

© АНОХОВА Л. И., БЕЛОКРИНИЦКАЯ Т. Е., СТРАМБОВСКАЯ Н. Н.

УДК 575.174.015.3:618.39

DOI: 10.20333/2500136-2018-2-52-55

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ

Л. И. Анохова, Т. Е. Белокриницкая, Н. Н. Страмбовская

Читинская государственная медицинская академия, Чита 672000, Российская Федерация

Цель исследования. Оценка ассоциативной связи полиморфизма генов интерлейкинов *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G* и цитокина *TNF α G308A* у женщин с преждевременными родами.

Материал и методы. В исследовании добровольно приняло участие 132 пациентки с преждевременными родами в анамнезе, включая очень ранние и ранние сроки. Женщины, родившие в срок (30 человек), составили группу контроля. Женщины обеих групп сопоставимы по паритету и возрасту. Всем пациенткам проведено молекулярно-генетическое типирование полиморфизма генов цитокинов *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G* и *TNF α G308* на ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови («ДНК-экспресс кровь», ООО «Литех», Москва). В качестве метода исследования использована полимеразная цепная реакция с детекцией результатов гель-электрофорезом в проходящем ультрафиолетовом свете.

Результаты. Отмечена повышенная частота встречаемости (отношение шансов 7,75) мутантного гомозиготного генотипа *IL-2 330GG* у пациенток с преждевременными родами (21,1 % против 3,3 % у беременных, родивших в срок). Мутантное гомозиготное носительство *IL-1 β 31CC* может рассматриваться предиктором ПР в очень ранние и ранние сроки. Можно отметить тот факт, что у женщин, беременность которых закончилась в очень ранние и ранние сроки, рождением новорожденных с критически низкой массой тела, мутантный генотип (-31CC) гена *IL-1 β* встречался в 16 % случаях. У здоровых женщин, родивших в срок, данный генотип не обнаружен.

Заключение. Наличие у пациенток мутантных гомозиготных генотипов *IL-2 330GG* и *IL-1 β 31CC* может быть ассоциировано с преждевременными родами.

Ключевые слова: преждевременные роды, срочные роды, полиморфизм генов, *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G*, *TNF α G308*, предикторы.

Для цитирования: Анохова ЛИ, Белокриницкая ТЕ, Страмбовская НН. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов у женщин с преждевременными родами. *Сибирское медицинское обозрение*. 2018;(2): 52-55. DOI: 10.20333/2500136-2018-2-52-55

POLYMORPHISM OF GENES OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN WOMEN WITH PRETERM BIRTH

L. I. Anokhova, T. E. Belokrinitskaya, N. N. Strambovskaya

Chita State Medical Academy, Chita 672000, Russian Federation

The aim of the research. Evaluation of the association of polymorphism of interleukin *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G* and cytokine *TNF α G308A* genes in women with preterm birth.

Material and methods. The study voluntarily participated 132 patients with preterm birth in history, including very early and early periods. Women who gave birth on time (30 people) made up a control group. Women of both groups are comparable in parity and age. All patients underwent molecular-genetic typing of polymorphism of cytokine genes *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G* and *TNF α G308* on DNA obtained from peripheral blood leukocytes (DNA Express Blood, Litekh, LTD, Moscow). As a research method, a polymerase chain reaction was used with the detection of the results by gel electrophoresis in transmitted ultraviolet light.

Results. An increased incidence (odds ratio 7.75) of the mutant homozygous genotype *IL-2 330GG* in patients with preterm birth (21.1% vs. 3.3% in pregnant women who gave birth on time) was noted. The mutant homozygous carriage of *IL-1 β 31CC* can be considered as a predictor of the PR at very early and early times. It may be noted that in women whose pregnancies ended in very early and early periods, the birth of newborns with a critically low body weight, the mutant genotype (-31CC) of the *IL-1 β* gene occurred in 16% of cases. In healthy women who gave birth on time, this genotype was not found.

Conclusion. The presence of mutant homozygous genotypes *IL-2 330GG* and *IL-1 β 31CC* in patients can be associated with premature birth.

Key words: premature birth, urgent birth, gene polymorphism, *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G*, *TNF α G308*, predictors.

