

УДК 575.174.015.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В БЕСПЛОДНЫХ СУПРУЖЕСКИХ ПАРАХ

Машкина Е. В., Лаптина Т. А., Коваленко К. А.

ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия (344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1), e-mail: lenmash@mail.ru

В работе проведен анализ частот 4 полиморфных вариантов генов цитокинов у мужчин и женщин из бесплодных пар. По полиморфизмам -31С-Т гена *IL-1β* и -174 G-C гена *IL-6* различий между сравниваемыми группами не выявлено. Установлено, что среди мужчин из бесплодных пар статистически значимо чаще регистрируются гетерозиготные носители полиморфизма -592 C-A гена *IL-10*. В объединенной группе мужчин и женщин из бесплодных пар выявлены статистически значимые отличия в распределении частот генотипов по полиморфизму -308 G-A гена *TNF* по сравнению с контролем ($\chi^2 = 6,55$ при $P = 0,04$) и аллелей ($\chi^2 = 5,88$ при $P = 0,02$). Большой вклад в данные различия вносят особенности генотипов мужчин из бесплодных пар. В 43 % бесплодных пар у обоих супругов выявляется сочетание полиморфных вариантов генов *IL-1β* и *IL-6* или *IL-6* и *IL-10*. При таком генотипе возможен дисбаланс в соотношении провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: бесплодие, цитокины, полиморфизм генов.

POLYMORPHIC VARIANTS OF CYTOKINE GENES AND INFERTILITY

Mashkina E. V., Laptina T. A., Kovalenko K. A.

Southern federal university, Rostov-on-Don, Russia (344090, Rostov-on-Don, av. Stachki 194/1), e-mail: lenmash@mail.ru

The frequency of cytokine gene polymorphisms was investigated in infertile couples. The differences between control group and infertile couples were not found for polymorphisms -31C-T of gene *IL-1β* and -174 GC of *IL-6* gene. Quantity of men with polymorphism -592 C-A of gene *IL-10* was significantly increased in infertile couples in comparison control group. Polymorphic variants of genes *IL-1β* and *IL-6* and *IL-6* and *IL-10* were determined for man and woman in 43% of infertile couples. The imbalance in the ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines can be associate with this genotype.

Key words: infertility, cytokine, gene polymorphism.

Введение

В последнее время все более актуальной становится проблема нарушения мужской и женской фертильности, приводящей, в большинстве случаев, к бесплодию и невынашиванию беременности. Нарушение репродуктивной функции рассматривают как мультифакторное состояние, обусловленное взаимодействием многих причин, в том числе и генетических. Все больше данных появляется о возможном влиянии генных мутаций и полиморфизма генов на нарушение течения беременности. Частота невынашивания беременности составляет от 10 до 25 % всех беременностей.

Важным компонентом, влияющим на характер течения беременности, является иммунологическое взаимодействие между материнским организмом и развивающимся эмбрионом. Иммуностимуляция во время беременности ведет к продукции цитокинов, инициирующих процессы васкуляризации и кровоснабжения, необходимые для успешной имплантации и плацентации. Цитокины участвуют в иммунологическом взаимодействии между материнским организмом и развивающимся эмбрионом [6, 7, 10].

Различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут определять разный характер протекания воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций. В первую очередь это касается генов регуляторных молекул, обеспечивающих межклеточные взаимодействия, в состав которых входят и цитокины. Риск эмбриональных потерь на ранних сроках беременности может быть обусловлен изменением функциональной активности цитокинов. Уровень цитокинов в тканях-мишенях зависит не только от стимулирующего фактора, но и от уровня экспрессии генов, кодирующих выработку данного цитокина, от аллельных форм генов цитокинов.

Подавляющая часть работ по исследованию генетических причин невынашивания беременности и бесплодия направлена на изучение роли полиморфизма генов фолатного цикла, факторов свертывающей крови и системы детоксикации ксенобиотиков. В то же время исследования генов, контролирующих межклеточные взаимодействия, иммунные реакции немногочисленны и противоречивы. Ассоциация полиморфных вариантов генов сигнальных молекул с нарушением репродуктивной функции человека практически не изучена. При этом данные литературы о влиянии генотипа отца на характер течения беременности практически отсутствуют.

