

Асоціації поліморфізмів гена інтерлейкіну-1 зі звичним невиношуванням вагітності після запліднення *in vitro* у жінок Одеської області України

К.П. Головатюк

Одеський національний медичний університет

Мета дослідження: вивчення частоти генотипів та алельних варіантів генів інтерлейкіну (IL)-1 α (-889 C>T) та IL-1 β (3953 C>T) залежно від репродуктивного статусу і оцінювання асоціативного зв'язку зі звичним невиношуванням вагітності (ЗНВ), що настала у циклах запліднення *in vitro* (ЗІВ), у жінок Одеської області України.

Матеріали та методи. Під спостереженням перебували 240 пацієнток із ЗНВ у циклах ЗІВ і 100 умовно здорових фертильних жінок контрольної групи з наявністю в анамнезі хоча б одних термінових пологів і відсутністю епізодів мимовільного переривання вагітності. Для типування однонуклеотидних поліморфізмів генів імунної відповіді IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T використовували полімерази ланцюгову реакцію з плавленням продуктів реакції за наявності «примикаючих» олігонуклеотидів.

Результати. Генотип ТТ⁻⁸⁸⁹ гена IL-1 α (OR 6,86; 95% CI: 2,07 – 22,69) і генотип ТТ³⁹⁵³ гена IL-1 β (OR 9,22; 95% CI: 2,18 – 38,99) були асоційовані з вірогідним збільшенням ризику ЗНВ після ЗІВ.

Заключення. Типування однонуклеотидних поліморфізмів генів імунної відповіді IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T може бути використано як один з методів ранньої діагностики і передгравідарного прогнозування репродуктивних втрат у безплідних жінок після ЗІВ. Генотип ТТ⁻⁸⁸⁹ гена IL-1 α і генотип ТТ³⁹⁵³ гена IL-1 β у мешканок Одеської області України асоціюються з вірогідним збільшенням ризику звичного невиношування вагітності після запліднення *in vitro*.

Ключові слова: запліднення *in vitro*, звичне невиношування вагітності, генотип, поліморфізм генів, інтерлейкін-1 α , інтерлейкін-1 β , Одеська область.

Відповідно до сучасних уявлень етапи дозрівання яйцеклітини, її імплантації і розвитку контролюються імунною системою і є цитокінозалежними процесами. Одними з найважливіших є цитокіни сімейств інтерлейкінів (IL) [1, 5].

IL-1 був першим з ідентифікованих інтерлейкінів [7]. Він володіє плейотропізмом і діє при зникаючих малих концентраціях на клітини і органи настільки ж різноманітно, як гіпоталамус і Т-лімфоцити, і не має аналогів в біології. IL-1 зачіпає практично всі клітини і органи і є основним патогенним медіатором автозапальних, автоімунних, інфекційних і дегенеративних захворювань [14].

Сімейство IL-1 включає 7 молекул з активністю агоніста (IL-1 α і β , IL-18, IL-33, IL-36 α , β і γ), три антагоніста рецепторів (IL-1ra, IL-36Ra і IL-38), а також протизапальний цитокін (IL-37). Члени сімейства IL-1R включають 11 молекул [7].

IL-1 α регулює інвазію, індукуює чинники, які стимулюють інвазивність, наприклад, матричні металопротеїнази (ММП) і молекули адгезії [4]. IL-1 β є типовим прозапальним цитокіном і вважається одним з найвпливовіших медіаторів запалення [11, 12]. На відміну від IL- α , який синтезується відразу в активній формі, IL- β синтезується у формі попере-

дника масою 33 кДа. Активна форма IL- β утворюється у результаті відщеплення частини попередника IL- β каспазою-1 або ММП. IL-1 β здатний індукувати NO-синтазу і тим самим приводити до підвищеної продукції оксиду азоту.

