

© Е. В. Машкина,
К. А. Коваленко,
Н. В. Фомина, Т. П. Шкурат

Южный федеральный университет,
Ростов-на-Дону

✿ В работе проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов (–31С-*TIL-1β*, –174G-*СIL-6*, –592С-*A*, –819С-*TIL-10*, –308G-*A TNFα*) с невынашиванием беременности. Материалом для исследования служили образцы ДНК 62 женщин с неразвивающейся беременностью (НБ), 60 женщин со спонтанным аборт (СА) и 114 женщин контрольной группы. Выявлено увеличение доли гетерозигот –31СТ гена *IL-1β* среди женщин с НБ (58,1 %) по сравнению с группой женщин со СА (36,7 %). По полиморфизму гена *IL-6* различий между группами не выявлено. В группе женщин СА доля гетерозигот –592СА по гену *IL-10* (56,7 %) повышена по сравнению с контролем (32,5 %). Распределение частот генотипов по данному полиморфизму у женщин с НБ соответствует контролю. Частота аллели –819Т гена *IL-10* среди женщин со СА выше по сравнению с группой контроля (0,33 и 0,23 соответственно). В то же время частота аллели –308А гена *TNFα* среди женщин СА наименьшая (0,09; 0,197 в контроле и 0,226 при НБ). Таким образом, установлено, что риск спонтанного аборта увеличивается при наличии в генотипе женщины следующих аллелей: –592А и –819Т гена *IL-10*, а также –308G гена *TNFα*.

✿ **Ключевые слова:** цитокины; полиморфизм; беременность; спонтанный аборт; неразвивающаяся беременность.

Поступила в редакцию 01.10.2013
Принята к публикации 21.01.2014

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С РАННИМИ ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ ПОТЕРЯМИ

ВВЕДЕНИЕ

Проблема нарушений репродуктивной функции человека остается одной из наиболее актуальных в современной биологии и медицине. Невынашивание беременности как многофакторное состояние является результатом аддитивного действия многих факторов, как средовых, так и генетических. Суммарные репродуктивные потери у человека составляют до 50 % по отношению к числу зачатий (Алипов, Головачев, 1983). Случаи спонтанного прерывания беременности в первом триместре составляют 15–20 % от общего числа зарегистрированных беременностей (Доброхотова и др., 2010). К иммунным факторам, ассоциированным с потерей беременности, относят аллоиммунные реакции, направленные против клеток и тканей плода. Иммунологические нарушения могут быть обусловлены особенностями генотипа, в том числе и по генам цитокинов, которые являются эндогенными медиаторами межклеточных взаимодействий. Цитокины выступают посредниками межклеточных и межсистемных взаимодействий, вызывая каскадные реакции, индуцирующие активность многих генов; регулируют выживаемость клеток, стимулируют или подавляют их рост, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз. За счет действия цитокинов обеспечивается согласованное функционирование систем и органов организма. Цитокины участвуют в формировании и регуляции защитных реакций организма при внедрении патогенов и нарушении целостности тканей. При развитии системного воспаления цитокины проявляют огромный спектр биологической активности и оказывают влияние на работу всех систем организма (Кетлинский, Симбирцев, 2008).

Риск потери плода может быть обусловлен изменением функциональной активности цитокинов, играющих важную роль в процессе развития беременности и опосредующих иммунный ответ материнского организма на развивающийся плод (Симбирцев, 2004; Vombell, McGuire, 2008; Kaur, 2011; Agrawal et al., 2012). Согласно современным представлениям, этапы созревания яйцеклетки, адгезии и имплантации бластоцисты, формирования и роста плаценты являются цитокин-зависимыми процессами и контролируются иммунной системой. При нормально протекающей беременности иммунотолерантность материнского организма к зародышу как аллотрансплантанту обеспечивается сложным взаимодействием регуляторных молекул, синтезируемых клетками матери и плода. При инвазии трофобласта происходит активация клеток иммунной системы, что приводит к синтезу целого спектра цитокинов. На мышах *Mus musculus* линии BALB/c *INFγ*^{-/-} показано, что продукция *Th1* клетками типичных провоспалительных цитокинов необходима для нормального протекания ранних этапов эмбриогенеза и имплантации (Ashkar, Croy, 2001). *IL-1β*, являясь типичным провоспалительным цитокином, активирует экспрессию субъединицы интегрин $\beta 3$, обеспечивающей процессы адгезии; способствует развитию плода, стимулирует пролиферацию клеток, образующих плацентарный барьер. Кроме того, *IL-1β* активирует экспрессию цитокинов семейства *IL-6* в эндометрии, что также способствует имплантации (Чистякова и др., 2005; Dimitriadis et al., 2005; Левкович, 2008; Fitzgerald et al., 2008). *IL-6* является типичным ранним индуцибельным цитокином. Цитокины семейства *IL-6* регулируют экспрессию генов конт-

роля клеточного цикла и компонентов внеклеточного матрикса, увеличивают адгезию эпителиальных клеток эндометрия к коллагену на поверхности бластоцисты; увеличивают экспрессию эпителиальными клетками эндометрия интегринов (Magwood et al., 2009).

Одним из ключевых регуляторов иммунного ответа является семейство цитокина *IL-10*, который ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов лимфоцитами и активированными макрофагами. Уровень данного цитокина постепенно возрастает в первом триместре беременности, индуцируя снижение уровня провоспалительных цитокинов и активируя процессы ангиогенеза (Thaxton, Sharma, 2010).

