

## ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Радьков О.В.<sup>1</sup>, Коричкина Л.Н.<sup>1</sup>, Сизова О.В.<sup>1</sup>, Вольф Ю.В.<sup>2</sup>, Парамонова Е.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тверь, e-mail: unag@mail.ru;

<sup>2</sup>ГБУЗ ТО «Областной клинический перинатальный центр им. Е.М. Бакуниной», Тверь, e-mail: wolfful@mail.ru

Преэклампсия (ПЭ) – угрожающее жизни осложнение беременности, характеризующееся высокой частотой материнской и перинатальной заболеваемости, а также смертности во всем мире. Этиология ПЭ остается неясной, но установлена важная роль иммунной системы в развитии этого заболевания. В этой связи изучена ассоциация полиморфизмов rs1800896 гена *IL-10* и rs1800629 гена *TNF-α* с риском ранней и поздней ПЭ. Обследовано 246 беременных с ПЭ (ранняя ПЭ – 110 и поздняя ПЭ – 136 пациенток) и 108 женщин с нормальной беременностью. Выявлены маркеры, увеличивающие риск ранней ПЭ: генотипы GA (отношение шансов (OR) - 1,90) и GA+AA (OR - 2,03) локуса rs1800896 гена *IL-10*. Согласно нашим данным, носительство генотипов GA и AA сайта rs1800896 гена *IL-10* ассоциируется с повышением риска поздней ПЭ (OR - 1,72 и 2,30 соответственно). Риск тяжелой ранней ПЭ повышен в присутствии генотипов AG+AA локуса rs1800896 гена *IL-10* (OR-2,33). Установлена значимая ассоциация с тяжелой поздней ПЭ для генетических маркеров: генотип AA локуса rs1800896 гена *IL-10* и комбинации «rs1800896 *IL-10* (AA) + rs1800629 *TNF-α* (GA+AA)» (OR - 2,91 и 3,04 соответственно). Полиморфизм rs1800629 гена *TNF-α* не связан с риском ранней и поздней ПЭ.

Ключевые слова: преэклампсия, ген *IL-10*, ген *TNF-α*, полиморфизм генов.

## CYTOCINE GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO EARLY AND LATE PREECLAMPSIA

Radkov O.V.<sup>1</sup>, Korichkina L.N.<sup>1</sup>, Sizova O.V.<sup>1</sup>, Wolf J.V.<sup>2</sup>, Paramonova E.K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tver State Medical University, Tver, e-mail: unag@mail.ru;

<sup>2</sup>Regional Bakunina perinatal centre, Tver, e-mail: wolfful@mail.ru

Preeclampsia (PE) is a life-threatening complication of pregnancy that is associated with a high rate of maternal and perinatal morbidity and/or mortality worldwide. The etiology of PE is still uncertain; however, recently the role of the immune system has gained in importance. The aim of this study was to investigate the association between rs1800896 gene *IL-10* and rs1800629 gene *TNF-α* polymorphisms with early and late PE. A total of 246 pregnant women with PE (early PE – 110 and late PE – 136) and 108 women with normal pregnancy were considered for the study. Our study has indicated that GA genotype and GA+AA of rs1800896 gene *IL-10* polymorphism with a significantly increased risk of early PE. Odds ratio (OR) for these individuals was determined to be 1,90 and 2,03, respectively. Our findings indicated that GA and AA genotypes of rs1800896 gene *IL-10* correlate with elevated risk of developing late PE (OR of 1,72 and 2,30). We found that AG+AA genotype of rs1800896 gene *IL-10* was associated with the increased risk of severe early PE (OR - 2,33). There was significant association between genotype AA rs1800896 gene *IL-10* and «rs1800896 *IL-10* (AA) + rs1800629 *TNF-α* (GA+AA)» and severe late PE (OR of 2,91 and 3,04). However, the rs1800629 gene *TNF-α* polymorphism was not found to play a critical role in susceptibility to early and late PE.

Keywords: preeclampsia, *IL-10* gene, *TNF-α* gene, gene polymorphism.