Citation: Anokhova LI, Belokrinitskaya TE, Strambovskaya NN. Polymorphism of genes of proinflammatory cytokines in women with preterm birth. *Siberian Medical Review*. 2018;(2): 52-55. DOI: 10.20333/2500136-2018-2-52-55

Введение

Проблема преждевременных родов (ПР) является актуальной в акушерстве и перинатологии, поскольку недоношенность обуславливает значительную долю перинатальной заболеваемости и смертности [1, 2]. Бесспорно, на вероятность развития и характер течения ПР прямо или косвенно может оказывать влияние иммунная система, в частности, провоспалительные интерлейкины и цитокины. Взаимосвязь между

цитокиновым гомеостазом и протромботическими изменениями в системе гемостаза в настоящее время не подвергается сомнению и обнаруживается при различных заболеваниях и осложнениях, в частности при неразвивающейся беременности [3], привычном выкидыше [4, 5]. Несмотря на большое количество известных методов прогнозирования и биомаркеров, чувствительность используемых тестов не высока и составляет 40-60 %. Более половины случаев ПР

остаются не прогнозируемыми. Большие надежды возлагаются на современные иммунологические и, в большей мере, генетические тесты с выявлением наследственной предрасположенности, что, вероятно, позволит оценивать риск развития ПР [6, 7]. Однако, изолированное определение уровня цитокинов, как биомаркеров ПР, по данным литературы, имело невысокую чувствительность и специфичность, а полученные сведения носили противоречивый характер [8]. Общеизвестно, что продукция цитокинов, как и большинства молекул белковой природы, может зависеть от полиморфизма соответствующих генов [7].

Цель исследования. Изучение полиморфизма генов интерлейкинов *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G* и цитокина *TNF α G308A* при преждевременных родах, включая очень ранние и ранние.

Материал и методы

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Читинской государственной медицинской академии (протокол №44 от 09.11.2012 г.). Для реализации поставленной цели обследовано 132 женщины (основная группа), в анамнезе которых были ПР, включая очень ранние и ранние ПР. В группу сравнения включены 30 здоровых беременных, родивших в срок. Женщины обеих групп сопоставимы по паритету и возрасту.

Молекулярно-генетическое типирование для выявления полиморфизма генов цитокинов *IL-1 β T31C*, *IL-2 T330G* и *TNF α G308A* проведено на ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови («ДНК-экспресс кровь», ООО «Литех», Москва). В качестве метода исследования использована полимеразная цепная реакция с детекцией результатов гель-электрофорезом в проходящем ультрафиолетовом свете.

Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов в группах использовался критерий χ^2 с поправкой Йетса. Использовались таблицы сопряженности 2×2 ($df=1$) для оценки шанса влияния отдельных генотипов и таблица сопряженности 3×2 ($df=2$) для оценки гетерогенности влияния генотипов на исход родов [9]. Уровень значимости выбран $p < 0,05$, нулевая гипотеза отвергается при $p < 0,05$ [10]. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета STATISTICA 10.

Результаты и обсуждение

Изучение частот генотипов и аллелей искомым маркерам в обеих группах обнаружило соответствие равновесию Харди-Вайнберга.

В отличие от точечных спорадических мутаций, полиморфные гены затрагивают большой сегмент населения. Носители полиморфных вариантов обладают склонностью к активации иммунной системы при хирургических вмешательствах, инфекциях,

механическом воздействии на ткань, которая во многом зависит от факторов внешней среды и этнической принадлежности [11]. Важно отметить, что в акушерстве такие осложнения, как синдром потери плода, преждевременные роды, преждевременное излитие околоплодных вод, пуэрперальные, а также целый спектр осложнений у новорожденных, регулируются не только организмом матери, но и самим организмом плода на уровне синдрома системного воспалительного ответа. Так, исследования Т. Е. Белокриницкой с соавт. (2012) установили, что цитокины, оказывая значительную роль в кооперации систем иммунитета и неспецифической резистентности организма, определяют состояние единой интегральной клеточно-гуморальной системы защиты родильницы в послеродовом периоде, о чем свидетельствует максимальное увеличение их уровней на 2-е сутки пуэрперия. Повышенные уровни интерлейкинов *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-8* и цитокина *TNF α* у пациенток с эндометритами на 7-е сутки послеродового периода, свидетельствуют о напряжении защитных реакций, о степени адаптации защитных механизмов для поддержания гомеостаза и готовности организма противостоять инфекционным агентам [12].

Расширение границ понимания акушерских патологий, углубление знаний молекулярных механизмов этих процессов открывает перспективы усовершенствования методов диагностики, в том числе на уровне выявления генетической предрасположенности [5].

Замена аденина на гуанин в промоторной области гена *TNF- α* в позиции -308 (*TNF- α -308G*) приводит к увеличению продукции цитокина, следствием чего является аномальное течение воспалительной реакции. Негроиды, носители данной аллели в 2,5 раза имеют больший риск воспаления, а европеоиды в 1,6 раза. Риски возрастают при хронических системных заболеваниях у матери: метаболическом синдроме, ожирении, антифосфолипидном синдроме, преэклампсии, ДВС синдроме [7].