Помимо адгезии и имплантации цитокины обеспечивают образование и рост новых кровеносных сосудов. Усиленный выброс цитокинов оказывает активирующее воздействие на эндотелий сосудов, который, в свою очередь, продуцирует ряд факторов роста, необходимых для ангиогенеза (Амчиславский и др., 2003). Активированные эндотелиоциты сами становятся продуцентами провоспалительных цитокинов, что может приводить к нарушению таких эндотелий-зависимых механизмов, как регуляция сосудистого тонуса и сосудистой проницаемости, поддержание баланса между тромбогенным потенциалом сосудистой стенки и ее тромборезистентностью. В результате может нарушаться микроциркуляция, что оказывает негативное влияние на развивающийся эмбрион. Высокое содержание провоспалительных цитокинов приводит к активации процессов тромбообразования в структуре фетоплацентарных тканей; прекращается кровоток в сосудах, питающих развивающийся эмбрион. Это является одной из причин спонтанного аборта. При спонтанном аборте (СА) иммунные события протекают с многократным увеличением уровня маркеров воспаления. Неразвивающаяся беременность (НБ) как несостоявшийся аборт характеризуется угнетением клеточного иммунитета, иммунологической ареактивностью матки, что препятствует отторжению плодного яйца (Доброхотова и др., 2010).

Дисрегуляция в функционировании цитокинов, в том числе обусловленная генотипом, может быть негативным фактором для протекания ранних этапов эмбриогенеза человека (Daher et al., 2012). Целью данной работы было исследовать частоту регистрации аллельных вариантов генов цитокинов среди женщин с неразвивающейся беременностью и спонтанным абортом в первом триместре беременности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови 122 женщин с невынашиванием беременности в первом триместре (средний возраст 29,2 лет). Среди них — 62 женщины с неразвивающейся

ся беременностью и 60 женщин со спонтанным абортом. В контрольную группу вошли 114 женщин (средний возраст 30,3 года) с физиологически протекающей беременностью, у которых в анамнезе отсутствовали спонтанный аборт и/или неразвивающаяся беременность. Все женщины подписали информированное согласие об участии в исследовании.

Забор образцов крови, сбор анамнестических данных и формирование исследуемых групп женщин был проведен сотрудниками кафедры акушерства и гинекологии Ростовского государственного медицинского университета, а также врачами акушерами гинекологами городской больницы № 8 и родильного дома № 5 г. Ростова-на-Дону. Диагноз «неразвивающаяся беременность» был определен на основании динамики уровня хорионического гормона человека в периферической крови женщины и прекращения сердцебиения плода, выявленного при УЗИ.

Критериями исключения из исследования были ранее диагностированные артериальная гипертензия, диабет, заболевания щитовидной железы и аутоиммунная патология, а также инфекционные заболевания во время беременности. Кроме того, были исключены женщины с аномалиями матки и синдромом поликистозных яичников (диагностированные трансвагинальной ультразвукографией). В сравниваемых группах отсутствовали женщины с экзогенными факторами риска — злоупотребление алкоголем, контакт с вредными факторами производства (электромагнитное излучение, шум, вибрация, химическое производство).

Для сравнительного анализа трех групп женщин определяли доверительный интервал доли (Гланц, 1999). Установлено, что в группе НБ наибольшая доля женщин, не имеющих родов в анамнезе (табл. 1). В то же время число женщин, беременность у которых закончилась рождением живого ребенка, в данной группе меньше по сравнению с двумя другими.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов *DIAtom™ DNA Prep 100* (ООО Центр молекулярной генетики). Аллельные варианты $-31\ C-T$ гена *IL-1β* (MIM *147720), $-174G-C$ гена *IL-6* (MIM *147620), $-592\ C-A$, $-819C-T$ гена *IL-10* (MIM *124092), $-308G-A$ гена *TNFα* (MIM *191160) исследовали с использованием наборов реагентов *SNP-экспресс* (Литех, Москва). Анализ основан на проведении реакций амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3%-м агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе *GelDoc* (BioRad).

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга определяли с использованием *Hardy-Weinberg equilibrium calculator* в программе www.oege.org/software/Hardy-Weinberg (Rodriguez et al., 2009). Оценку различий в распределении аллельных

Таблица 1

Характеристика групп женщин

Признак	Контроль		НБ		СА	
	Абс.	% (95 % CI)	Абс.	% (95 % CI)	Абс.	% (95 % CI)
Доля пациентов с первой беременностью, %	9	8,8 (2,9–12,8)	20	32,2 (20,6–43,9)	4	6,6 (0,35–12,9)
Доля женщин, не имеющих родов в анамнезе, %	20	17,5 (10,6–24,5)	34	54,8 (40,4–67,2)	4	6,6 (0,35–12,9)
Доля женщин, имеющих в анамнезе беременность, закончившуюся рождением живого ребенка, %	93	81,5 (74,5–88,7)	28	45,2 (32,8–57,5)	53	88,3 (80,2–96,5)
Доля женщин, имеющих в анамнезе случаи невынашивания беременности I триместра, %	0	0	6	9,7 (2,3–17,0)	4	6,6 (0,35–12,9)

НБ — неразвивающаяся беременность; СА — спонтанный аборт

вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 при помощи программы BIOSTAT (Biostatistica..., 1998). О риске развития невынашивания беременности судили по отношению шансов (odds ratio — OR), которое вычисляли в соответствии с $OR = (A/B) \times (D/C)$, где А и С — число имеющих «мутантный» генотип женщин с невынашиванием беременности и нормальной беременностью соответственно, В и D — число не имеющих «мутантный» генотип женщин двух групп. OR указан с 95% -м доверительным интервалом (CI) (Petrie et al., 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате исследования установлено, что в контрольной группе гомозиготами по аллели –31С гена *IL-1β* являлись 36,8% женщин, гетерозиготы –31 С-Т составили 49,1% (табл. 2). Распреде-

ление частот генотипов по исследуемому полиморфизму среди женщин с неразвивающейся беременностью не отличалось от контрольной группы. Среди женщин со спонтанным абортом преобладали (53,3%) гомозиготы по аллели –31 С гена *IL-1β*. Однако данные отличия по сравнению с контрольной группой статистически не значимы.