Преэклампсия (ПЭ) осложняет от 5 до 8% беременностей в мире и является ведущей причиной материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [1]. В настоящее время существует концепция о ранней (начало заболевания до 34 недель) и поздней (манifestация в 34 недели беременности и позже) формах ПЭ. Этиологические и патогенетические факторы этих вариантов ПЭ кардинально различаются, что позволяет говорить о ранней и поздней ПЭ как о двух разных заболеваниях [2]. Ранняя ПЭ ассоциируется с выраженным нарушением кровотока в маточной артерии, выявляемым с

помощью доплерометрии, задержкой роста плода, а также крайне неблагоприятными исходами для матери и плода. Напротив, поздняя ПЭ характеризуется нормальным кровотоком в маточной артерии или его незначительным снижением, меньшей частотой страдания плода, а также более благоприятными акушерскими и перинатальными исходами [3].

Локус rs1800629 гена фактора некроза опухолей – альфа (*TNF-α*) ассоциирован с риском ПЭ, т. к. в исследовании случай-контроль у беременных с генотипом AA риск этого осложнения гестации возрастал в четыре раза [4]. Вероятно, это связано с тем, что мутантный аллель А полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* увеличивает транскрипцию в промоторной области гена и концентрацию *TNF-α* [5]. Несмотря на изученную роль провоспалительного *TNF-α* в иницировании и прогрессировании ПЭ, ассоциация локуса rs1800629 гена *TNF-α* с гестационным повышением артериального давления (АД) опровергается [6].

Интерлейкин – 10 (IL-10) – противовоспалительный цитокин, его уровень в плазме крови и экспрессия гена в плаценте у пациенток с ПЭ снижается, что в свою очередь ассоциировано с носительством мутантного генотипа AA локуса rs1800896 гена *IL-10* [7]. Таким образом, полиморфизм rs1800896 гена *IL-10* ассоциирован с ПЭ [8]. Однако результаты метааналитического обзора указывают на отсутствие ассоциации локуса rs1800896 гена *IL-10* с ПЭ [9]. Кроме того, на значительной выборке не установлено различий по полиморфизму rs1800896 гена *IL-10* между группами пациенток с ПЭ и здоровыми беременными [10].

Таким образом, сведения об ассоциации полиморфизмов rs1800896 гена *IL-10* и rs1800629 гена *TNF-α* с ПЭ противоречивы, а их связь со сроком возникновения заболевания не изучалась. В этой связи целью настоящего исследования явился анализ влияния указанных молекулярных вариантов генов *IL-10* и *TNF-α* на формирование восприимчивости к ранней и поздней ПЭ.

### **Материалы и методы исследования**

Для анализа ассоциаций в качестве «случаев» выделена группа из 246 беременных с ПЭ (основная группа). Критерии включения в группу: наличие артериальной гипертензии после 20-й недели беременности (систолическое АД  $\geq 140$  мм рт. ст. и/или диастолическое АД  $\geq 90$  мм рт. ст.) и клинически значимая протеинурия (наличие белка в моче  $\geq 0,3$  г/л в суточной пробе). В основной группе выделено 110 пациенток с ранней ПЭ и 136 пациенток с поздней ПЭ. В качестве «контролей» сформирована группа из 108 беременных без симптомов ПЭ (контрольная группа).

Выделение тотальной геномной ДНК пациенток из 100 мкл цельной венозной крови,

стабилизированной этилендиаминтетрауксусной кислотой, проводили сорбентным методом с использованием набора «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лаборатория «Изоген», Россия) в соответствии с протоколом изготовителя. Однонуклеотидные полиморфизмы rs1800896 гена *IL-10* и rs1800629 гена *TNF-α* типировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора праймеров и аллель-специфических гибридизационных зондов (Applied Biosystems, США). В качестве детектирующего амплификатора использовали систему регистрации ПЦР ДНК «ABI Prism» 7500 (Applied Biosystems, США).

