

УДК 618.396, 616-092.11, 616-079.7

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ *IL-1B*, *TNF*, *IL-1RA* и *IL-4* ПОВЫШАЕТ РИСК РАЗВИТИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ*

© 2019 В.С. Белоусова^{1**}, О.А. Свитич², Е.В. Тимохина^{1**},
А.Н. Стрижаков¹, И.М. Богомазова¹

¹ ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), 119991 Москва, Россия;
электронная почта: desdemosha@mail.ru; elena.timokhina@mail.ru

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова, 105064 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.11.2018

После доработки 11.04.2019

Принята к публикации 21.05.2019

Преждевременные роды (ПР) – это не только медицинская, но и социальная проблема. Основополагающая задача современного акушерства – предупреждение ПР, выявление факторов риска и проведение профилактических мероприятий. Целью данного исследования являлся поиск ассоциации полиморфных маркеров в генах цитокинов *IL-1B*, *TNF*, *IL-1RA* и *IL-4* с риском развития ПР. Проспективное исследование проведено у 108 беременных женщин с угрозой ПР. Основную группу составили 66 женщин, у которых беременность закончилась ПР, несмотря на проводимую терапию. В группу сравнения вошли 42 женщины, у которых беременность завершилась своевременными родами. Доминантный аллель Т гена цитокина *IL-1B* +3953С→Т (rs1143634) в 7,6 раза чаще встречался у женщин с ПР относительно группы сравнения (36,4 и 4,8%; RR = 1,802; 95% CI = 1,420–2,288; $p < 0,05$), при этом его гомозиготная форма была выявлена только у пациенток с ПР, а беременность прерывалась в очень ранние сроки – до 26 недель. Наличие доминантного аллеля 2R гена антагониста рецептора IL-1 (*IL-1RA* (VNTR)) в 1,5 раза чаще отмечено у женщин с ПР относительно группы сравнения (63,6 и 42,8%; RR = 1,400; 95% CI = 1,009–1,943; $p < 0,05$). Полученный результат позволяет достоверно считать, что выявление доминантного аллеля 2R *IL-1RA* является фактором риска ПР. При этом генотип 2R/2R приводит к очень ранним, а генотип 2R/4R – к ранним ПР. Совокупность трех и/или четырех «провоспалительных» аллелей выявлена только у женщин с очень ранними ПР. Это подтверждает предположение о том, что их сочетание является крайне неблагоприятным фактором для пролонгирования беременности. Таким образом, выявление генетических особенностей иммунного статуса женщины на этапе подготовки к беременности поможет провести своевременную профилактику и лечение угрозы преждевременного прерывания беременности, что позволит снизить частоту ПР, а также перинатальную заболеваемость и смертность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: преждевременные роды, цитокины, интерлейкины IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, TNF- α , полиморфизм генов цитокинов.

DOI: 10.1134/S0320972519090069

Преждевременные роды (ПР) являются не только медицинской, но и социальной проблемой. Частота ПР составляет от 6,5% (Германия, Франция, Италия), 7,8% (Великобритания, Россия) до 12% (США). Ежегодно в мире рождается 15 млн недоношенных детей, в России – около

100 тысяч. Именно недоношенные новорожденные составляют и основную долю в структуре перинатальной смертности – 75% всех случаев мертворожденности и смерти в первую неделю жизни [1]. Среди выживших недоношенных младенцев частота тяжелой инвалидности достигает 15,4%, а серьезных нарушений развития – 14,8% [2].

ПР – это преждевременное начало сокращений матки, которые приводят к размягчению и последующему раскрытию шейки матки и преждевременному изгнанию плода. Начавшиеся ПР практически невозможно остановить. Основополагающей задачей современного акушерства является предупреждение ПР – выявление факторов риска, проведение профилактических мероприятий и своевременной терапии.

Принятые сокращения: ПР – преждевременные роды; CI – доверительный интервал (confidence interval); IL – интерлейкин; NK – естественные киллеры; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа; IL-1Ra – антагонист рецептора IL-1; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; RR – относительный риск; VNTR – переменные тандемные повторы (variable number of tandem repeats).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-321, 05.08.2019.

** Адресат для корреспонденции.

Ведущим этиологическим фактором родов, как преждевременных, так и своевременных, считается развитие воспаления в маточно-плацентарном комплексе. В наступлении родов важную роль играет выработка провоспалительных цитокинов, которые выявляются в цервикальной слизи, миометрии, плаценте, околоплодных водах, плазме крови беременных женщин и в пуповинной крови [1, 3–5].