В то же время выявлены статистически значимые отличия в частотах генотипов по полиморфизму –31 С-Т гена *IL-1β* между двумя группами женщин с патологией беременности в I триместре. Частота аллели –31 Т гена *IL-1β* в группе НБ оказалась выше по сравнению с таковой в группе женщин со спонтанным абортом (0,419 и 0,283 соответственно) (табл. 2).

Характер распределения частот генотипов по полиморфизму –174G-C гена *IL-6* среди женщин со спонтанным абортом или неразвивающейся беременностью соответствовал контрольному (табл. 2). Не выявлено

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей генов *IL-1β* и *IL-6* в клетках крови женщин

Генотип	Контроль, абс., (%)	Патология беременности					
		СА, абс., %	OR (95 % CI)	χ^2_1 (P)	НБ, абс., %	OR (95 % CI)	χ^2_1 (P)
<i>IL-1β</i> –31С-Т							
СС	42 (36,8)	32 (53,3)	1,96 (1,04–3,69)	4,38 (0,11)	18 (29,0)	0,7 (0,36–1,37)	1,37 (0,5)
СТ	56 (49,1)	22 (36,7)	0,6 (0,32–1,14)		36 (58,1)	1,43 (0,77–2,68)	
ТТ	16 (14,0)	6 (10,0)	0,68 (0,25–1,84)		8 (12,9)	0,91 (0,36–2,26)	
Аллель –31 Т	0,386	0,283	0,63 (0,39–1,01)	3,64 (0,06)	0,419	1,15 (0,74–1,79)	0,37 (0,54)
χ^2_2 (P)	Генотипы: 7,55 (0,02)				Аллели: 4,94 (0,03)		
<i>IL-6</i> –174 G-C							
GG	21 (18,4)	11 (18,3)	0,99 (0,44–2,23)	1,84 (0,4)	15 (24,2)	1,41 (0,67–2,99)	4,79 (0,09)
GC	69 (60,5)	31 (51,7)	0,7 (0,37–1,31)		27 (43,5)	0,5 (0,27–0,94)	
CC	24 (21,1)	18 (30,0)	1,61 (0,79–3,28)		20 (32,3)	1,79 (0,89–3,59)	
Аллель –174 С	0,513	0,558	1,2 (0,77–1,87)	0,64 (0,42)	0,54	1,12 (0,72–1,73)	0,24 (0,63)
χ^2_2 (P)	Генотипы: 0,96 (0,62)				Аллели: 0,08 (0,78)		

СА — спонтанный аборт; НБ — неразвивающаяся беременность; χ^2_1 — сравнение частот генотипов и аллелей с контролем; χ^2_2 — сравнение между группами СА и НБ

Таблица 3

Частота генотипов и аллелей генов *IL-10* и *TNF α* в клетках крови женщин

Генотип	Контроль, абс., (%)	Патология беременности					
		СА, абс, %	OR (95 % CI)	χ^2_1 (P)	НБ, абс, %	OR (95 % CI)	χ^2_1 (P)
<i>IL-10 –592 C-A</i>							
<i>CC</i>	65 (57,0)	24 (40,0)	0,5 (0,27–0,95)	10,4 (0,006)	37 (59,7)	1,12 (0,6–2,09)	0,12 (0,94)
<i>CA</i>	37 (32,5)	34 (56,7)	2,72 (1,43–5,18)		19 (30,6)	0,92 (0,47–1,79)	
<i>AA</i>	12 (10,5)	2 (3,3)	0,29 (0,06–1,36)		6 (9,7)	0,91 (0,32–2,56)	
Аллель –592 <i>A</i>	0,268	0,317	1,27 (0,78–2,06)	0,93 (0,33)	0,25	0,91 (0,55–1,51)	0,13 (0,72)
χ^2_2 (P)	Генотипы: 8,99 (0,01)			Аллели: 1,34 (0,25)			
<i>IL-10 –819 C-T</i>							
<i>CC</i>	69 (60,5)	26 (43,3)	0,5 (0,26–0,94)	4,69 (0,1)	40 (64,5)	1,19 (0,62–2,25)	1,89 (0,39)
<i>CT</i>	37 (32,5)	28 (46,7)	1,82 (0,96–3,46)		15 (24,2)	0,66 (0,33–1,34)	
<i>TT</i>	8 (7,0)	6 (10,0)	1,47 (0,49–4,46)		7 (11,3)	1,69 (0,58–4,89)	
Аллель –819 <i>T</i>	0,232	0,333	1,65 (1,01–2,69)	4,09 (0,04)	0,234	1,01 (0,6–1,69)	0 (0,98)
χ^2_2 (P)	Генотипы: 6,95 (0,03)			Аллели: 2,97 (0,08)			
<i>TNFα –308G-A</i>							
<i>GG</i>	72 (63,2)	49 (81,7)	2,6 (1,22–5,54)	6,96 (0,03)	36 (58,1)	0,81 (0,43–1,52)	0,45 (0,8)
<i>GA</i>	39 (34,2)	11 (18,3)	0,43 (0,2–0,92)		24 (38,7)	1,21 (0,64–2,31)	
<i>AA</i>	3 (2,6)	0	0,26 (0,01–5,18)		2 (3,2)	1,23 (0,2–7,59)	
Аллель –308 <i>A</i>	0,197	0,092	0,41 (0,2–0,83)	6,51 (0,01)	0,226	1,19 (0,7–2,02)	0,4 (0,53)
χ^2_2 (P)	Генотипы: 8,79 (0,01)			Аллели: 8,17 (0,004)			

СА — спонтанный аборт; НБ — неразвивающаяся беременность; χ^2_1 — сравнение частот генотипов и аллелей с контролем; χ^2_2 — сравнение между группами СА и НБ

статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей и между двумя группами женщин с патологией ранних сроков беременности.