При проведении сравнений независимых выборок применяли критерий  $\chi^2$  и непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни. Тесты на соблюдение равновесия Харди–Вайнберга и выявление ассоциаций в исследованиях «случай – контроль» выполнялись по критерию  $\chi^2$ . Об ассоциации генотипов анализируемых полиморфных локусов генов *IL-10* и *TNF-α* с ранней и поздней ПЭ судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR) с 95% доверительным интервалом (95% CI).

### Результаты исследования и их обсуждение

Данные анализа клинических характеристик обследованных беременных в контрольной и основной группах суммированы в таблице 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика беременных контрольной группы и пациенток с ранней и поздней преэклампсией (n (%), Me (Q1; Q3))

Признак	Ранняя ПЭ (n=110)	Поздняя ПЭ (n=136)	Контроль (n=108)
Возраст, лет	25,9 (19,3; 36,3)	29,4 (20,4; 41,2)	25,7 (18,8; 37,6)
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	30,6 (27,7; 33,6)	30,8 (29,0; 34,6)*	27,5 (24,8; 30,2)
САД, мм рт. ст.	147,1 (142,5; 151,7)**	145,3 (141,8; 148,2)*	116,7 (108,5; 128,8)
ДАД, мм рт. ст.	92,8 (91,9; 98,4)**	92,7 (90,5; 97,6)*	78,7 (83,9; 68,2)
Срок родов, недель	31,0 (27,8; 33,1)**#	37,1 (35,0; 39,2)	39,8 (38,4; 40,9)
Кесарево сечение	108 (96,4%)**#	109 (76,2%)*	15 (12,5%)
Естественные роды	4 (3,6%)**#	34 (23,8%)*	105 (87,5%)

Примечание: различия значимы между группами: \* - поздней ПЭ и контрольной; \*\* - ранней ПЭ и контрольной; # - ранней и поздней ПЭ (по критерию  $\chi^2$  или *U*-критерию Манна-Уитни).

Индекс массы тела (ИМТ) у пациенток с поздней ПЭ значимо выше, чем в группе контроля ( $Z=2,01$ ,  $p=0,044$ ). Показатели клинического систолического АД в группах с ранней и поздней ПЭ превосходили значимо таковые в контроле ( $Z=2,03$ ,  $p=0,042$ ;  $Z=1,98$ ,  $p=0,045$  соответственно), а также аналогичный показатель по диастолическому АД ( $Z=2,02$ ,  $p=0,042$ ;  $Z=2,05$ ,  $p=0,038$  соответственно). Пациентки с ранней ПЭ значимо раньше родоразрешены не

только при сравнении с группой контроля ( $Z=2,14$ ,  $p=0,032$ ), но и с группой поздней ПЭ ( $Z=2,08$ ,  $p=0,041$ ). Количество пациенток в группе с ранним началом ПЭ, родоразрешенных абдоминальным путем, было подавляющим, что обеспечило значимое различие по этому показателю с группой беременных с поздней ПЭ и контрольной ( $\chi^2=20,22$ ,  $p<0,01$  и  $\chi^2=163,82$ ,  $p<0,01$ ). При сравнении по показателю «кесарево сечение - естественные роды» группы с поздней ПЭ и беременных с нормальным АД обнаружены значимые различия ( $\chi^2=106,32$ ,  $p<0,01$ ) за счет высокой частоты абдоминальных родоразрешений у гипертензивных пациенток.

Частоты генотипов полиморфного локуса rs1800896 гена *IL-10* распределились согласно ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга: в контрольной группе  $\chi^2=1,28$ ,  $p=0,26$ , в группе беременных с ранней ПЭ  $\chi^2=1,16$ ,  $p=0,28$ .

При изучении частоты встречаемости генотипов локуса rs1800896 гена *IL-10* у пациенток с ранней ПЭ и в контрольной группе были получены следующие результаты (табл. 2).