Однако у некоторых беременных (7–10%) этот воспалительный каскад активируется преждевременно до истечения полного срока беременности. В чем причина? Считается, что в пусковых механизмах при ПР ключевую роль играют секреторные факторы врожденного иммунитета (про- и противовоспалительные цитокины, противомикробные пептиды и др.), рецепторы (toll-подобные рецепторы и др.), а также клетки врожденного иммунитета. Во время беременности в организме женщин наблюдается изменение баланса факторов адаптивного иммунитета в сторону гуморального звена. Цитокины регулируют развитие родовой деятельности, раскрытие шейки матки и разрыв плодных оболочек, что обусловлено действием провоспалительного звена. Инфекционные патогены (вирусы, бактерии, грибы, простейшие) активируют toll-подобные рецепторы, которые являются трансмембранными гликопротеинами и расположены на поверхности клетки и в ее цитоплазме. Это приводит к генерации активационного сигнала, в результате которого происходит выработка провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины, фактор некроза опухолей α (TNF- α) и др. Провоспалительные цитокины в шейке матки и активируют выработку матриксных металлопротеиназ, которые относятся к семействам цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз, способных расщеплять компоненты внеклеточного матрикса соединительной ткани. Под действием металлопротеиназ изменяется структурный состав шейки матки: уменьшается количество протеогликанов, укорачиваются и распадаются пучки коллагеновых волокон, что приводит к размягчению шейки матки и реализации ПР [3].

Однако не всегда удается выявить инфекционный агент, при этом уровень провоспалительных цитокинов у этих пациенток высокий, что, возможно, связано с повышенной выработкой данных цитокинов по другой причине (например, из-за генетически детерминированной склонности к повышенной выработке провоспалительных цитокинов в результате полиморфизма их генов) [3, 6, 7]. Известно, что TNF- α является основным провоспалительным цитокином макрофагов, нейтрофилов и естественных кил-

леров (NK). При нормально протекающей беременности концентрация TNF- α в крови обычно очень низка, но при развитии инфекционных процессов, в частности урогенитальной инфекции, уровень TNF- α резко возрастает. По данным литературы, для нормального развития беременности необходим низкий уровень TNF- α . Этот цитокин взаимодействует с рецепторами, экспрессируемыми на поверхности трофобласта, защищая его тем самым от действия клонов цитотоксических лимфоцитов матери. Однако избыточная продукция TNF- α может негативно сказываться на развитии беременности. По данным В.М. Сидельниковой (2010), уровень TNF- α в крови женщин с угрожающими ПР в III триместре почти в 9 раз выше, чем у женщин с нормально протекающей беременностью [5], а на ранних сроках беременности высокий уровень TNF- α подавляет миграцию клеток трофобласта и индуцирует апоптоз в плаценте [4].

Провоспалительный цитокин IL-1 β и антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra) также участвуют в развитии ПР. Известно, что IL-1 β – многофункциональный цитокин с широким спектром действия, играющий ключевую роль в развитии и регуляции врожденного и адаптивного иммунитета путем взаимодействия с TNF- α в иммунных реакциях [6]. Установлено, что IL-1 β опосредует возникновение системного воспалительного ответа и имеет схожие биологические эффекты с TNF- α , вызывая активацию лейкоцитов и эндотелиальных клеток, комплемента, синтез белков острой фазы воспаления [7]. Цитокин IL-1 β действует сразу на несколько типов клеток, увеличивая продукцию циклооксигеназы-2 и простагландина E2 – наиболее эффективных агентов для раскрытия шейки матки. Под действием провоспалительных цитокинов происходят изменения и в миометрии. По данным Hertelendy et al. (2002), IL-1 β и TNF- α стимулируют высвобождение арахидоновой кислоты, активируют метаболизм фосфолипидов и усиливают выработку простагландинов в миометрии [8]. Эти воздействия IL-1 β на клетки миометрия схожи с действием окситоцина, который совместно с простагландином E2 увеличивает уровень кальция в клетках миометрия, что является необходимым условием для сокращения матки.

IL-1Ra регулирует экспрессию и функциональную активность IL-1 β , главного медиатора воспаления. Дисбаланс продукции IL-1 β и IL-1Ra приводит к пролонгированию воспалительного ответа, что сопровождается поражением тканей и органов [9].

Помимо провоспалительных цитокинов, увеличение продукции которых ассоциировано с развитием ПР, есть также цитокины, выполня-

ющие «протективную» функцию. Среди них можно выделить IL-4, который является противовоспалительным цитокином. Повышенное содержание IL-4 во время беременности обеспечивает иммуносупрессию матери по отношению к развивающемуся фетоплацентарному комплексу [4, 10–12]. IL-4 может ограничивать синтез макрофагами провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 и TNF- α , а также образование высокоактивных метаболитов кислорода и азота, активирует макрофаги, индуцирует пролиферацию NK-клеток [13]. Таким образом, угнетение провоспалительного звена обеспечивает прогрессирование беременности до доношенного срока.