В результате исследования установлено, что в контрольной группе гомозиготами по аллели –592 *C* гена *IL-10* являлись 57 % женщин (табл. 3). В группе женщин со спонтанным абортом число гомозигот –592 *CC* гена *IL-10* составило 40 %, а доля гетерозигот по полиморфизму –592 *C-T* повышена по сравнению с контролем (56,7 %) (табл. 3). Данные различия статистически значимы. Для гетерозигот –592 *C-T* гена *IL-10* выявлено повышение риска возможного развития спонтанного аборта ($OR = 2,72$). Статистически значимые отличия обнаружены и между двумя группами женщин с нарушением ранних сроков эмбрионального развития плода. Среди женщин со СА увеличена частота гетерозигот по данному полиморфизму по сравнению с группой женщин с неразвивающейся беременностью (табл. 3).

Подобная ситуация характерна и для полиморфизма –819 *C-T* гена *IL-10* (табл. 3). В контрольной группе и среди женщин с неразвивающейся беременностью преобладали гомозиготы по аллели –819 *C* гена *IL-10*. Число гетерозигот –819 *C-T* гена *IL-10* в двух данных группах женщин не превышало 32 %. В то же время среди женщин со спонтанным абортом число гомозигот –819 *CC* и гетерозигот –819 *CT* по гену *IL-10* было практически одинаково и составило 43–46 %. Распределение частот генотипов при этом статистически зна-

чимо не отличалось от такового в контрольной группе. Однако частота аллели –819 *T* гена *IL-10* среди женщин со спонтанным абортом в первом триместре составила 0,333, что статистически значимо выше по сравнению с таковым показателем в группе контроля.

Между двумя группами женщин с патологией беременности первого триместра выявлены значимые различия: при одинаковом числе гомозигот –819 *TT* гена *IL-10* среди женщин с неразвивающейся беременностью частота гетерозигот –819 *CT* составила 24,2 %, тогда как в группе женщин со СА — 46,7 % (табл. 3).

В контрольной группе и группе женщин с неразвивающейся беременностью гомозигот по аллели –308*G* гена *TNF α* несколько меньше (63,2 % и 58,1 % соответственно), чем в группе женщин с СА — 81,7 % (табл. 3). Гетерозиготы –308*G-A* гена *TNF α* реже всего встречались среди женщин со спонтанным абортом. Интересно отметить, что число гомозигот по полиморфизму –308 *A* в двух группах (контрольной и в группе женщин с НБ) было примерно одинаково, а в группе женщин с СА они отсутствовали (табл. 3). Распределение частот генотипов по исследуемому полиморфизму среди женщин с НБ не отличалось от контрольной группы. Однако в группе СА выявлено увеличение числа гомозигот по аллели –308*G* при одновременном снижении доли гетерозигот –308*GA* по сравнению с контрольной группой. Также выявлены статистически значимые отличия между двумя группами женщин с патологией беременности в I триместре (НБ и СА). В группе женщин

с самопроизвольным абортом частота аллели — 308A составила 0,092, что является наименьшим значением для трех групп.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Причины ранних эмбриональных потерь многочисленны и разнообразны. Аномалии кариотипа плода являются в большинстве случаев остановки развития как при естественно наступивших беременностях, так и в случае вспомогательных репродуктивных технологий (Simon et al., 1998; Liunger et al., 2005; Кириллова и др., 2006; Баранов, Кузнецова, 2007; Morales et al., 2008; Чиряева и др., 2012). Существенный вклад в патогенез ранних эмбриональных потерь вносят иммунные и аутоиммунные факторы. Если в общепопуляционных выборках антитела к фосфолипидам выявляются у 2% женщин, то среди женщин с привычным невынашиванием беременности данный показатель значительно выше (Rai et al., 1995; Керчелаева, 2003). Антифосфолипидный синдром сопровождается тромбофилическими осложнениями, которые наблюдаются и при наследственных формах тромбофилии (Younis et al., 2000; Макацария, Бицадзе, 2001). Среди эндокринных причин невынашивания беременности рассматривают изменение уровня секреции гонадотропинов, нарушение функционирования их рецепторов, гиперпролактинемия, гиперандрогения, заболевания щитовидной железы (Li et al., 2000; Bellver et al., 2008; Prakash et al., 2006; 2008). Обсуждается роль инфекционных агентов в невынашивании беременности (Summers, 1994; Ralph et al., 1999; Подзолкова и др., 2003). Исследуемые нами группы включали женщин без аутоиммунных, эндокринных и инфекционных заболеваний. Однако анализ кариотипа погибших эмбрионов проведен не был.

Практически все из перечисленных этиологических факторов невынашивания беременности оказывают влияние на морфологические и функциональные свойства формирующейся плаценты, уровень пролиферации и апоптоза клеток (Qumsiyeh et al., 2000). Обязательным компонентом процессов имплантации и формирования плаценты являются межклеточные взаимодействия с участием нескольких семейств цитокинов. Особенности генотипа по генам цитокинов могут обуславливать повышенную продукцию провоспалительных цитокинов или нарушение баланса между уровнем про- и противовоспалительных цитокинов, что может стать одной из причин нарушения ранних этапов эмбрионального развития человека. Исследуемые нами аллельные варианты генов *IL-1β* и *TNFA* характеризуются повышенным уровнем экспрессии, в то время как аллельные варианты генов *IL-6* и *IL-10* обуславливают снижение уровня соответствующих мРНК (Huizinga et al., 1997; Grimaldi et al., 2000; Vennermo et al., 2004). Данные литературы о возможной связи между наличием исследуемых аллель-

ных вариантов генов цитокинов и риском нарушения ранних этапов эмбриогенеза человека противоречивы (Heffler et al., 2001; Wang et al., 2002; Prigoshin et al., 2004; Costeas et al., 2004; Kamali-Sarvestani et al., 2005; Bombell, McGuire, 2008; Zammiti et al., 2009; Liu et al., 2010; Kaur, 2011; Agrawal et al., 2012; Ma et al., 2012).