В связи с этим целью данной работы было исследование частоты регистрации полиморфизма *-31C-T* гена *IL-1 β* (MIM *147720), *-174G-C* гена *IL-6* (MIM *147620), *-592C-A* гена *IL-10* (MIM *124092), *-308G-A* гена *TNF α* (MIM *191160) среди мужчин и женщин из бесплодных супружеских пар.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные из лейкоцитов периферической крови мужчин (29) и женщин (40) из бесплодных супружеских пар г. Ростова-на-Дону. Контрольную группу составили 76 образцов ДНК фертильных мужчин и женщин. Поскольку в контрольной группе ни по одному из исследуемых полиморфизмов не было выявлено различий по полу, мы сочли возможным объединить все образцы ДНК в одну группу. Работу проводили на базе НИИ биологии Южного федерального университета.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов DIAtom™ DNA Prep 100 (ООО Центр Молекулярной Генетики). Полиморфизмы генов: интерлейкина-1 β , интерлейкина-6, интерлейкина 10, фактора некроза опухоли α исследовали с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Москва). Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3 % агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе GelDoc (BioRad).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета MS Excel. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди –

Вайнберга определяли по стандартным формулам. Оценку различий в распределении полиморфных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 при помощи программы BIOSTAT.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ частот генотипов по полиморфизму -31C-T гена *IL-1 β* показал, что как в контрольной группе, так и среди лиц из бесплодных супружеских пар преобладают гетерозиготные носители данного полиморфизма (табл. 1). Доля гомозигот по данному полиморфному варианту гена не превышает 20 %. Статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по исследуемому полиморфизму между сравниваемыми группами не выявлено. Не выявлено различий в частотах регистрации генотипов и аллелей между сравниваемыми группами и по полиморфизму -174 G-C гена *IL-6* (табл. 1).

Таблица 1. Частота генотипов (%) и аллелей генов *IL-1 β* и *IL-6* среди мужчин и женщин из бесплодных супружеских пар

Ген, полиморфизм	Контроль	Бесплодные пары	
		Мужчины, абс. (%)	Женщины, абс. (%)
<i>IL-1β</i> -31C-T			
<i>CC</i>	28 (36.8%)	9 (31.0%)	14 (35.0%)
<i>CT</i>	36 (47.4%)	14 (48.3%)	18 (45.0%)
<i>TT</i>	12 (15.8%)	6 (20.7%)	8 (20.0%)
Частота аллели -31C	0.395	0.448	0.425
χ^2_1 (P)		0.5 (0.78)	0.33 (0.85)
χ^2_2 (P)		0.5 (0.48)	0.2 (0.66)
PXB	P = 1.0	P = 1.0	P = 0.65
<i>IL-6</i> -174 G-C			
<i>GG</i>	14 (18.4%)	7 (24.1%)	5 (12.5%)
<i>GC</i>	46 (60.5%)	16 (55.2%)	23 (57.5%)
<i>CC</i>	16 (21.1%)	6 (20.7%)	12 (30.0%)
Частота аллели -174G	0.513	0.483	0.588
χ^2_1 (P)		0.45 (0.8)	1.47 (0.48)
χ^2_2 (P)		0.16 (0.69)	1.17 (0.28)
PXB	P = 0.19	P = 0.6	P = 0.35

Примечание: χ^2_1 – сравнение частот генотипов с контролем; χ^2_2 – сравнение частот аллелей с контролем; PXB – соответствие равновесию Харди – Вайнберга.

В контрольной группе лиц преобладают гомозиготы по аллели -592C гена *IL-10* (табл. 2). Около трети лиц данной группы являются гетерозиготными носителями полиморфного варианта данного гена. Подобный характер распределения частот генотипов по полиморфизму -592 C-A гена *IL-10* выявлен и среди женщин из бесплодных супружеских пар. В то же время среди мужчин из бесплодных пар статистически значимо чаще регистрируются гетерозиготные носители данного полиморфизма (OR = 2,67, P 95% CI 1,11-6,41).

Полиморфный вариант гена фактора некроза опухоли в гетерозиготном и гомозиготном состоянии зарегистрирован в контрольной группе лиц почти в 40 % случаев (табл. 2). В то же время среди мужчин и женщин из бесплодных пар данный показатель не превышает 25 % при одновременном увеличении доли гомозигот по аллели -308G гена *TNF*. При объединении группы мужчин и женщин из бесплодных пар выявлены статистически значимые отличия в распределении частот генотипов по полиморфизму -308G-A гена *TNF* по сравнению с контролем ($\chi^2 = 6,55$ при $P = 0,04$) и аллелей ($\chi^2 = 5,88$ при $P = 0,02$). Большой вклад в данные различия вносят особенности генотипов мужчин из бесплодных пар.