Надмірна експресія прозапальних цитокінів має не тільки прямий ембріотоксичний ефект, але й обмежує інвазію трофобласта, порушує його нормальне формування. Крім того, надмірна кількість прозапальних цитокінів призводить до активації протромбінази, що зумовлює тромбози, інфаркти трофобласта і його відшарування і, в кінцевому підсумку, викидень у I триместрі вагітності [2].

Деякі кореляції були продемонстровані між рівнями IL-1 і успіхом ЗІВ. Більш високі рівні IL-1 α були виявлені у фолікулярній рідині при настанні імплантації у порівнянні з циклами без імплантації, хоча прямий причинний зв'язок не був продемонстрований, в той час як високі концентрації IL-1 у культуральному середовищі при ЗІВ корелюють з успіхом імплантації. *In vitro* вивільнення IL-1 культивованими клітинами цитотрофобласта прямо пропорційно їхній інвазивній здатності, і IL-1 β збільшує виробництво ММП-2 і -9 та JEG-3-клітинами трофобласта [9]. *In vivo*, ймовірно, децидуальний IL-1 β може діяти паракринним шляхом за рахунок зв'язування з IL-1R1, який експресується трофобластом, і регулює ММП-опосередковану інвазію і секрецію хоріонічного гонадотропіну людини.

Відомо, що змінена продукція цитокінів може бути генетично детермінованою за рахунок однонуклеотидних поліморфізмів (SNPs). Ген, що кодує IL-1 α , розташований у хромосомі 2q13-21 і має SNP в позиції -889 [4]. Ген IL-1 β розташований у локусі 2q13 і містить 22 екзони (20 альтернативні) і 9 інтронів (8 альтернативні). Для гена IL- β на сьогодні відомі алельні варіанти, пов'язані із заміною нуклеотиду в промоторі в положенні -31, -511 і в положенні +3953 [7].

Асоціація поліморфних варіантів генів сигнальних молекул з порушенням репродуктивної функції мало вивчена, існуючі дані, які свідчать про участь поліморфізмів генів сімейства IL-1 у репродуктивних втратах, поодинокі та суперечливі.

Мета дослідження: вивчення частоти генотипів та алельних варіантів генів IL-1 α (-889 C>T), IL-1 β (3953 C>T) залежно від репродуктивного статусу і оцінювання асоціативного зв'язку зі звичним невиношуванням вагітності, що настала у циклах запліднення *in vitro*, у жінок Одеської області України.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 240 пацієнток групи Н із ЗНВ після ЗІВ і 100 умовно здорових фертильних жінок контрольної групи (К) з наявністю в анамнезі хоча б одних термінових пологів і відсутністю епізодів мимовільного переривання вагітності, які знаходилися під спостереженням у ТОВ «Медичний центр репродуктивного здоров'я «Гамета» м. Одеси і/або Університетській клініці Одеського національного медичного університету «Центр відновної та реконструктивної медицини». Усі жінки були жительками Одеського регіону.

Таблиця 1

Частота алелів та генотипів генів IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T у жінок Одеської області України із ЗНВ після ЗІВ, n (%)

Алелі та генотипи		Група Н, n=240	Група К, n=100	p<	Усього
<i>IL-1α-889 C>T (rs1800587)</i>					
Алель	C	295(61,46)	147(73,50)	0,003	442
	T	185(38,54)	53(26,50)	0,003	238
Генотип	CC	97(40,42)	50(50,00)	0,104	147
	CT	101(42,06)	47(47,00)	0,405	148
	TT	42(17,50)	3(3,00)	0,0003	45
<i>IL-1β 3953 C>T (rs 1143634)</i>					
Алель	C	313(65,21)	152(76,00)	0,006	465
	T	167(34,79)	48(24,00)	0,006	215
Генотип	CC	111(46,25)	54(54,00)	0,193	165
	CT	91(37,92)	44(44,00)	0,296	136
	TT	38(15,83)	2(2,00)	0,0003	40