В нашем исследовании показано, что группы женщин с неразвивающейся беременностью и спонтанным абортом отличаются друг от друга особенностями генотипа по генам цитокинов. Так, среди женщин с неразвивающейся беременностью статистически значимо выше частота аллели — 31 T гена *IL-1β* по сравнению с группой женщин со спонтанным абортом. В то же время установлено, что гетерозиготы — 592 CA гена *IL-10* имеют повышенный риск спонтанного прерывания беременности. Известно, что *IL-10* принимает активное участие в обеспечении иммунотолерантности материнского организма к развивающемуся зародышу. Кроме того, *IL-10* обеспечивает снижение уровня экспрессии децидуальными клетками ряда молекул — активаторов коагуляции (Cochery-Nouvellon et al., 2009). Наличие в генотипе аллелей — 31 T гена *IL-1β* или — 592 A гена *IL-10* предполагает повышение уровня провоспалительных цитокинов в тканях-мишенях. Провоспалительные цитокины синтезируются на ранних сроках беременности в незначительном количестве, обеспечивая динамическое равновесие между процессами инвазии и отторжения трофобласта. Однако продукция провоспалительных цитокинов выше оптимального уровня может приводить к тромбозам и ишемическим некрозам в структуре фетоплацентарных тканей. Провоспалительные цитокины способны оказывать прямой эмбриотоксический эффект, ограничивать инвазию трофобласта, нарушая его нормальное формирование, что приводит к задержке или остановке внутриутробного развития. Например, сверхпродукция *IL-1β* может индуцировать сверхострый воспалительный ответ и при присоединении внутриматочной инфекции, в конечном итоге привести к отторжению эмбриона (Громова, Симбирцев, 2005).

Имплантация эмбриона в течение физиологической беременности ассоциирована со сдвигом цитокинового баланса в сторону преобладания факторов с иммуносупрессорной активностью. В течение беременности в зоне матки угнетается продукция цитокинов *Th1* при одновременном усилении синтеза *Th2* цитокинов. Нарушение баланса *Th1/Th2* является одной из причин развития патологии беременности.

С другой стороны показано, что при остановке развития эмбриона концентрация и соотношение про- и противовоспалительных цитокинов (в частности, *TNFA* и *IL-10*) в периферической крови женщин и в ворсинах хориона зависит от кариотипа абортуса (Calleja-Agius et al., 2012). Авторы высказывают мнение о существовании различных механизмов элиминации эмбрионов с нормальным и аномальным кариотипом. Потеря бере-

менности при нормальном кариотипе эмбриона, по мнению авторов, связана с системными воспалительными процессами в организме матери. В то время как при аномальном кариотипе абортуса имеют значение местные (в зоне плаценты) реакции. Роль цитокинов в этом несомненна.

Выявленные нами отличия в частотах генотипов и аллелей по генам цитокинов между группами женщин СА и НБ предполагают изменение различных звеньев цитокиновой системы. Первичным звеном в нарушении баланса цитокинов может выступать обусловленное генотипом повышение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов (в частности *IL-1 β*). Последующие нарушения функционирования плаценты могут приводить к остановке развития эмбриона и, как следствие, неразвивающейся беременности. Если же в качестве первичного нарушения цитокинового баланса выступает снижение концентрации противовоспалительных цитокинов (в частности *IL-10*), то возможно отторжение эмбриона как генетически чужеродного для материнского организма.

ЛИТЕРАТУРА

- Алипов В. И., Головачев Г. Д. (1983) **Репродуктивные потери и хромосомные аномалии.** *Акуш. и гинекол.* № 1: С. 38–41.
- Амчиславский Е. И., Соколов Д. И., Старикова Э. А. и др. (2003) **Цитокиновый контроль процесса ангиогенеза.** *Медицинская иммунология.* № 5: С. 493–506.
- Баранов В. С., Кузнецова Т. В. (2007) **Цитогенетика эмбрионального развития человека.** СПб.: Н-Л. 640 с.
- Гланц С. (1999) **Медико-биологическая статистика.** М.: Практика. 459 с.
- Громова А., Симбирцев А. (2005) **Полиморфизм генов семейства *IL-1* человека.** *Цитокины и воспаление.* Т. 4 (2): С. 3–12.
- Доброхотова Ю. Э., Джобава Э. М., Озерова Р. И. (2010) **Неразвивающаяся беременность.** М.: Гэотар-Медиа. 144 с.
- Керчелаева С. Б. (2003) **Значение антител к фосфолипидам и фосфолипидсвязывающим белкам при неразвивающейся беременности.** *Российский вестник акушера-гинеколога.* Т. 4: С. 11–16.
- Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. (2008) **Цитокины.** Санкт-Петербург. Фолиант. 552 с.
- Кириллова Е. А., Ворсанова С. Г., Дышева Н. М. и др. (2006) **Цитогенетические особенности хориона при неразвивающейся беременности.** *Акушерство и гинекология.* № 2: С. 22–24.
- Левкович М. А. (2008) **Современные представления о роли цитокинов в генезе физиологического и патологического течения беременности.** *Российский вестник акушера-гинеколога.* № 3: С. 37–40.
- Макацария А. Д., Бицадзе В. О. (2001) **Тромбофилические состояния в акушерской практике.** М.: Russo. 704 с.
- Подзолкова Н. М., Истратов В. Г., Золотухина Т. В. и др. (2003) **Клинические и патогенетические аспекты неразвивающейся беременности.** *Российский вестник акушера-гинеколога.* № 2: С. 40–44.
- Симбирцев А. С. (2004) **Цитокины: классификация и биологические функции.** *Цитокины и воспаление.* Т. 3: С. 16–23.
- Чиряева О. Г., Пендина А. А., Тихонов А. В. и др. (2012) **Сравнительный анализ аномалий кариотипа при неразвивающейся беременности, наступившей естественным путем и с применением вспомогательных репродуктивных технологий.** *Журнал акушерства и женских болезней.* Т. LXI (3): С. 132–140.
- Чистякова Г. Н., Газиева И. А., Ремизова И. И., Черданцева Г. А. (2005) **Оценка продукции цитокинов при беременности, осложненной угрозой прерывания в первом триместре.** *Фундаментальные исследования.* № 5: С. 96–98.
- Agrawal S., Parveen F., Faridi R., Prakash S. (2012) ***IL-1* gene cluster variants and recurrent pregnancy loss among North Indian women: retrospective study and meta analysis.** *Reprod Biomed Online.* V. 3: P. 342–351.
- Ashkar A., Croy B. (2001) **Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy.** *Semin Immunol.* V. 13: P. 235–241.
- Bellver J., Soares S. R., Alvarez C. et al. (2008) **The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion.** *Hum Reprod.* V. 23: P. 278–284.
- Bennermo M., Held C., Stemme S. (2004) **Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases.** *Clin Chem.* V. 50: P. 2136–2140.
- Biostatistica, primer of biostatistics version 4.03 by Stanton A. Glanz.** McGraw Hill. 1998.
- Bombell S., McGuire W. (2008) **Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis.** *Aust NZJ Obstet Gynaecol.* V. 48: P. 147–154.
- Calleja-Agius J., Jauniaux E., Muttukrishna S. (2012) **Inflammatory cytokines in maternal circulation and placenta of chromosomally abnormal first trimester miscarriages.** *Clin Dev Immunol.* doi: 10.1155/2012/175041
- Cochery-Nouvellon E., Nguyen P, Attaoua R. et al. (2009) **Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with pregnancy loss: preferential**