При угрозе ПР цитокиновый профиль изменяется на провоспалительный с минимальным содержанием противовоспалительных цитокинов.

В настоящее время активно ведется поиск маркеров развития ПР. Однако в большинстве исследований изолированное определение уровня цитокинов как биомаркеров ПР имело невысокую чувствительность и специфичность, а зачастую полученные сведения носили противоречивый характер, следствием чего стал поиск комбинации прогностических факторов.

Благодаря развитию молекулярно-генетических методов исследования ПР стали рассматриваться как осложнение беременности, обусловленное реализацией генотипа матери. Интерес многих ученых направлен на изучение генетически обусловленных особенностей риска ПР. Наибольшее число работ посвящено изучению генов провоспалительных цитокинов, таких как *IL-1B*, *IL-4* и *TNF*. Наиболее частыми изменениями структуры генов, в т.ч. генов цитокинов, являются однонуклеотидные замены SNP (single nucleotide polymorphism). Эти генетические вариации вносят важный вклад в индивидуальные особенности иммунного ответа на инфекционные заболевания, а также влияют на течение беременности и наступление родов. Большинство известных SNP генов цитокинов располагаются в регуляторных участках генов, напрямую влияют на их транскрипционную активность и, как следствие, концентрацию данного цитокина в плазме крови [14]. К настоящему времени наиболее широко изучена взаимосвязь между SNP *TNF* и ПР. Например, замена аденина на гуанин в промоторной области гена *TNF* в позиции –308 (*TNF*–308) приводит к увеличению продукции данного цитокина, следствием чего является аномальное течение воспалительной реакции. Само по себе наличие данного аллеля, независимо от гомо- или гетерозиготности, повышает риск ПР в 2 раза.

Некоторые полиморфизмы генов проявляют, напротив, протективное действие в отношении развития ПР при наличии инфекционного агента.

Механизм как активации, так и протективного действия полиморфизмов в отношении развития ПР не всегда окончательно ясен. Он может включать активацию синтеза белка, активацию промотора, снижение уровня транскрипции ингибитора какого-либо гена. В настоящее время нет единого мнения о роли полиморфизмов генов цитокинов в предрасположенности к ПР. Следует отметить, что популяционный аспект также вносит вклад в распределение аллелей и генотипов полиморфизмов генов цитокинов. С этих позиций проведение исследований по поиску ассоциаций между полиморфизмами генов цитокинов и развитием ПР является актуальной задачей современных исследований.

Нами предпринята попытка связать полиморфизмы генов цитокинов (как отдельных генов, так и их сочетаний) в генезе ранних (28–32 недели) и сверхранних ПР (до 28-й недели) для прогнозирования и предупреждения этой серьезной акушерской патологии. В связи с вышеизложенным целью данного исследования стал поиск ассоциации полиморфных маркеров в генах цитокинов *IL-1B*, *TNF*, *IL-1RA* и *IL-4* с риском развития ПР.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика клинических групп. Проспективное исследование было проведено у 108 беременных женщин с угрозой ПР. Критериями включения в исследование являлись следующие параметры: одноплодная беременность 23–36 недель; жалобы на тянущие боли в нижней части живота; укорочение шейки матки при ультразвуковом исследовании < 25 мм; информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения являлись: наличие кровянистых выделений из половых путей; беременность, наступившая в результате вспомогательных репродуктивных технологий; тяжелая соматическая патология и хронические заболевания женщины в стадии декомпенсации; хромосомные аномалии и врожденные пороки развития плода; инфекция; осложненная беременность (преэклампсия и ее осложнения, плацентарная недостаточность).

Основную группу составили 66 женщин, у которых беременность закончилась ПР, несмотря на проводимую терапию, направленную на пролонгирование беременности. В группу сравнения вошли 42 женщины, у которых беременность завершилась своевременными родами.

Всем беременным, участвующим в исследовании, проводили клинико-лабораторное обследование: сбор анамнеза, общее клиническое и специальное акушерское обследования, влагалищное исследование с определением состояния шейки матки; УЗИ с цервикометрией; оценку функционального состояния плода и характера сократительной активности матки.