Таблиця 2

Мультиплікативна модель успадкування алелів генів IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T у жінок Одеської області України із ЗНВ після ЗІВ

Алель	Група Н, n=240	Група К, n=100	χ^2	p<	OR	
					Значення	95% CI
<i>IL-1α-889 C>T (rs1800587)</i>						
C	0,806	0,915	12,31	0,0005	0,39	0,22-0,67
T	0,194	0,085			2,59	1,50-4,47
<i>IL-1β 3953 C>T (rs 1143634)</i>						
C	0,665	0,880	33,08	9,0E-9	0,27	0,17-0,43
T	0,335	0,120			3,70	2,32-5,50

Молекулярно-генетичні дослідження проводили у молекулярно-генетичній лабораторії ТОВ «Діагностичний центр «Євгеніка» м. Одеси. ДНК виділяли з ядер лімфоцитів периферійної крові з використанням набору «Пробо ГС» (ТОВ «НПО ДНК-Технологія», Росія) відповідно до інструкцій фірми-виробника. Для типування однонуклеотидних поліморфізмів генів імунної відповіді використовували полімеразну ланцюгову реакцію з плавленням продуктів реакції за наявності «примикаючих» олігонуклеотидів. Для генотипування поліморфізмів генів IL-1 застосовували послідовності внутрішніх та зовнішніх, прямих і зворотних праймерів для генів IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T. Ампліфікацію проводили на детектувальному ампліфікаторі ДТ-96 «DTprime» (Росія).

Статистичне оброблення отриманих даних здійснювали за допомогою електронної програми Microsoft Office 2007 for Windows XP Professional STATISTICA 6.0 (Stat. Soft. Inc. США) з визначенням достовірності відмінностей при значенні p<0,05. Відповідність спостережуваних розподілів частот генотипів теоретично очікуваним за рівнянням Харді-Вайнберга оцінювали з використанням критерію χ^2 . Обчислення проводили за допомогою он-лайн-калькулятора для розрахунку статистики в дослідженнях «випадок-контроль» (http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php). Для оцінювання асоціацій розраховували відносний ризик (OR). Для OR розраховували довірчий інтервал (CI) при 95% рівні значущості.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Групи були зіставні за віком – середній вік обстежених жінок групи Н становив 29,80 \pm 0,30 року, а в групі К – 30,09 \pm 0,30 року (p>0,05). Переривання вагітності у групі Н у I триместрі мали 51,25% пацієнток, у II триместрі – 34,17%,

у III триместрі – 14,58%. Середня кількість мимовільних викиднів після ЗІВ була 3,24 \pm 0,11, середній термін переривання вагітності – 8,15 \pm 0,65 тиж.

Під час аналізу частоти алелів та генотипів гена IL-1 α -889 C>T встановлено, що в обстежених жінок групи Н алель Т зустрічався в 1,45 і генотип ТТ в 5,83 рази частіше, ніж аналогічні у контрольній групі. В осіб з генотипом IL-1 β 3953 C>T у групі Н алель Т реєстрували в 1,45 і генотип ТТ в 7,92 рази частіше, ніж такі у групі К (табл. 1).

Аналіз мультиплікативної моделі успадкування підтвердив асоціацію алеля Т гена IL-1 α (rs1800587) і гена IL-1 β (rs 1143634) із ЗНВ після ЗІВ: у групі Н цей алель реєстрували значно частіше, ніж в осіб групи К (відповідно OR 2,59; 95% CI 1,50–4,47 та OR 3,70; 95% CI: 2,32–5,50) (табл. 2).