- association with embryonic wastage. *Biol. Reprod.* V. 80: P. 1115–1120.
24. Costeas P., Koumouli A., Giantsiou-Kyriakou A. et al. (2004) **Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss.** *Hum. Immunol.* V. 65: P. 135–141.
25. Daher S., Mattar R., Gueuvoghlian-Silva B.Y., Torloni M.R. (2012) **Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge.** *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 67: P. 341–347.
26. Dimitriadis E., White C., Jones R. (2005) **Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation.** *Human Reproduction Update.* V. 24: P. 612–628.
27. Fitzgerald J., Poehlmann T., Schleussner E., Markert U. (2008) **Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).** *Hum. Reprod Update.* V. 14: P. 335–344.
28. Grimaldi L., Casadei V., Ferri C. (2000) **Association of early-onset Alzheimers disease with an interleukin-1 alpha gene polymorphism.** *Ann. Neurol.* V. 47: P. 361–365.
29. Hefler L., Tempfer C., Unfried G. et al. (2001) **A polymorphism of the interleukin-1beta gene and idiopathic recurrent miscarriage.** *Fertil Steril.* V. 76: P. 377–379.
30. Huizinga T., Westendorp R., Bollen E. et al. (1997) **THF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients.** *J. Neuroimmunol.* V. 72: P. 149–153.
31. Kamali-Sarvestani E., Zolghadri J., Gharesi-Fard B. et al. (2005) **Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women.** *J. Reprod. Immunol.* V. 65: P. 171–178.
32. Kaur A. (2011) **Recurrent pregnancy loss: *TNF-alpha* and *IL-10* polymorphisms.** *J. Hum. Reprod. Sci.* V. 4: P. 91–94.
33. Li T.C., Spuijbroek M.D., Tuckerman E. et al. (2000) **Endocrinological and endometrial factors in recurrent miscarriage.** *BJOG.* V. 107: P. 1471–1479.
34. Liu C., Wang J., Zhou S. et al. (2010) **Association between –238 but not –308 polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) ν and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population.** *Reprod. Biol. Endocrinol.* V. 8: P. 114.
35. Ljunger E., Cnattingius S., Lundin C., Annerén G. (2005) **Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages.** *Acta Obstet. Gynecol Scand.* V. 84: P. 1103–1107.
36. Ma X., Xu L. J., Wang J. et al. (2012) **Association of IL-1 β and IL-6 gene polymorphisms with recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population.** *Int. J. Immunogenet.* V. 39: P. 15–19.
37. Marwood M., Visser K., Salamonsen L., Dimitriadis E. (2009) **Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation.** *Endocrinol.* V. 150: P. 2915–2923.
38. Morales C., Sanchez A., Bruguera J. et al. (2008) **Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities.** *Am. J. Med. Genet.* V. 146A: P. 66–70.
39. Petrie A., Bulman J.S., Osborn J.F. (2003) **Further statistics in dentistry. Part 8: systematic reviews and meta-analyses.** *British Dental Journal.* V. 194: P. 73–78.
40. Prakash A., Li T.C., Tuckerman E. et al. (2006) **A study of luteal phase expression of inhibin, activin, and follistatin subunits in the endometrium of women with recurrent miscarriage.** *Fertil Steril.* V. 86: P. 1723–1730.
41. Prakash A., Tuckerman E., Laird S. et al. (2008) **A preliminary study comparing the endometrial expression of inhibin, activin and follistatin in women with a history of implantation failure after IVF treatment and a control group.** *BJOG.* V. 115: P. 532–537.
42. Prigoshin N., Tambutti M., Larriba J. et al. (2004) **Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause.** *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 52: P. 36–41.
43. Qumsiyeh M.B., Kim K.R., Ahmed M.N., Bradford W. (2000) **Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi.** *Cytogenetics and Cell Genetics.* V. 88: P. 230–235.
44. Rai R.S., Regan L., Clifford K. et al. (1995) **Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach.** *Hum. Reprod.* V. 10: P. 2001–2005.
45. Ralph S.G., Rutherford A.J., Wilson J.D. (1999) **Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study.** *BMJ.* V. 319: P. 220–223.
46. Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N.M. (2009) **Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies.** *American Journal of Epidemiology Advance Access.* DOI 10.1093/aje/kwn359.
47. Simón C., Rubio C., Vidal F. et al. (1998) **Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage.** *Reprod Fertil Dev.* V. 10: P. 87–92.
48. Summers P.R. (1994) **Microbiology relevant to recurrent miscarriage.** *Clin. Obstet. Gynecol.* V. 37: P. 722–729.

