного генеза. Так генотип AA гена *TNFA* значимо чаще встречался у женщин группы НБ в отличие от женщин контрольной группы (21,8 % против 0 %, соответственно; $\chi^2 = 13,70$, $p = 0,0004$, с учетом поправки Бонферрони $p_{\text{cor}} = 0,0016$). Носители этого генотипа имели высокую вероятность развития НБ инфекционного генеза, значение OR для них составило 47,3 (CI 95%: 20,6 – 108,3).

На втором этапе изучали ассоциации сочетаний генотипов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрон 2), *TNFA* (rs1800629) и *IL6* (rs1800795) у женщин с НБ инфекционного генеза. При сопоставлении частот комбинаций генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* в группе НБ и контроль было установлено, что для четырехчленных и трехчленных комбинаций генотипов изучаемых генов цитокинов какие-либо ассоциации с НБ отсутствовали. Однако при сопоставлении двухчленных комбинаций генотипов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* была выявлена единственная значимая положительная ассоциация сочетания

генотипа *IL1RN**1/*1 с генотипом GG гена *IL6*. Сочетание генотипа *IL1RN**1/*1 с GG гена *IL6* чаще выявлялось у женщин группы НБ, чем в контрольной группе (55,6 % против 13,8 % в контроле, $\chi^2 = 11,63$, $p = 0,0006$, с учетом коррекции по Бонферрони (18 статистических тестов) $p_{\text{cor}} = 0,011$). Сочетание генотипов *1/*1 гена *IL1RN* и GG гена *IL6* может в 7,3 раза повышать вероятность развития НБ инфекционного генеза у женщин (CI 95 %: 3,2 – 16,7).

Выявленная нами ассоциация генотипа AA гена *TNFA* (rs1800629) с НБ инфекционного генеза согласуется с данными литературы, где ранее сообщалось о связи аллеля (-308)A гена *TNFA* с НБ (мета-анализ) [14], с преждевременными родами у женщин с бактериальным вагинозом [13], а также с развитием эндотелиальной дисфункции у женщин при гестозе [4].

Следует отметить, что в литературе дискутируется взаимосвязь генотипов *1/*1 гена *IL1RN* и GG гена *IL6* с НБ. С одной стороны, в качестве маркера НБ у женщин чаще рассматривается генотип *2/*2 гена *IL1RN* [11]. С другой стороны, выявлено, что женщины с генотипом *1/*1 имеют низкую концентрацию вагинального белка IL1-Ra [11]. Предполагается, что они могут быть более чувствительны к инфекции и

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов *IL1B*, *IL1RN*, *TNFA* и *IL6* у женщин с физиологическим течением беременности и женщин с НБ инфекционного генеза

Группа	IL1B (rs1143634)			
	Генотипы			
	ТТ	СТ	СС	
контроль	6 (5,2)	45 (38,8)	65 (56,0)	
НБ	2 (5,4)	16 (43,2)	19 (51,4)	
уровень статистической значимости, <i>p</i>	1,000	0,7729	0,7575	
Группа	IL1RN (VNTR, интрон 2)			
	Генотипы			
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2
контроль	65 (48,8)	44 (40,1)	0	6 (7,0)
НБ	19 (55,9)	13 (38,2)	2 (5,4)	2 (5,9)
уровень статистической значимости, <i>p</i>	0.8960	0.8429	0.0556	1.0000
Группа	TNFA (rs1800629)			
	Генотипы			
	AA	GA	GG	
контроль	0	20 (25,3)	59 (76,7)	
НБ	5 (21,8)	7 (30,4)	11 (47,8)	
уровень статистической значимости, <i>p</i>	0,0004 <i>cor</i> 0,0016	0,8250	0,0287 <i>cor</i> 0,115	
Группа	IL6 (rs1800795)			
	Генотипы			
	CC	GC	GG	
контроль	40 (34,5)	57 (49,1)	19 (16,4)	
НБ	6 (16,2)	18 (48,6)	13 (35,2)	
уровень статистической значимости, <i>p</i>	0,5690	0,8910	0,0271 <i>cor</i> 0,108	

Примечание: в скобках указана доля генотипов (%) от общего числа обследованных в данной группе.

повышенной секреции других провоспалительных цитокинов, и это, в свою очередь, отражается на ранних потерях плода или преждевременных родах [14]. У женщин генотип GG гена *IL6* (rs1800795) связан с высоким риском преждевременных родов, не имеющих ассоциации с внутриутробной инфекцией [12], однако, его связь с НБ обсуждается [16]. Установлено, что люди с генотипом GG гена *IL6* (rs1800795) характеризуются высокими плазматическими уровнями белка IL-6 - основного медиатора воспаления, при этом сам генотип GG является маркером ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний [1]. Исходя из данных литературы и собственных результатов, является очевидным, что репродуктивные потери у женщин с сочетанием *IL1RN**1/*1, *IL6**GG могут быть связаны с их генетически детерминированной высокой восприимчивостью к урогенитальной инфекции, при этом данное сочетание может более, чем в 7 раз повышать вероятность развития НБ инфекционного генеза у женщин.