Из полученных нами результатов необходимо выделить, что сравнение частоты генотипов и аллелей *TNF- α* (*-G308A*) в основной и контрольной группах не обнаружило статистически значимых различий. Так, нормальное гомозиготное носительство *TNF- α* (*-308GG*) среди здоровых, родивших в срок, выявлено в 86,7 % случаев, в группе пациенток с ПР – в 81,3 % ($OШ=0,67$; $\chi^2=0,19$; $p=0,665$). Встречаемость гетерозиготного варианта полиморфизма *-308GA* гена *TNF- α* у здоровых матерей составила 13,3%, а с ПР – 17,2% ($OШ=1,35$; $\chi^2=0,06$; $p=0,811$). В группе здоровых женщин не зарегистрировано мутантных гомозигот (*-308AA*) гена *TNF- α* , в то время как среди матерей, родивших преждевременно, отмечено 2 случая. Различия между группами по таблице сопряжения содержащей все генотипы (3×2) также незначимы ($\chi^2=0,77$; $p=0,679$).

**Частота встречаемости генотипов
и аллелей интерлейкинов (IL) и цитокина TNFα-G308A
у пациенток сравнимых групп**

Таблица

Ген, полиморфизм	Генотип	Частота встречаемости				χ^2 df=1	ОШ (95% ДИ)	χ^2 df=2
		Срочные роды (n=30)		Преждевременные роды (n=128)				
		абс.	%	абс.	%			
IL-1βT31C	-31TT	17	56,7	67	52,4	0,05 p=0,823	0,84 (0,38-1,87)	5,68 p=0,058
	-31TC	13	43,3	41	32,0	0,92 p=0,337	0,62 (0,27-1,39)	
	-31CC	0	0,0	20	15,6	4,05 p=0,044	-	
IL-2T330G	-330 TT	19	63,3	52	40,6	4,19 p=0,041	0,39 (0,17-0,90)	7,27 p=0,026
	-330 TG	10	33,3	49	38,3	0,09 p=0,768	1,24 (0,54-2,87)	
	-330 GG	1	3,4	27	21,1	4,11 p=0,043	7,75 (1,01-59,52)	
TNFα-G308A	-308 GG	26	86,7	104	81,3	0,19 p=0,665	0,67 (0,21-2,09)	0,77 p=0,679
	-308GA	4	13,3	22	17,2	0,06 p=0,511	1,35 (0,43-4,25)	
	-308AA	0	0,0	2	1,5	0,00 p=1	-	

Примечания: χ^2 – оценка таблиц сопряжения; df – число степеней свободы (df=1 – оценка таблицы генотипов 2x2, df=2 – оценка таблицы генотипов 3x2); ОШ – отношение шансов; ДИ – 95% доверительный интервал отношения шансов.

Наши результаты частично согласуются с полученными ранее исследованиями N. M. Jones et al. (2010), не обнаружившими взаимосвязь между полиморфизмом генов цитокинов *TNF-α G308A*, *TNF-α G238A*, *IL-1β C3954T* и бактериальным вагинозом, ПР [13], и совпадают с показателями работы M. F. Annells et al. (2004), которые изучали взаимосвязь между 22 одиночными нуклеотидными полиморфизмами генов цитокинов, в том числе *TNF-α G308A* и ПР [14]. Следует отметить, что исследования взаимосвязей между риском ПР и полиморфизмом генов интерлейкинов *IL-1β T31C*, *IL-2 T330G*, цитокина *TNF-α G308A*, показали и разноречивые результаты. Это, вероятно, объясняется следующими факторами: полиморфизмы не функциональны, но тесно связаны с другими близко расположенными изменениями гена; «ген-ген» взаимодействиями, усложняющими восприимчивость [8].

Анализ полиморфизма гена *IL-1β (-T31C)* в группе пациенток с ПР установил, что частота нормальных гомозигот (ОШ=0,84; $\chi^2=0,05$; p=0,823) и гетерозигот (ОШ=0,62; $\chi^2=0,92$; p=0,337) не отличалась в сравнении с этими показателями у здоровых женщин. Различия между группами по таблице сопряжения, содержащей все генотипы (3x2), незначимы ($\chi^2=5,68$; p=0,058). Можно отметить тот факт, что у женщин, беременность которых закончилась в очень ранние и ранние сроки и рождением новорожденных с критически низкой массой тела, мутантный генотип (-31CC) гена *IL-1β* встречался в 15,6% случаях. У здоровых женщин, родивших в срок, данный генотип не обнаружен ($\chi^2=4,05$; p=0,044).