49. Thaxton J., Sharma S. (2010) **Interleukin-10: a multifaceted agent of pregnancy.** *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 63: P. 482–491.
50. Wang Z., Yunis E., De los Santos M. (2002) **T-helper 1-type immunity to trophoblast antigens in women with a history of recurrent pregnancy loss is associated with polymorphism of the IL-1b promoter region.** *Genes Immunol.* V. 3: P. 38–42.
51. Younis J. S., Brenner B., Ohel G. et al. (2000) **Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first- as well as second-trimester recurrent pregnancy loss.** *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 43: P. 31–35.
52. Zammit W., Mtraoui N., Finan R. et al. (2009) **Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha haplotypes in idiopathic recurrent pregnancy loss.** *Fertil Steril.* V. 91: P. 1903–1908.
4. Glantz S. (1999) **Mediko-biologicheskaya statistika [Primer of biostatistics].** Moscow; p. 459.
5. Gromova A., Simbircev A. (2005) Cytokines and inflammation. V. 4 (2): P. 3–12.
6. Dobrokhotova Y., Dzhobava E., Ozerova R. (2010) **Nerazvivaushayasa beremennost [Missed pregnancy].** Moscow: Geotar-Media; p. 144.
7. Kerchelaeva S. B. (2003) *Rossiysky vestnik akushera-ginekologa.* V. 4: P. 11–16.
8. Ketlinsky C., Simbircev F. (2008) **Citokinu [Cytokines].** St. Petersburg: Foliant; p. 552.
9. Kirillova E. A., Vorsanova S. G., Dysheva N. M. et al. (2006) *Akusherstvo i Ginekologiya.* N 2: P. 22–24.
10. Levkovich M. (2008) *Rossiysky vestnik akushera-ginekologa.* N 3: P. 37–40.
11. Makacaria A. D., Bitzadze V. O. (2001) **Trombofili-cheskie sostoania v akusherskoj praktike [Thrombophilic states in obstetric practice].** Moscow; p. 704.
12. Podzolkova N. M., Istratov V. G., Zolotukhina T. V. et al. (2003) *Rossiysky vestnik akushera-ginekologa.* N 2: P. 40–44.
13. Simbircev A. (2004) **Citokinu i vospalenie [Cytokines and inflammation].** V. 3: P. 16–23.
14. Chiryayeva O. G., Pendina A. A., Tikhonov A. V. et al. (2012) *Zhurnal akusherstva i zenskikh boleznei.* V. LXI (3): P. 132–140.
15. Chustyakova G., Gazieva I., Remizova I., Cherdanceva G. (2005) *Fundamentalnye issledovaniya.* № 5: P. 96–98.
16. Agrawal S., Parveen F., Faridi R., Prakash S. *Reprod (2012) Biomed Online.* V. 3: P. 342–351.
17. Ashkar A., Croy B. (2001) *Semin Immunol.* V. 13: P. 235–241.
18. Bellver J., Soares S. R., Alvarez C. et al. (2008) *Hum Reprod.* V. 23: P. 278–284.
19. Bennermo M., Held C., Stemme S. (2004) *Clin. Chem.* V. 50: P. 2136–2140.
20. Biostatistica, primer of biostatistics version 4.03 by Stanton A. Glanz. McGraw Hill. 1998.
21. Bombell S., McGuire W. (2008) *Aust. NZJ Obstet. Gynaecol.* V. 48: P. 147–154.
22. Calleja-Agius J., Jauniaux E., Muttukrishna S. (2012) *Clin. Dev Immunol.* doi: 10.1155/2012/175041
23. Cochery-Nouvellon E., Nguyen P, Attaoua R. et al. (2009) *Biol Reprod.* V. 80: P. 1115–1120.
24. Costeas P., Koumouli A., Giantsiou-Kyriakou A. et al. (2004) *Hum. Immunol.* V. 65: P. 135–141.
25. Daher S., Mattar R., Gueuvoghlian-Silva B. Y., Torloni M. R. (2012) *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 67: P. 341–347.
26. Dimitriadis E., White C., Jones R. (2005) *Human Reproduction Update.* V. 24: P. 612–628.
27. Fitzgerald J., Poehlmann T., Schleussner E., Markert U. (2008) *Hum. Reprod. Update.* V. 14: P. 335–344.
28. Grimaldi L., Casadei V., Ferri C. (2000) *Ann. Neurol.* V. 47: P. 361–365.

CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS AND EARLY PREGNANCY LOSS

Mashkina Ye. V., Kovalenko K. A., Fomina N. V., Shkurat T. P.

✿ **SUMMARY:** *Background:* A disbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines can negatively affect early stages of human embryogenesis. The association between polymorphism of cytokine genes (–31C-T IL1B, –174G-C IL6, –308G-A TNF α and –592C-A, –819C-T IL10) and a pregnancy loss was studied. *Materials and method:* Study was performed on DNA samples from two groups of women with pregnancy loss: those with a missed abortion (MA) (n = 62) and those with a spontaneous abortion (SA) (n = 62). The control group included 114 women with normal pregnancy. Cytokine genotyping was performed using PCR with sequence-specific primers, with the “SNP-express” kit (Lytech, Russian Federation). *Results:* Increase in the frequency of heterozygotes for –31C-T polymorphism of the IL1 β gene among women with MA (58.1) if compared with those with SA (36.7%) was found. In the SA group the frequency of heterozygotes for –592C-T of the IL10 gene was higher (56.7%) than in the control group (32.5%). The frequency of the –819T allele of IL10 gene among women with SA was higher than in the control group (0.33 vs 0.23). The –308A allele of the TNF α gene featured the lowest frequency in the SA group if compared with those in the MA and the control group). *Conclusion:* Our data show that the risk of spontaneous abortion increases if –592A and –819T IL-10, and –308G TNF α genes’ alleles are present in the genotype.