В целом, полиморфные варианты генов *TNFA* (rs1800629), *IL1RN* (VNTR интрон 2), и *IL6* (rs1800795) вносят определенный вклад в развитие инфекционной формы НБ. В дальнейшем планируется провести такую работу на больших выборках с привлечением большего спектра генов-модификаторов иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова С.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в развитии заболеваний печени // Сучасна гастроентерология. — 2004. — № 5. — С. 15—20.
2. Громова А.Ю., Симбирцев А.С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека // Цитокины и воспаление. — 2005. — № 4. — С. 3—12.
3. Левкович М.А. Современные представления о механизмах формирования иммунного ответа при угрозе прерывания беременности инфекционного генеза // Рос. иммунол. журн. — 2010. — № 4. — С. 415.
4. Радков О.В., Калинин М.Н., Заварин В.В. Влияние полиморфизма генов цитокинов на формирование дисфункции эндотелия при гестозе // Цитокины и воспаление. — 2010. — № 3. — С. 15—18.
5. Рудко А.А., Кондратьева Е.И., Янкина Г.Н. Полиморфизм генов-модификаторов иммунного ответа: влияние на развитие целиакии и варианты ее клинического течения в Томской области // Молекулярная биология. — 2008. — № 1. — С. 42—49.

Сведения об авторах

Попова Ольга Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842)545952; e-mail: olmak06@mail.ru)

Гордеева Людмила Александровна — заведующая лабораторией иммуногенетики ИЭЧ СО РАН, кандидат биологических наук (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842)545952; e-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtel.ru)

Шаталина Ирина Викторовна — инженер-технолог лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842)545952; e-mail: ihe@kemtel.ru)

Нерсисян Светлана Львовна — заведующая медико-генетической консультации КОКБ (650000, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22; тел.: 8 (3842) 396023)

Оленникова Римма Витальевна — врач-генетик КОКБ Медико-генетическая консультация (650000, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 22; тел.: 8 (3842) 396023)

Филипенко Максим Леонидович — заведующий группой фармакогеномики ИХБФМ СО РАН, кандидат биологических наук (630090, г. Новосибирск, пр-т Академика М.А. Лаврентьева, д. 8; тел.: (383-3)33-35-71, (383-3)33-35-71; e-mail: max@niboch.nsc.ru)

Глушков Андрей Николаевич — директор ИЭЧ СО РАН, доктор медицинских наук (650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, д. 10; тел.: (3842) 575079)

6. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. — М.: Триада X, 2002. — 305 с.

7. Шабалдин А.В., Гордеева Л.А., Глушкова О.А. Полиморфизм генов HLA DRB1*, IL1Ra*, и IL1β у женщин с репродуктивными нарушениями // Рос. иммунол. журн. — 2008. — № 1. — С. 63—69.

8. Шабалдин А.В., Гордеева Л.А., Глушкова О.А. Ассоциации сочетаний генов HLA DRB1*, IL4*, IL6* с репродуктивными потерями у женщин // Иммунология. — 2008. — № 3. — С. 132—137.

9. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коломейчук М.Ю. Полиморфизм промоторного региона генов IL-4, IL-6 и IL-10 у пациенток с раком молочной железы // Мед. иммунология. — 2009. — № 11. — С. 21—28.

10. Ширшев С.В. Механизмы иммунноэндокринного контроля процессов репродукции. — Екатеринбург: УрО РАН, 2002. — Т. 2. — 557 с.

11. Barton P.T., Gerber S., Skupski D.W., Witkin S.S. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, vaginal Interleukin-1 receptor antagonist concentrations, and vaginal Ureaplasma urealyticum colonization in pregnant women // Infect. Immun. — 2003. — Vol. 71 (1). — P. 271—274.

12. Hartel Ch., Finas D., Ahrens P. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery // Mol. Hum. Reprod. — 2004. — Vol. 10, N 12. — P. 911—915.

13. Macones G.A., Parry S., Elkousy M. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2004. — Vol. 190. — P. 1504—1508.

14. Medica I. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage — a meta-analysis // Reproductive BioMedicine Online. — 2009. — N 3. — P. 406—414.

15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. In: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor, Lab. Press., 1989. — P. 17—19.

16. Unfried G., Bocskor S., Endler G. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage // Hum. Reprod. — 2003. — Vol. 18. — P. 267—270.

17. Witkin S.S., Gerber S., Ledger W.J. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease // Clin Infect Dis. — 2002. — Vol. 34. — P. 204—209.