Таблица 2. Частота генотипов (%) и аллелей генов *IL-10* и *TNF α* среди мужчин и женщин из бесплодных супружеских пар

Ген, полиморфизм	Контроль	Бесплодные пары	
		Мужчины, абс. (%)	Женщины, абс. (%)
<i>IL-10 -592 C-A</i>			
CC	42 (55.3%)	1 (44.8%)	20 (50.0%)
CA	24 (31.1%)	16 (55.2%)	18 (45.0%)
AA	10 (13.1%)	0	2 (5.0%)
Частота аллели -31C	0.289	0.276	0.275
$\chi^2_1(P)$		7.32 (0.03)	3.13 (0.21)
$\chi^2_2(P)$		0.04 (0.85)	0.05 (0.82)
PXB	P = 0.15	P = 0.1	P = 0.56
<i>TNFα -308G-A</i>			
GG	46 (60.5%)	23 (79.3%)	30 (75.0%)
GA	26 (34.2%)	6 (20.7%)	10 (25.0%)
AA	4 (5.3%)	0	0
Частота аллели -174G	0.224	0.103	0.125
$\chi^2_1(P)$		3.91 (0.14)	3.66 (0.16)
$\chi^2_2(P)$		3.94 (0.05)	3.32 (0.07)
PXB	P = 1.0	P = 0.79	P = 0.3

Примечание: χ^2_1 – сравнение частот генотипов с контролем; χ^2_2 – сравнение частот аллелей с контролем; PXB – соответствие равновесию Харди – Вайнберга.

Таким образом, при анализе генотипов по генам цитокинов среди мужчин и женщин с нарушением репродуктивной функции выявлено увеличение или снижение доли носителей полиморфных вариантов генов *IL-10* и *TNF* (соответственно) среди мужчин. В то же время большая часть исследований по бесплодию человека включает анализ ДНК только женщин и не учитывает вклад отцовского генотипа.

Особое значение имеет выявление значимого сочетания полиморфных вариантов генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, ассоциированного с невынашиванием беременности в первом триместре, поскольку вероятнее всего наблюдается аддитивный эффект нескольких генов.

Сочетанный анализ частоты исследуемых полиморфизмов показал, что 93 % мужчин и женщин с нарушением репродуктивной функции являются носителями хотя бы одного полиморфизма исследуемых генов. 43 % мужчин и 28 % женщин имеют в своем генотипе полиморфные варианты 3 или 4 исследуемых генов.

Сочетанный анализ генотипов по исследуемым полиморфизмам генов цитокинов в супружеских парах показал, что в 43 % бесплодных пар у обоих супругов выявляется сочетание полиморфных вариантов генов *IL-1β* и *IL-6* или *IL-6* и *IL-10*. При таком генотипе возможен дисбаланс в соотношении провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Одной из основных причин нарушения течения беременности в первом триместре является нарушение инвазии трофобласта и плацентации. Процессы имплантации и развития эмбриона разнонаправлено регулируются различными цитокинами. Поскольку формирование плаценты подразумевает возникновение новых кровеносных сосудов, обеспечивающих кровотоки в системе мать – плацента – плод, то особенности гемодинамики, скорости роста сосудов, особенности работы эндотелия во многом определяют ранние этапы развития плода и характер течения беременности. В свою очередь процессы васкуляризации и кровоснабжения иницируются цитокинами.

Провоспалительные цитокины синтезируются на ранних сроках беременности в незначительном количестве, обеспечивая динамическое равновесие между процессами инвазии и отторжения трофобласта. По данным литературы известно, что при беременности связывание *IL-1β* с рецепторами в материнском организме необходимо для имплантации [1]. Высказывается мнение о том, что *IL-1β* способствует развитию плода, стимулирует пролиферацию клеток, образующих плацентарный барьер [2]. Одним из важнейших семейств цитокинов, регулирующих процесс имплантации бластоцисты, является семейство *IL-6*. Без его нормальной экспрессии в матке имплантация невозможна [10].

Однако продукция провоспалительных цитокинов выше нормального уровня может приводить к тромбозам и ишемическим некрозам в структуре фетоплацентарных тканей. Спонтанные аборт, как правило, сопровождаются изменением уровня продукции гестационными тканями ряда цитокинов. Провоспалительные цитокины обладают не только прямым эмбриотоксическим эффектом, но также ограничивают инвазию трофобласта, нарушая нормальное его формирование. Кроме того, избыточное количество провоспалительных цитокинов приводит к активации протромбиназы, что обуславливает тромбозы, инфаркты трофобласта и его отслойку, и в конечном итоге – выкидыш в I триместре беременности.