Повышенное содержание интерлейкина-1β в сыворотке крови, вероятно, приводит к активации естественных киллеров, которые играют непосредственную роль в досрочном прерывании беременности [13, 15]. Это позволяет судить о диагностическом значении -31CC-генотипа, мутантное гомозиготное носительство которого может рассматриваться кандидатом на предикцию ПР.

Далее мы исследовали частоту аллелей и генотипов полиморфизма гена *IL-2 T330G*. Известно, что мутация *T330G* затрагивает промоторную область гена *IL-2*, и характеризуется заменой тиминового на гуаниновый нуклеотид, можно предполагать, что именно она сказывается на скорости транскрипции и трансляции кодируемого белка *IL-2* Т - хелперно-индуцирующими клетками 1 клона.

В группе пациенток с ПР обнаружена меньшая частота распространенности генотипа (-330TT) гена *IL-2* ($\chi^2=4,19$; p=0,041). В тоже время, при сравнении частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма *IL-2 T330G* было выявлено, что гетерозиготный генотип *IL-2 -330TG* идентифицировался у женщин с ПР - 38,3%, в сравнении со здоровыми пациентками 33,3 % ($\chi^2=0,09$; p=0,768). Мутантный гомозиготный генотип гена *IL-2 (-330GG)* выявлен у здоровых женщин в 3,4 %, в группе же пациенток с ПР, родивших новорожденных с критически низкой массой тела, - в 21,1 % ($\chi^2=4,11$; p=0,043). Различия между группами по таблице сопряжения содержащей все генотипы (3x2) значимы ($\chi^2=7,27$; p=0,026).

Таким образом, наличие мутантного варианта GG, частота которого среди пациенток с ПР была увеличена в 7,75 раза, обладает высокой прогностической значимостью. Этот вариант гена может претендовать на роль предиктора ПР.

Заключение

Результаты исследований показали, что носительство определенных вариантов полиморфизма генов интерлейкинов *IL1β (-T31C)*, *IL-2 (-T330G)* может быть ассоциировано с развитием ПР. Выявление данных полиморфизмов генов интерлейкинов может повысить информативность индивидуальных прогностических критериев преждевременных родов. Полученные результаты требуют дальнейших популяционных исследований.

Литература/ References

1. Айламазян ЭК, Зайнулина МС, Петрищев НН. Роль тромбофилии в развитии акушерской патологии. *Акушерство и гинекология*. 2007;(5):38-42. [Ailamazyan EK, Zainulina MS, Petrishchev NN. The role of

thrombophilia in the development of obstetric pathology. *Obstetrics and Gynecology*. 2007; (5): 38-42. (In Russian)]

2. Сидельникова ВМ, Сухих ГТ. Невынашивание беременности. М.: МИА; 2010: 536 с. [Sidelnikova VM, Suhikh GT. Unintention of pregnancy. Moscow: MIA; 2010 : 536 p. (In Russian)]

3. Фролов АЛ, Кулавский ВА, Канева ФМ, Гильманов АЖ. Генетические факторы тромбофилии и состояния системы гемостаза у женщин, перенесших неразвивающуюся беременность. *Российский Вестник акушера-гинеколога*. 2014;(4):24-28. [Frolov AL, Kulavsky VA, Kaneva FM, Gilmanov AN. Genetic factors of thrombophilia and the state of the hemostasis system in women who have undergone an undeveloped pregnancy. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2014;(4):24-28. (In Russian)]

4. Симбирцев АС, Громова АЮ. Функциональный полиморфизм генов цитокинов регуляторных молекул воспаления. *Цитокины и воспаление*. 2005; 4(1):3-10. [Simbirtsev AS, Gromov AY. Functional polymorphism of cytokine genes of regulatory inflammatory molecules. *Cytokine and Inflammation*. 2005;4(1):3-10. (In Russian)]

5. Макасария АД. Тромбогеморрагические осложнения в акушерско-гинекологической практике: руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство. 2011: 1056 с. [Makatsaria AD. Thrombohemorrhagic complications in obstetric-gynecological practice: a guide for doctors. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2011: 1056 p. (In Russian)]

6. Сидельникова ВМ, Кирющенков ПА. Гемостаз и беременность. М.: Триада-Х; 2004 : 208 с. [Sidelnikova VM, Kiryuschenkov PA. Hemostasis and pregnancy. Moscow: Triada-X; 2004. 208 p. (In Russian)]