Вивчення асоціацій материнських генотипів генів IL-1 β -889 C>T (rs1800587) та IL-1 β 3953 C>T (rs 1143634) із ЗНВ за допомогою загальної моделі успадкування також засвідчило, що генотип ТТ гена IL-1 α (rs1800587) і генотип ТТ гена IL-1 β (rs 1143634) значно частіше виявляли у жінок групи Н на відміну від пацієнток контрольної групи (табл. 3). Носії цих генотипів мали високу ймовірність розвитку звичного невиношування за настання вагітності після ЗІВ. Значення OR для них становило 6,86 (95% CI: 2,07–22,69) і 9,22 (95% CI: 2,18–38,99).

За рецесивною моделлю успадкування гомозиготні носії рецесивних алелів Т генів IL-1 α (rs1800587) та IL-1 β (rs 1143634) мали високу ймовірність розвитку ЗНВ після ЗІВ – OR відповідно 6,86 (95% CI: 2,07–22,69) і 9,22 (95% CI: 2,18–38,99), тоді як гомозиготні носії домінантних алелів і гетерозиготні носії відповідних генів асоціювалися з фізіологічним перебігом вагітності (табл. 4).

У численних дослідженнях доведено, що переважання вироблення цитокінів Th1 у поєднанні з Th17-клітинами не-

Таблиця 3

Загальна модель успадкування генотипів генів IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T у жінок Одеської області України із ЗНВ після ЗІВ

Показник	Група Н, n=240	Група К, n=100	χ^2	p<	OR (95% CI)
<i>IL-1α-889 C>T (rs1800587)</i>					
Генотип СС	0,404	0,500	13,10	0,001	0,68 (0,42-1,08)
Генотип СТ	0,421	0,470			0,82 (0,51-1,31)
Генотип ТТ	0,175	0,030			6,86 (2,07-22,69)
HWE P	0,04	0,04			
<i>IL-1β 3953 C>T (rs 1143634)</i>					
Генотип СС	0,463	0,540	13,01	0,002	0,73 (0,46-1,17)
Генотип СТ	0,379	0,440			0,78 (0,48-1,25)
Генотип ТТ	0,158	0,020			9,22 (2,18-38,99)
HWE P	0,08	0,01			

Примітка: HWE P – рівень статистичної значущості для рівноваги Харді–Вейнберга.

Таблиця 4

Рецесивна модель успадкування генотипів генів IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T у жінок Одеської області України із ЗНВ після ЗІВ

Генотипи	Група Н, n=240	Група К, n=100	χ^2	p<	OR	
					Значення	95%CI
<i>IL-1α-889 C>T (rs1800587)</i>						
СС+СТ	0,825	0,970	12,92	0,0003	0,15	0,04-0,048
ТТ	0,175	0,030			6,86	2,07-22,69
<i>IL-1β 3953 C>T (rs 1143634)</i>						
СС+СТ	0,842	0,980	13,01	0,0003	0,11	0,03-0,48
ТТ	0,158	0,020			9,22	2,18-38,99

сприятливо впливає на процес імплантації і на подальший розвиток вагітності [5]. Перенесені значною частиною безплідних жінок – пацієнок ЗІВ інфекційні та неспецифічні запалення внутрішніх статевих органів, численні спроби ЗІВ, постійний стрес підтримують активацію інфламасом і виділення надмірних рівнів прозапальних цитокінів ще на передконцепційному етапі [6]. Другим важливим чинником передконцепційної гіперпродукції цитокінів у пацієнок з репродуктивними втратами є наявність генетичних поліморфізмів, що підтверджують роботи різних дослідників [1–3, 5, 8–1, 13], та проведене нами дослідження. Отримані нами дані свідчать, що 17,50 % пацієнок програм ЗІВ із ЗНВ є гомозиготними носіями рецесивних алелів Т гена IL-1 α (rs1800587) і 15,83 % – гена IL-1 α (rs1143634). Досліджувані поліморфізми генів IL-1 α і IL-1 β зумовлюють

підвищення експресії відповідних цитокінів, що призводить до порушення балансу між рівнями Th1- і Th2-цитокінів. Це може спричинювати порушення імплантації та інвазії трофобласта, подальшого ембріонального розвитку і зумовлювати високу ймовірність розвитку ЗНВ після ЗІВ.