✿ **KEY WORDS:** cytokines; polymorphism; pregnancy; spontaneous abortion; missed abortion.

✿ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Alipov V. I., Golovachev G. D. (1983) *Akusherstvo i Ginekologiya.* V. 1: P. 38–41.
2. Amtchislavski E., Sokolov D., Starikova E., Freidlin I. (2003) *Med. Immunol.* V. 5–6: P. 493–506.
3. Baranov V. S., Kuznetsova T. V. (2007) **Cytogenetika embrionalnogo razvitiya cheloveka [Cytogenetics of human embryonic development].** SPb.; p. 640.

29. Hefler L., Tempfer C., Unfried G. et al. (2001) *Fertil Steril*. V. 76: P. 377–379.
30. Huizinga T., Westendorp R., Bollen E. et al. (1997) *J. Neuroimmunol*. V. 72: P. 149–153.
31. Kamali-Sarvestani E., Zolghadri J., Gharesi-Fard B. et al. (2005) *J. Reprod Immunol*. V. 65: P. 171–178.
32. Kaur A. (2011) *J. Hum. Reprod Sci*. V. 4: P. 91–94.
33. Li T. C., Spuijbroek M. D., Tuckerman E. et al. (2000) *BJOG*. V. 107: P. 1471–1479.
34. Liu C., Wang J., Zhou S. et al. (2010) *Reprod. Biol. Endocrinol*. V. 8: 114.
35. Ljunger E., Cnattingius S., Lundin C., Annerén G. (2005) *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. V. 84: P. 1103–1107.
36. Ma X., Xu L. J., Wang J. et al. (2012) *Int. J. Immunogenet*. V. 39: P. 15–19.
37. Marwood M., Visser K., Salamonsen L., Dimitriadis E. (2009) *Endocrinol*. V. 150: P. 2915–2923.
38. Morales C., Sanchez A., Bruguera J. et al. (2008) *Am. J. Med. Genet*. V. 146A: P. 66–70.
39. Petrie A., Bulman J. S., Osborn J. F. (2003) *British Dental Journal*. V. 194: P. 73–78.
40. Prakash A., Li T. C., Tuckerman E. et al. (2006) *Fertil Steril*. V. 86: P. 1723–1730.
41. Prakash A., Tuckerman E., Laird S. et al. (2008) *BJOG*. V. 115: P. 532–537.
42. Prigoshin N., Tambutti M., Larriba J. et al. (2004) *Am. J. Reprod Immunol*. V. 52: P. 36–41.
43. Qumsiyeh M. B., Kim K. R., Ahmed M. N., Bradford W. (2000) *Cytogenetics and Cell Genetics*. V. 88: P. 230–235.
44. Rai R. S., Regan L., Clifford K. et al. (1995) *Hum. Reprod*. V. 10: P. 2001–2005.
45. Ralph S. G., Rutherford A. J., Wilson J. D. (1999) *BMJ*. V. 319: P. 220–223.
46. Rodriguez S., Gaunt T. R., Day I. N. M. (2009) *American Journal of Epidemiology Advance Access*. DOI 10.1093/aje/kwn359.
47. Simón C., Rubio C., Vidal F. et al. (1998) *Reprod. Fertil Dev*. V. 10: P. 87–92.
48. Summers P. R. (1994) *Clin. Obstet. Gynecol*. V. 37: P. 722–729.
49. Thaxton J., Sharma S. (2010) *Am. J. Reprod. Immunol*. V. 63: P. 482–491.
50. Wang Z., Yunis E., De los Santos M. (2002) *Genes Immunol*. V. 3: P. 38–42.
51. Younis J. S., Brenner B., Ohel G. et al. (2000) *Am. J. Reprod. Immunol*. V. 43: P. 31–35.
52. Zammiti W., Mtiraoui N., Finan R. et al. (2009) *Fertil Steril*. V. 91: P. 1903–1908.

✪ Информация об авторах

Машкина Елена Владимировна — к. б. н., доцент. Лаборатория генетики человека и животных, кафедра генетики. Южный федеральный университет. 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194/1. E-mail: lenmash@mail.ru.

Коваленко Константин Алексеевич — научный сотрудник. Лаборатория генетики человека и животных. Южный федеральный университет. 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194/1. E-mail: konst_ak@mail.ru.

Фомина Надежда Владимировна — студент. Кафедра генетики. Южный федеральный университет. 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194/1. E-mail: fomina2806@mail.ru.

Шкурят Татьяна Павловна — д. б. н., зав. кафедрой, директор НИИ биологии, профессор. Кафедра генетики, НИИ биологии. Южный федеральный университет. 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194/1. E-mail: tshkurat@yandex.ru.

Mashkina Yelena Vladimirovna — candidate of biology science, associate professor. Southern federal university. 344090, Rostov-na-Donu, prospect Stachki, 194/1, Russia. E-mail: lenmash@mail.ru.

Kovalenko Konstantin Alekseyevich — scientist reasercher. Southern federal university. 344090, Rostov-na-Donu, prospect Stachki, 194/1, Russia. E-mail: konst_ak@mail.ru.

Fomina Nadezhda Vladimirovna — student. Southern federal university. 344090, Rostov-na-Donu, prospect Stachki, 194/1, Russia. E-mail: fomina2806@mail.ru.

Shkurat Tatyana Pavlovna — doctor of biology science, associate professor, director of Biology Institute. Southern federal university. 344090, Rostov-na-Donu, prospect Stachki, 194/1, Russia. E-mail: tshkurat@yandex.ru.