7. Ходжаева ЗС, Донников АЕ, Федотовская ОИ. Современные подходы и перспективы определения риска спонтанных преждевременных родов. Материалы VI международного конгресса по репродуктивной медицине; 2012: 104-105. [Khodzhaeva ZS, Donnikov AE, Fedotovskaya OI. Modern approaches and prospects for determining the risk of spontaneous preterm birth. Materials of the VI International Congress on Reproductive Medicine; 2012: 104-105. (In Russian)]

8. Macones GA, Parry S, Elkousy M, Clothier B, Ural SH, Strauss JF. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of geneenvironment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;190(6):1504-08.

9. Мухаматзанова МШ, Захарова МА, Вельш ВА. О выборе метода статистической обработки данных для медико-социологических исследований. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2009; 2(22):51-53. [Mukhamatzanova MS, Zakharova MA, Welsh VA. About a choice of a method of statistical data processing for mediko-sociological researches. *Volgograd Journal of Medical Research*. 2009;2(22):51-53. (In Russian)]

10. Ланг ТА, Сесик М. Как описывать статистику в медицине. М.: Практическая медицина; 2011. 480 с. [Lang TA, Sesik M. How to describe statistics in medicine. Moscow: Prakticheskaja medicina; 2011. 480 p. (In Russian)]

11. Тетруашвили НК. Роль иммунных взаимодействий на ранних этапах физиологической беременности и при привычном выкидыше. *Иммунология*. 2008;(2):124-129. [Tetrushvili NK. The role of immune interactions in the early stages of physiological pregnancy and with a habitual miscarriage. *Immunology*. 2008;(2):124-129. (In Russian)]

12. Белокрыницкая ТЕ, Витковский ЮА, Анохова ЛИ, Фролова НИ. Цитокины, субпопуляции лимфоцитов и фагоцитарная активность лейкоцитов при послеродовых эндометритах у пациенток молодого возраста. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012;3(85):71-74. [Belokrinitckaya TE, Vitkovski YA, Anokhova LI, Frolova NI. Cytokines, subpopulations of lymphocytes and phagocytic activity of leukocytes in postpartum endometritis in young patients. *Bulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdelenija Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2012;3(85):71-74. (In Russian)]

13. Jones NM, Holzman C, Friderici KH, Jernigan K, Chung H, Wirth J, Fisher R. Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery. *Journal of Reproductive Immunology*. 2010;87(1-2):82-89.

14. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, Barty P, McDonald HM. Interleukins-1,-4,-6,-10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- β , FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: risk of preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;191(6):2056-67.

Borroni EM, Bonocchi R, Buracchi C, Savino B, Mantovani A, Locati M. Chemokine decoy receptors: new players in reproductive immunology. *Immunological Investigations*. 2008;37(5):483-97.

Сведения об авторах

Анохова Людмила Ильинична, к.м.н., ассистент, Читинская государственная медицинская академия; адрес: Российская Федерация, 672000, г. Чита, ул. Горького, д. 39а; тел.: +7(3022)354324; e-mail: milaanokh@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7901-9529>

Белокрыницкая Татьяна Евгеньевна, д.м.н., профессор, Читинская государственная медицинская академия; адрес: Российская Федерация, 670000, Чита, ул. Горького, д. 39а; тел.: +7(914)4693225; e-mail: tanbell24@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5447-4223>

Страмбовская Наталья Николаевна, к.м.н., доцент, Читинская государственная медицинская академия; адрес: Российская Федерация, 672000, г. Чита, ул. Горького, д. 39а; тел.: +7(3022)354324; email: strambovska@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4288-2895>

Author information

Ljudmila I. Anokhova, Cand.Med.Sci., Assistant, Chita State Medical Academy; Address: 39 "a", Gor'kiy Str., Chita, Russian Federation 670000, Phone: +7(3022)354324; e-mail: milaanokh@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7901-9529>

Tatyana E., Belokrinitckaya, Dr.Med.Sci., Professor, Chita State Medical Academy; Address: 39 "a", Gor'kiy Str., Chita, Russian Federation 670000, Phone: +7(914)4693225; e-mail: tanbell24@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5447-4223>

Natalya N. Strambovska, Cand.Med.Sci., Associate Professor, Chita State Medical Academy; Address: 39 "a", Gor'kiy Str., Chita, Russian Federation 670000, Phone: +7(3022)354324; e-mail: strambovska@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4288-2895>

Поступила 03.11.2017 г.
Принята к печати 13.02.2018 г.