**ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ IL-1β (C511T), IL-17A (G197A), IL-12B (A1188C), TNF-α (G308A) И IL-4 (C589T) ПРИ УГРОЗЕ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ**

**Введение**

Депопуляционные процессы в России и в мире связаны в основном с проблемой невынашивания беременности. Частота гравидарных потерь по данным разных авторов составляет от 2% до 55%, а в первом триместре достигает 75-85%. Распространённость угрожающего выкидыша занимает 16–25 % от числа всех беременностей [1; 6; 9; 13]. Симптомокомплекс угрожающего выкидыша в I триместре может быть обусловлен трансформацией базовой воспалительной реакции, нарушающей межсистемные и локальные взаимодействия в эндометрии с последующей плацентарной недостаточностью, внутриутробному страданию плода и спонтанными абортами [6; 9].

При физиологическом течении беременности в фетоплацентарном комплексесохраняется оптимальный баланс провоспалительных цитокинов, вырабатываемых Т-хелперами I типа (Th1): IL-1*β*, TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-18, участвующих в клеточном иммунном ответе, ипродуцирумых Т-хелперами II типа (Th2) регуляторных цитокинов: IL-4,IL-5, IL-10, стимулирующих гуморальный иммунитет [3; 8; 12; 26]. В соответствии с концепцией цитокинового сдвига, предложенной ранее T. Вегманном (1993 г.) и поддерживаемой в настоящее время, иммунное обеспечение беременности сводится к регулируемому балансу Th1/Th2 материнского организма со снижением Th1 и повышением Th2 клеточной реактивности [5; 7; 9; 17; 23]. Полагают, что Тh2 ингибируют пролиферацию и цитотоксическую активность NK, стимулирующих продукцию медиаторов Тh2-типа по принципу положительных обратных связей [5; 40]. Это может иметь важное значение, т.к. провоспалительные цитокины, продуцируемые Th1, обладают прямым эмбриотоксическим эффектом, ограничивают инвазию и формирование трофобласта. Избыточные количества провоспалительных цитокинов активируют протромбиназы с нарушением в системе гемостаза, развитием тромбозов, инфарктов, отслойки трофобласта и ранних эмбриональных потерь. Сохранение беременности в этих условиях сопровождается первичной плацентарной недостаточностью [2; 4; 5; 12].

Несмотря на предположение о связи гестационных осложнений с превалированием Th1, в ряде исследований показано, что ранние этапы эмбриогенеза и имплантации прифизиологическом течении беременности требуют усиленного Th1**-**иммунного ответа и формирования провоспалительного микроокружения в системе «мать-плацента-плод», необходимого для стимуляции васкулогенеза и успешной эмбриональной имплантации [2; 7; 26; 28; 37]. Это подтверждено in vivo на экспериментальных линиях мышей (INFγ-/-) [14].

Каждый этап пролонгированной во времени беременности характеризуется про-/противоспалительным профилем, а более сложные по сравнению с аллотрансплантацией взаимодействия плода и материнского организма определяются медиаторами иммунной системы [7; 11; 34]. Цитокины контролируют этапы имплантации зародыша, пролиферации, роста и созревания плаценты, органогенез плода. Уровни продукции цитокинов регулируются различными механизмами, одним из которых являются полиморфизмы генов, расположенные в промоторных регионах и ассоциированные с оверэкспрессией соответствующих медиаторов воспаления «первой волны». [3; 6]. SNPs генов цитокинов могут определять баланс/дисбаланс про- и противовоспалительных медиаторов, нарушая ранние этапы эмбрионального развития. Связь между аллельными вариантами генов цитокинов и риском нарушения взаимодействий в системе «мать-плацента-плод» обсуждается, однако данные весьма противоречивы и преимущественно акцентированы на привычном невынашивании беременности [7; 16; 23; 25; 27; 32; 36; 39].

Спектр исследованных SNP генов медиаторов воспаления, ассоциированных с ранними репродуктивными осложнениями: IL-1β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF-α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) определён при анализе международных баз данных (МБД) National Center for Biotechnology Information (NCBI), Springer, ScienceDirect, Science Research Portal, Google Scholar**,** КиберЛенинка, HuGe Navigator.Полиморфизмы промоторных регионов генов цитокинов, влияющие на уровни их экспрессии, имеют выраженную этническую специфику, однако в информационных системах данные по ассоциации с угрозой выкидыша до 13 недели гестации немногочисленны, а по Республике Адыгея (РА) практически не представлены, что и определило цель настоящего исследования.