Повышенный уровень *IL-1 β* способен стимулировать продукцию простагландинов, тем самым запускать механизмы преждевременного отторжения плода [2]. В ряде работ отмечено снижение уровня *IL-1 β* при спонтанном аборте. Дефицит *IL-1 β* как проангиогенного цитокина может приводить к нарушению ангиогенеза плаценты в ранние сроки гестационного развития и как следствие этого – к самопроизвольному прерыванию беременности [8].

Данные литературы о возможной связи между наличием полиморфизма промоторных участков исследуемых нами генов цитокинов и риском патологии беременности в I триместре противоречивы. Одни авторы [3, 4, 9, 12] считают, что наличие данных полиморфизмов не ассоциировано с повышенным риском невынашивания беременности. В исследованиях других авторов выявлены ассоциации полиморфизмов исследуемых генов цитокинов с риском спонтанного прерывания беременности [4, 5, 11].

Полученные нами данные показывают, что в бесплодных супружеских парах более чем в 40 % случаев как мужчина, так и женщина имеют в своем генотипе полиморфные варианты по крайней мере двух генов цитокинов – интерлейкина 6 с интерлейкином 10 или интерлейкином 1 β . Исследуемый нами полиморфизм гена интерлейкина 1 β обуславливает повышение уровня экспрессии данного цитокина. При полиморфизме -592 C-A гена противовоспалительного цитокина *IL-10* активность транскрипции гена снижается. Таким образом, при обоих вариантах генотипов возникает ситуация повышенной продукции провоспалительных цитокинов или нарушение баланса между уровнем про- и противовоспалительных цитокинов, что может обуславливать нарушение ранних этапов эмбрионального развития человека. Существенный вклад в особенности протекания ранних этапов эмбрионального развития вносит генотип отца, роль которого часто недооценивается. Полученные нами данные указывают на повышение частоты регистрации в бесплодных парах именно мужчин с полиморфными вариантами генов цитокинов.

Список литературы

1. Левкович М. А. Современные представления о роли цитокинов в генезе физиологического и патологического течения беременности / Левкович М. А. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2008. – № 3.
2. Чистякова Г. Н. Оценка продукции цитокинов при беременности, осложненной угрозой прерывания в первом триместре / Чистякова Г. Н., Газиева И. А., Ремизова И. И., Черданцева Г. А. // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 5. – С. 96-98.

3. Agrawal S. IL-1 gene cluster variants and recurrent pregnancy loss among North Indian women: retrospective study and meta analysis / Agrawal S., Parveen F., Faridi R., Prakash S. // *Reprod Biomed Online*. – 2012. – V. 3. – P. 342-351.
4. Bombell S. Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis / Bombell S., McGuire W. // *Aust NZJ Obstet Gynaecol*. – 2008. – V. 48. – P. 147-154.
5. Costeas P. Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss / Costeas P., Koumouli A. // *Hum Immunol*. – 2004. – V. – 65. – P. 135-141.
6. Dimitriadis E. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation / Dimitriadis E., White C., Jones R. // *Human Reproduction Update*. – 2005. – V.24. – P. 612-628.
7. Jones R. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta / Jones R., Stoikos C., Findlay J. // *Reproduction*. – 2006. – V. 132. – P. 217-232.
8. Kauma S. Cytokines in implantation / Kauma S. // *J. Reprod. Fertil. Suppl*. – 2002. – V. 55. – P. 42 – 54.
9. Kaur A. Recurrent pregnancy loss: TNF- α and IL-10 polymorphisms / Kaur A., Kaur A. // *J Hum Reprod Sci*. – 2011. – V. 4. – P. 91-94.
10. Kimber S. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology / Kimber S. // *Reproduction*. – 2005. – V. 130. – P. 131-145.
11. Levrant S. IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms are not risk factors for recurrent pregnancy loss: evaluation of couples / Levrant S., Coulam C., Jeyendran R. // *Am J Reprod Immunol*. – 2008. – V.60. – P. 224-228.
12. Zammiti W. Associations between tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- α polymorphisms and idiopathic recurrent miscarriage / Zammiti W., Mtiraoui N., Khairi H., Gris J-C., Almawi W., Mahjoub T. // *Soc. Reprod. Fertility*. – 2008. – V. 135. – P. 397-403.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России", соглашение 14.A18.21.0199.

Рецензенты:

Амелина Светлана Сергеевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом биомедицины НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.

Усатов Александр Вячеславович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом изменчивости генома НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.