Таблица 2

Результаты анализа ассоциации генотипов и аллелей полиморфизма rs1800896 гена *IL-10* с ранней преэклампсией

Генотипы и аллели	Контроль (n=108)	Случай (n=110)	Критерий $\chi^2$ (p)	OR (95% CI)
Генотип GG	58 (53,7%)	40 (36,4%)	6,83 (0,03)	0,49 (0,29–0,85)
Генотип GA	39 (36,1%)	57 (51,8%)		1,90 (1,11–3,27)
Генотип AA	11 (10,2%)	13 (11,8%)		1,18 (0,50–2,77)
Генотип GA+AA	50 (46,3%)	70 (63,6%)	6,62 (0,01)	2,03 (1,18–3,49)
Аллель G	0,718	0,623	4,43 (0,04)	0,65 (0,43–0,97)
Аллель A	0,282	0,377		1,54 (1,03–2,30)

Примечание: OR – отношение шансов; 95% CI – 95% доверительный интервал.

В группе пациенток с осложненным течением беременности значимо повышена частота встречаемости аллеля A и гетерозиготного GA генотипа сайта rs1800896 гена *IL-10*, что позволило выделить их как маркеры, ассоциированные с риском развития ранней ПЭ; так, присутствие их в генотипе увеличивает риск заболевания в 1,54 и 1,90 раза соответственно. Расчет доминантной модели наследования (генотип GG против генотипов GA+AA) показал ассоциацию генотипов с мутантным аллелем A с ранней ПЭ, т.к. риск данного осложнения беременности значимо увеличивается у носителей этих генотипов в

2,03 раза.

Результаты статистического анализа продемонстрировали, что информативными маркерами наследования защитных механизмов относительно ранней ПЭ является носительство аллеля G и генотипа GG. Данное положение основано на том, что в группе контроля указанные молекулярные варианты полиморфного сайта rs1800896 гена *IL-10* обнаруживались значимо чаще, чем у пациенток с ранней ПЭ (OR=0,49 и OR=0,65 соответственно).

Распределение генотипов полиморфного локуса rs1800629 гена *TNF-α* соответствовало закону равновесия Харди-Вайнберга. Показатели соответствия составили для группы контроля:  $\chi^2=1,70$ ,  $p=0,19$ , в группе пациенток с ранней ПЭ -  $\chi^2=3,00$ ,  $p=0,06$ .

Таблица 3

Результаты анализа ассоциации генотипов и аллелей полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* с ранней преэклампсией

Генотипы и аллели	Контроль (n=108)	Случай (n=110)	Критерий $\chi^2$ (p)	OR (95% CI)
Генотип GG	85 (78,7%)	81 (73,6%)	0,94 (0,62)	0,76 (0,40–1,41)
Генотип AG	20 (18,5%)	24 (21,8%)		1,23 (0,63–2,38)
Генотип AA	3 (2,8%)	5 (4,5%)		1,67 (0,39–7,15)
Генотип AG+AA	23 (21,3%)	29 (26,4%)	0,77 (0,38)	1,32 (0,71–2,47)
Аллель G	0,880	0,845	1,07 (0,3)	0,75 (0,43–1,30)
Аллель A	0,120	0,155		1,34 (0,77–2,31)

Примечание: OR – отношение шансов; 95% CI – 95% доверительный интервал.

Частота генотипов и аллелей локуса rs1800629 гена *TNF-α* значимо не различалась между группой контроля и группой с ранней ПЭ, поэтому можно полагать, что указанный молекулярный вариант гена *TNF-α* не влияет на риск развития этого осложнения беременности (табл. 3).

Тяжелая ранняя ПЭ отмечена у 47 (42,7%) беременных из общей выборки в 110 пациенток. Риск тяжелого течения ранней ПЭ оказался повышенным у носителей минорных аллелей A в генотипах локуса rs1800896 гена *IL-10*. Выявленный генетический маркер увеличивает риск тяжелого течения ранней формы ПЭ в 2,33 раза (OR=2,33 95%CI [1,02–5,31]).