**Цель работы:** Исследовать распределение частот аллельных вариантов, генотипов и ассоциацию SNPs генов цитокинов IL-1β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B A1188C (rs3212227), TNF-α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) с угрозой ранних репродуктивных потерь у жительниц РА.

**Контингент обследованных лиц**

В соответствии с принципами Хельсинской декларации (1964 г., доп. 2013 г.) исследование проведено с письменного информированного согласия 106 неродственных женщин славянской и адыгской национальности репродуктивного возраста, подобранных эмпирически и распределенных по двум группам в зависимости от течения гестации и акушерскому анамнезу. Критерии исключения: женщины с тяжёлой соматической патологией, хроническими заболеваниями в стадии декомпенсации (заболеваниями печени, почек, эндокринных желёз, сердечно-сосудистой системы с нарушением их функций); прервавшимися беременностями в результате хромосомных аномалий и врождённые пороки развития плода.

В первую группу (n=58) включены пациентки 19-45 лет (28,5±5,7 лет) акушерского отделения №2 патологии малых сроков беременности ГБУЗ РА "Майкопская городская клиническая больница" с верифицированным диагнозом угрозы прерывания беременности на момент исследования в срок до 13 недель, с использованием клинических методов исследования и лабораторных показателей. В анамнезе обследованных женщин - ранние репродуктивные потери по типу неразвивающейся беременности или самопроизвольного аборта. Контрольная (вторая группа, n=48) представлена здоровыми жительницами РА 18–45 лет (28,8±5,1 лет), имеющими одного и более здоровых детей, без отягощённости по исследуемой нозологии, с отсутствием в анамнезе медицинских абортов, внематочной беременности и маточных анатомических аномалий.

**Материалы и методы исследования**

**Выделение ДНК**. Образцы ДНК обследованных групп женщин выделены с использованием тест-систем «Проба ГС-Генетика» (ООО «ДНК-Технология», г. Москва) согласно инструкции производителя и последующим определением чистоты образцов и концентрации ДНК на спектрофотометре NanoDrop 2000с «Thermo Scentific» (USA).

**Постановка ПЦР.** Для SNP-типирования полиморфных вариантов генов цитокинов IL-1β, IL-17A, IL-12B A1188C, TNF-α и IL-4 использован метод ПЦР с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией результатов на тест-системах НПФ «Литех» (г. Москва).

**Статистический анализ.** Сравнительная статистическая обработка экспериментальных данных проведена в программе SPSS Statisticа 17.0. Соответствие распределений SNP ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и сравнение частот аллельных вариантов/генотипов проводили с использованием критерия χ2 (хи-квадрата и поправкой Йейтса), отношения шансов – OR (odds-ration) при уровне значимости р<0,05 и 95% доверительном интервале (95% СI). Достоверность различий частот изучаемых признаков для малых выборок оценивали с помощью точного критерия Фишера.

**Результаты**

Аллельные варианты генов цитокинов могут обусловливать оверэкспрессию провоспалительных цитокинов и дисбаланс медиаторов иммунной системы, что определяет генетическую предрасположенность к нарушению фетоплацентарных взаимодействий и ранним репродуктивным потерям [2; 7]. Восприимчивость к некоторым инфекционным, воспалительным и аутоиммунным заболеваниям у беременных женщин повышает риск гестационных осложнений и во многом зависит от SNP в промоторах регионах генов, влияющих на связывание факторов транскрипции и гиперпродукцию соответствующих медиаторов [19; 26; 36; 40]. Исследование ассоциации полиморфизмов генов с уровнями продукции цитокинов является актуальным направлением в обосновании роли воспалительного компонента в процессах развития беременности и иммунного ответа материнского организма на развивающийся плод [7; 11].

Поэтому, в соответствии с поставленной целью, в образцах геномной ДНК беременных жительниц Республики Адыгея проанализировано распределение частот генотипов и аллелей генов основных цитокинов IL-1β (C511T, rs16944), IL-17A (G197A, rs2275913), IL-12B (A1188C, rs3212227), TNF-α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) (табл. 1).