ВИСНОВКИ

Типування одонуклеотидних поліморфізмів генів імунної відповіді IL-1 α -889 C>T та IL-1 β 3953 C>T може бути використано як один з методів ранньої діагностики і передгравідарного прогнозування репродуктивних втрат у безплідних жінок після запліднення *in vitro* (ЗІВ). Генотип ТТ⁸⁸⁹ гена IL-1 α і генотип ТТ³⁹⁵³ гена IL-1 β асоціюються з вірогідним збільшенням ризику звичного невиношування вагітності після ЗІВ.

Асоціації поліморфізмів гена інтерлейкіна-1 с привичним невынашиванием беременности после экстракорпорального оплодотворения у женщин Одесской области Украины
Е.П. Головатюк

Цель исследования: изучение частоты генотипов и аллельных вариантов генов интерлейкина (IL)-1 α (-889 C>T) и IL-1 β (3953 C>T) в зависимости от репродуктивного статуса и оценка ассоциативной связи с привычным невынашиванием беременности (ПНБ), наступившей в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), у женщин Одесской области Украины.

Материалы и методы. Под наблюдением находились 240 пациенток с ПНБ в циклах ЭКО и 100 условно здоровых фертильных женщин контрольной группы с наличием в анамнезе хотя бы одних срочных родов и отсутствием эпизодов самопроизвольного прерывания беременности. Для типирования одонуклеотидных полиморфізмів генов иммунного ответа IL-1 α -889 C>T и IL-1 β

3953 C>T использовали полимеразную цепную реакцию с плавлением продуктов реакции при наличии «примыкающих» олигонуклеотидов.

Результаты. Генотип ТТ⁸⁸⁹ гена IL-1 α (OR 6,86; 95% CI: 2,07–22,69) и генотип ТТ³⁹⁵³ гена IL-1 β (OR 9,22; 95% CI: 2,18–38,99) были ассоциированы с вероятным увеличением риска ПНБ после ЭКО.

Заключение. Типирование одонуклеотидных полиморфізмів генов иммунного ответа IL-1 α -889 C>T и IL-1 β 3953 C>T может быть использовано как один из методов ранней диагностики и прегравідарного прогнозирования репродуктивных потерь у бесплодных женщин после ЭКО. Генотип ТТ⁸⁸⁹ гена IL-1 α и генотип ТТ³⁹⁵³ гена IL-1 β ассоциируются с вероятным увеличением риска привычного невынашивания беременности после ЭКО у женщин Одесской области Украины.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, привычное невынашивание беременности, генотип, полиморфізм генов, интерлейкин-1 α , интерлейкин-1 β , Одесская область.

Association of gene polymorphisms interleukine-1 with recurrent miscarriage after IVF in women of Odessa region of Ukraine

K.P. Golovatyuk

The objective: to study the frequency of genotypes and allelic variants of the IL-1 α (-889 C>T), IL-1 β (3953 C>T) genes, depending on the reproductive status and to evaluate association with recurrent miscarriage, which set in cycles of in vitro fertilization (IVF), from residents of Odessa region of Ukraine.

Patients and methods. We observed 240 patients with recurrent miscarriage, came in IVF cycles, and 100 apparently healthy fertile women of the control group with a history of at least one term delivery and lack of spontaneous abortion episodes. For typing single nucleotides polymorphisms of immune responses genes IL-1 α -889 C>T and IL-1 β

3953 C>T polymerase chain reaction is used to melting the reaction products in the presence of «adjacent» oligonucleotides.

Results. TT₈₈₉ genotype of gene IL-1 α (OR 6.86; 95% CI: 2,07–22,69) and TT₃₉₅₃ genotype of gene IL-1 β (OR 9.22; 95% CI: 2,18–38,99) were associated with the possible increase in the risk of recurrent miscarriage after IVF.