Недостаточный рост плода в анализируемой выборке отмечен у 44 пациенток (40,0%). Генотипы GA+AA локуса rs1800629 гена *TNF-α* ассоциируются с развитием недостаточного роста плода у пациенток с ранней ПЭ, увеличивая риск этого осложнения беременности в

2,83 раза (OR=2,83 95%CI [1,18-6,77]).

Распределение частот генотипов полиморфного варианта rs1800896 гена *IL-10* соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (для группы контроля -  $\chi^2=1,28$ ,  $p=0,26$ , для группы беременных с поздней ПЭ -  $\chi^2=0,09$ ,  $p=0,76$ ).

Полиморфный локус rs1800896 гена *IL-10* ассоциирован с поздней ПЭ, т. к. различие частот генотипов и аллелей между группами оказалось статистически значимым (табл. 4). Нарастание количества минорных аллелей А связано с увеличением риска поздней ПЭ; так, носительство гетерозиготного AG генотипа увеличивает в 1,72 раза вероятность возникновения этого осложнения гестации, а гомозиготный генотип AA в 2,3 раза.

Таблица 4

Результаты анализа ассоциации генотипов и аллелей полиморфизма rs1800896 гена *IL-10* с поздней преэклампсией

Генотипы и аллели	Контроль (n=108)	Случай (n=136)	Критерий $\chi^2$ (p)	OR (95% CI)
Генотип GG	58 (53,7%)	48 (35,3%)	8,36 (0,02)	0,43 (0,19-0,98)
Генотип GA	39 (36,1%)	67 (49,3%)		1,72 (1,02-2,88)
Генотип AA	11 (10,2%)	21 (15,4%)		2,30 (1,01-5,25)
Генотип GA+AA	50 (46,3%)	88 (64,7%)	8,3 (0,004)	2,13 (1,27-3,56)
Аллель G	0,718	0,599	7,43 (0,006)	0,59 (0,40-0,86)
Аллель A	0,282	0,401		1,70 (1,16-2,49)

Примечание: OR – отношение шансов; 95% CI – 95% доверительный интервал.

Аллель А повышает риск развития рассматриваемого заболевания в 1,7 раза. Расчет доминантной модели наследования для полиморфизма rs1800896 гена *IL-10* (генотип GG против генотипов GA+AA) указывает, что вероятность поздней ПЭ увеличивается в присутствии минорных аллелей в генотипе в 2,13 раза.

Мажорный аллель G и гомозиготный генотип GG молекулярного варианта rs1800896 гена *IL-10* обладает защитным эффектом с точки зрения ассоциации с поздней ПЭ (OR=0,59 и 0,43 соответственно).

Распределение генотипов полиморфного локуса rs1800629 гена *TNF- $\alpha$*  не отличалось от ожидаемого при равновесии Харди-Вайнберга. Показатели соответствия для группы контроля:  $\chi^2=1,70$ ,  $p=0,19$ , для группы беременных с поздней ПЭ -  $\chi^2=3,60$ ,  $p=0,06$ .

На основании результатов анализа ассоциации генотипов и аллелей локуса rs1800629 гена *TNF- $\alpha$*  с поздней ПЭ установлено, что указанный полиморфный маркер не влияет на

риск этого осложнения беременности (табл. 5).

Таблица 5

Результаты анализа ассоциации генотипов и аллелей полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* с поздней преэклампсией

Генотипы и аллели	Контроль (n=108)	Случай (n=136)	Критерий $\chi^2$ (p)	OR (95% CI)
Генотип GG	85 (78,7%)	97 (71,3%)	1,97 (0,37)	0,67 (0,37–1,22)
Генотип GA	20 (18,5%)	32 (23,5%)		1,35 (0,72–2,53)
Генотип AA	3 (2,8%)	7 (5,1%)		1,90 (0,48–7,53)
Генотип AG+AA	23 (21,3%)	29 (26,4%)	1,73 (0,19)	1,49 (0,82–2,69)
Аллель G	0,880	0,831	2,27 (0,13)	0,67 (0,40–1,13)
Аллель A	0,120	0,169		1,49 (0,89–2,50)

Примечание: OR – отношение шансов; 95% CI – 95% доверительный интервал.