У жительниц Республики Адыгея из пяти исследованных SNP генов цитокинов с угрозой раннего прерывания беременности ассоциированы мутантная -511Т аллель (χ2=16,96; OR=5,8; p=0,00004), гетерозиготный C511T и гомозиготный Т511Т генотипы гена медиатора острого воспаления IL-1β, повышающие риск самопроизвольного аборта соответственно в 3,5 и 5,7 раз (χ2=14,81; p=0,0006) в первом триместре, а также -1188C аллельный вариант гена регуляторного IL-12B (χ2=6,17; OR=2,97; p=0,01).

Исследования генетического компонента популяции позволяют определить иммуногенетический профиль и установить специфические особенности представителей разных этнических групп, т.к. по многим полиморфным сайтам генов цитокинов выявлены межпопуляционные различия [11; 40]. Результаты анализа частотного распределения аллельных вариантов генов в группах русских женщин и этнических адыгеек представлены в таблицах 2, 3.

У русских женщин с риском развития симптомокомплекса угрожающего выкидыша ассоциирована «мутантная» -511Т аллель гена IL-1β (OR=14,09; р=0,00005), которая чаще выявляется среди данного контингента и практически не обнаруживается у женщин с нормальным течением беременности. По A1188/1188C полиморфизмам гена IL-12B различия между группами русских женщин с нормальным течением гестации и угрозой раннего выкидыша приближаются к статистически значимым (р=0,07). Для остальных генов-кандидатов (IL-17A, TNF-α, IL-4) ассоциация не установлена (табл. 2).

По аналогии с данными, представлеными в табл. 2, у этнических адыгеек с увеличением риска раннего выкидыша также ассоциирован -511Т аллельный вариант гена IL-1β (OR=8,17; 95% Cl: 1,42–47,02; р=0,02).

**Обсуждение**

IL-1β связывается с рецепторами материнского эндометрия, индуцируя развитие в нём локальной воспалительной реакции, необходимой для имплантации, способствует развитию плода, пролиферации клеток и стимуляции кровоснабжения фетоплацентарного комплекса [6; 7; 40]. Результаты экспериментальных исследований (табл. 1-3) подтверждают выводы Kim J.O. et al. (2014 г.) о повышении частоты «мутантного» для азиатской популяции аллельного варианта -511C гена IL-1β у женщин с привычным невынашиванием беременности (p≤0,05) независимо от их этнической принадлежности. Это обусловлено тем, что C511T (rs16944) полиморфизм, расположенный в промоторном регионе гена IL-1β, сопряжен с оверэкспрессией медиатораи повышением пула NK-клеток в популяции лимфоцитов [40], и, возможно, вовлечён в патогенез самопроизвольного перывания беременности [6; 7; 36; 40]. Механизм прямого повреждающего эффекта IL-1β малоизучен, однако возможно опосредованное участие IL-1β в развитии клеточного ответа с экспрессией генов около 100 цитокинов, гормонов, ферментов, ростовых факторов, других биологически активных веществ и их рецепторов [10].

Следует отметить, что в масштабных мета-анализах получены весьма противоречивые данные об ассоциации C511Т полиморффизма гена IL-1β с патологией беременности. Так, при генотипировании 775 женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и 805 здоровых жительниц (Китай) показано, что гомозиготный C511C генотип гена IL-1β достоверно повышаетриск рецидива выкидыша (OR=1,377; 95% Сl: 1,039-1,824; p=0,026) [26]. В исследовании (n=9401), проведённом Zhang M. et al. в 2017 году, также подтверждена роль IL-1β (C511T) в развитии привычного невынашивания беременности (40). Тем не менее, в мета-анализах Bombell S. et al. (2008 г.) и Ma X. (2012 г.) не выявлено достоверной ассоцииации C511/511Т аллельных вариантов гена IL-1βс рецидивирующими выкидышами [16; 27].

Одной из причин противоречивых данных, полученных для жителей Китая, возможно сравнение разных этнических групп, проживающих в географически удалённых провинциях, проведение исследования без учёта связи IL-1β с другими медиаторами. Например, IL-1β в сочетании с повышенным децидуальным уровнем IL-12 направляет дифференцировку Th0 по Th1-типу, что может сказываться на течении гестации и способствовать раннему прерыванию беременности [36].