Conclusions. Typing IL1 α -889 C>T and IL1 β 3953 C>T gene SNPs immune response can be used as a method of early diagnosis and prediction pregravidal reproductive losses in infertile women after IVF. The TT₈₈₉ genotype of IL-1 α gene and TT₃₉₅₃ genotype of IL-1 β gene associated with the possible increase in the risk of recurrent miscarriage after IVF.

Key words: fertilization, recurrent miscarriage, genotype, gene polymorphism, IL-1 α , IL-1 β , Odessa region.

Сведения об авторе

Головатюк Екатерина Петровна – Кафедра реконструктивной и восстановительной медицины с курсом репродукции Одесского национального медицинского университета; ООО «Медицинский центр репродуктивного здоровья «Гамета»», 65039, г. Одесса, ул. Слепнева, 3-А; тел.: (048) 738-68-69. E-mail: info@gameta.od.ua

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Машкина Е.В. Молекулярно-генетические предикторы репродуктивных потерь: Дисс. ... д-ра биол. наук: 03.02.07 / Е.В. Машкина. – Белгород, 2015. – 205 с.
2. Сафарова А.Ф. Молекулярные механизмы взаимодействия женских половых гормонов и иммунокомпетентных клеток, их влияние на эффективность экстракорпорального оплодотворения бесплодных женщин (обзор литературы) / А.Ф. Сафарова // Вестник проблем биологии и медицины. – 2015. – Вып. 3. – Т. 2 (123). – С. 34–38.
3. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour / Zachariades E., Mparmpakas D., Pang Y. [et al.] // Placenta. – 2012. – 33. – P. 367–372.
4. Cheng D. IL-1 α -889 C/T polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis / Cheng D., Hao Y., Zhou W. // Onco Targets Ther. – 2014. – Vol. 7. – P. 2067–74.
5. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation / Dimitriadis E., White C.A., Jones R.L., Salomonsen L.A. // Hum. Reprod. Update. – 2005. – Vol. 11, N 6. – P. 613–630.
6. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies / S.D. Brydges, L. Broderick, M. D. Mc Geough [et al.] // J. Clin. Invest. – 2013. – Vol. 123, N 11. – P. 4695–4705.
7. Garlanda C. The interleukin-1 family: back to the future / C. Garlanda, C.A. Dinarello, A. Mantovani // Immunity. – 2013. – Vol. 39, N 6. – P.1003–1018.
8. Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1 α / Rodney Geisert, Asgerally Fazleabas, Mathew Lucy, Daniel Mathew // Cell Tissue Res. – 2012. – Vol. 349, N 3. – P. 825–838.
9. Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1 β / R. Geisert, A. Fazleabas, M. Lucy, D. Mathew // Am. J. Reprod. Immunol. – 2014. – Vol. 71, N 1. – P. 1–11.
10. Interleukin-1beta regulates progesterone metabolism in human cervical fibroblasts / Roberson A.E., Hyatt K., Kenkel C. [et al.] // Reprod. Sci. – 2012. – 19. – P. 271–281.
11. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity / Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11. – P. 519–531.
12. Preterm birth and single nucleotide polymorphisms in cytokine genes / Q. Zhu, J. Sun, Y. Chen / Transl Pediatr. – 2014. – Vol. 3, N 2. – P. 120–134.
13. Transcriptome Analysis Reveals New Insights into the Modulation of Endometrial Stromal Cell Receptive Phenotype by Embryo-Derived Signals Interleukin-1 and Human Chorionic Gonadotropin: Possible Involvement in Early Embryo Implantation / Bourdieu A., Calvo E., Rao C.V., Akoum A. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 5. – e64829.
14. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases / Dinarello C.A., Simon A., van der Meer J.W. // Nature Rev. Drug Discov. – 2012. – 11. – Vol. 633–652.

Статья поступила в редакцию 20.01.17