Пациенток в анализируемой выборке с тяжелой поздней ПЭ было 48 (35,3%). Генетическими маркерами тяжелой поздней ПЭ оказались гомозиготный генотип AA локуса rs1800896 гена *IL-10* (OR=2,91 95%CI [1,13-7,56]) и комбинация генотипов локуса rs1800629 гена *TNF-α* с мутантным аллелем A в сочетании с генотипом AA локуса rs1800896 гена *IL-10* (OR=3,04 95%CI [1,07-8,61]). Как показано, эти маркеры увеличивали риск тяжелой поздней ПЭ в 2,91 и 3,04 раза соответственно.

Исследована ассоциация генетических маркеров с недостаточным ростом плода у беременных с поздней ПЭ (недостаточный рост плода диагностирован у 54 (39,7%) пациенток). Так, носительство генотипов GA и AA сайта rs1800629 гена *TNF-α* связано с увеличением риска недостаточного роста плода у беременных с поздней ПЭ в 3,06 раза (OR=3,06 95%CI [1,42-6,59]).

### Заклучение

Таким образом, ассоциированными с увеличением риска ранней и поздней ПЭ являются генотипы GA и AA полиморфизма rs1800896 гена *IL-10*, тогда как носительство аллеля дикого типа G и гомозиготного генотипа GG этого локуса гена *IL-10* является протективной относительно этих осложнений беременности. Полиморфизм rs1800629 гена *TNF-α* не влияет на восприимчивость к обеим формам ПЭ.

Выявленные генетические маркеры из перечня протестированных молекулярных вариантов генов *IL-10* и *TNF-α* ассоциируются с риском тяжелого течения ПЭ и вероятностью развития недостаточного роста плода в манере, зависящей от срока манифестации изучаемого гипертензивного расстройства у беременных.

## Список литературы

1. WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. – Geneva: World Health Organization, 2014. - 48 p.
2. An analysis of the differences between early and late preeclampsia with severe hypertension / X.L. Li [et al.] // *Pregnancy Hypertens.* – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 47-52.
3. Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease - what does the placenta reveal? / J.L. van der Merwe [et al.] // *Hypertens Pregnancy.* – 2010. – Vol. 29, № 4. – P. 457-467.
4. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1- $\beta$  polymorphisms in pre-eclampsia / A.Z. Tavakkol [et al.] // *Iran J. Immunol.* – 2016. - Vol. 13, № 4. – P. 309-316.
5. Polymorphisms in inflammatory genes are associated with term small for gestational age and preeclampsia / Q.E. Harmon [et al.] // *Am J. Reprod Immunol.* – 2014. - Vol. 71, № 5. – P. 472-484.
6. Severe preeclampsia: association of genes polymorphisms and maternal cytokines production in Brazilian population / M.B. Pinheiro [et al.] // *Cytokine.* – 2015. - Vol. 71, № 2. – P. 232-237.
7. Evaluation of association of maternal IL-10 polymorphisms with risk of preeclampsia by A meta-analysis / W. Yang [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2014. - Vol. 18, № 12. – P. 2466-2477.
8. Protective role of the G allele of the polymorphism in the Interleukin 10 gene (-1082G/A) against the development of preeclampsia / C.W. Pissetti [et al.] // *Rev Bras Gynecol. Obstet.* – 2014. - Vol. 36, № 10. – P. 456-460
9. Lee Y.H. Meta-analysis of associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to pre-eclampsia / Y.H. Lee, J.H. Kim, G.G. Song // *Eur. J. Obstet Gynecol. Reprod. Biol.* – 2014. - Vol. 182. – P. 202-207.
10. Investigations into the association between polymorphisms in the interleukin-10 gene and risk of early-onset preeclampsia / Q.Y. Liu [et al.] // *Genet. Mol. Res.* - 2015. - Vol. 14, № 4. – P. 19323-19328.