Перспективно типирование SNP в гене IL-12B, т.к. он является ключевым медиатором развития Th1, влияет на иммунные клеточные реакции, регулируя активность макрофагов и цитотоксичность NK при формировании сосудистой системы матки [30]. Несмотря на отсутствие достоверной информации в МБД (NCBI, Springer, ScienceDirect, Science Research Portal, Google Scholar**,** КиберЛенинка, HuGe Navigator) о связи A1188C (rs3212227) полиморфизма гена IL-12B с угрозой прерывания беременности на ранних сроках, в общей группе обследованных женщин РА установлена строгая ассоциация (OR=2,97; 95% Cl: 1,23–7,19; р=0,01) A1188C полиморфного варианта гена IL-12B с ранними репродуктивными потерями (табл. 1-3).

Следует отметить, что в зарубежных и отечественных работах аналогичные заключения о роли A1188C гена IL-12B в самопроизвольном прерывании беременности не представлены, а для жителей Китая и Хорватии показано отсутствие связи rs3212227 SNP с тяжёлыми гестационными осложнениями (невынашиванием беременности, преэклампсией и т.д.) [30; 35].

Несмотря на дискуссионные вопросы о вовлёченности полиморфных вариантов трёх основных медиаторов иммунной системы IL-17A (G197A, rs2275913), TNF-α (G308A, rs1800629) и IL-4 (C589T, rs2243250) в патогенез ранних репродуктивных потерь, у женщин РА эти SNP не ассоциированы c угрозой прерывания беременности в первом триместре (табл. 1-3).

Медиатор острого и хронического воспаления IL-17A, синтезируемый в основном Th17, накапливается в периферической крови, децидуальной оболочке плода, запускает патофизиологические процессы привычного невынашивания беременности, что показано для египтянок. G197A (rs2275913) полиморфизм у них ассоциирован с повышенным уровнем сывороточного уровня IL-17A и, соответственно, с риском ПНБ [17; 29; 38; 40; 41]. Тем не менее, при привычном невынашивании беременности в иранской популяции G197A полиморфизм гена IL-17 неинформативен [15; 29].

Полиморфизмы гена ключевого медиатора иммунного воспаления фактора некроза опухоли альфа ассоциированы с рецидивирующими выкидышами у жительниц Северной Индии (-308А аллель и гомозиготный «мутантный» генотип A308A гена TNF-α; р<0,05) [22] и служат маркером предрасположенности к спонтанным абортам у женщин Ростовской области, но не информативны при неразвивающейся беременности [7].

В серии работ на больших выборках иранских и китайских женщин не подтверждена связь -308A аллели TNF-α с рецидивирующей потерей беременности [16; 23; 25]. Отсутствие строгой ассоциации точечных мутаций G308A (rs1800629) гена TNF-α и C589T (или С590Т; rs2243250) гена IL-4 с самопроизвольным прерыванием беременности подтверждено зарубежными учёными [18; 20; 21; 23; 24; 26; 31; 32; 34; 39) и настоящим экспериментальным исследовании (табл. 1-3), проведённым на базе иммуногенетической лаборатории НИИ Комплексных проблем АГУ.

Таким образом, у жительниц РА из типированных SNP генов основных медиаторов иммунной системы только С511Т гена IL-1β и A1188C гена IL-12B могут быть использованы в качестве маркерных полиморфизмов гестационного неблагополучия.

**Выводы**

1. Аллели -511Т гена IL-1β и -1188C гена IL-12B с высоким уровнем значимости увеличивают риск раннего самопроизвольного прерывания беременности соответственно в 5,80 (95% Cl: 2,42–13,92; р=0,00004) и 2,97 раз (95% Cl:1,23–7,19; р=0,01).
2. С риском развития симптомокомплекса угрожающего выкидыша в I триместре беременности у жительниц Республики Адыгея достоверно (р<0,05) ассоциированы гетеро- и гомозиготный «мутантный» генотипы основного провоспалительного цитокина IL-1β (для С511Т – OR=3,46; 95% Cl: 1,04–11,54 и для Т511Т – OR=5,71; 95% Cl: 1,12–29,09).

3. Носительство -511Т аллели гена IL-1β повышает риск угрожающего выкидыша у русских женщин в 14 раз (OR=14,09; р=0,00005), а у адыгеек в 8 раз (OR=8,17; р=0,02).