В качестве потенциальных предикторов ПР был изучен полиморфизм четырех генов цитокинов, которые наследуются по аутосомно-доминантному типу: *IL-1B* +3953C→T (rs1143634), *TNF G*→A (rs1800629), *IL-1RA* (VNTR) и *IL-4* (VNTR, интрон 3). Для исследования брали соскоб со слизистой щеки, после чего выделяли геномную ДНК с помощью фенол-хлороформной экстракции [15].

Синтез *IL-1Ra* происходит за счет экспрессии гена *IL-1RA*. Полиморфные варианты генов *IL-1RA* (VNTR) и *IL-4* (VNTR, интрон 3) определяли с помощью ПЦР. В результате амплификации детектировали фрагменты ДНК различного размера. Анализ продуктов амплификации проводили в 6%-ном ПААГ, гель окрашивали бромистым этидием с визуализацией ДНК в УФ-свете и фотографировали с помощью цифровой видеокамеры (221S, «Vatec», Япония) [16, 17].

Полиморфные варианты гена *IL-1B* +3953C→T (rs1143634) и гена *TNF G*→A (rs1800629) определяли с помощью ПЦР с последующей обработкой продукта амплификации эндонуклеазой рестрикции Sfi I («СибЭнзим», Россия) и электрофореза полученных фрагментов. Реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler («Eppendorf», Австрия). Анализ продуктов гидролиза осуществляли в 7%-ном ПААГ, гель окрашивали бромистым этидием с визуализацией ДНК в УФ-свете и фотографировали с помощью цифровой видеокамеры (221S, «Vatec», Япония) [18].

Статистический анализ проводили с использованием общепринятых статистических методов в компьютерных статистических программах BioStat и Excel. Для статистической обработки результатов по качественным признакам (полиморфным маркерам — сравнение частот аллелей и генотипов) использовали два непараметрических критерия: критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Основой статистической обработки данных по полиморфным маркерам был χ^2 — анализ четырехпольных таблиц распределения аллелей, генотипов и гаплотипов в основной группе и группе сравнения. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Помимо достоверности различия частот вычисляли относительный риск (RR) и доверительный интервал (CI) [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном исследовании была проведена оценка распределения частоты аллелей гена цитокина *IL-1B* +3953C→T (rs1143634). Так, доминантный аллель T был выявлен у 36,4% женщин с ПР, а в группе сравнения — только у 4,8% пациенток ($p < 0,05$; RR = 1,802; 95% CI = 1,420–2,288). Генотип TT обнаружен только у женщин с ПР — у 9,1% пациенток ($p < 0,01$), при этом у всех этих пациенток произошли сверххранение ПР — на сроке до 26 недель беременности.

Гетерозиготная форма СТ выявлена у 27,3% женщин с ПР и только у 4,8% женщин со своевременными родами ($p < 0,01$; RR = 1,65; 95% CI = 1,298–2,098). ПР у носительниц гетерозиготы СТ происходили на сроках беременности 27–32 недели.

Генотип СС был выявлен у 63,6% женщин с ПР, произошедшими в 33–36 недель, и у 95,2% женщин со своевременными родами ($p < 0,01$; RR = 0,555; 95% CI = 0,437–0,704) (табл. 1.).

При исследовании гена *TNF G*→A (rs1800629), у которого «провоспалительным» доминантным аллелем является аллель А, нами не было выявлено гомозиготного генотипа АА. «Провоспалительный» генотип GA был обнаружен в основной группе у 18,2% беременных и только у 4,8% женщин группы сравнения ($p > 0,05$; RR = 1,492 в основной группе; 95% CI = 1,133–1,966). У женщин с наличием «провоспалительного» аллеля А ПР произошли на сроке 26–30 недель. У беременных с генотипом GG ПР произошли после 31-й недели. У 95,2% женщин со своевременными родами был выявлен гомозиготный нормальный генотип GG ($p > 0,05$; RR = 0,670; 95% CI = 0,509–0,883) (табл. 1).

Исследование полиморфизма гена антагониста рецептора интерлейкина 1 (*IL-1RA* (VNTR)) показало, что «провоспалительный» доминантный аллель 2R в 1,5 раза чаще был выявлен у женщин с ПР, чем в группе сравнения: 63,6 и 42,8% соответственно ($p < 0,05$; RR = 1,400; 95% CI = 1,009–1,943). При этом генотип 2R/2R обнаружен только у женщин с ПР — у 9,1% пациенток ($p < 0,05$; RR = 1,714; 95% CI = 1,445–2,000). Генотип 2R/24 также чаще выявлялся у беременных в группе ПР, чем в группе сравнения — 54,5 и 42,9% соответственно ($p > 0,05$).

У женщин с гомозиготной формой 2R/2R беременность завершилась на сроке до 26 недель, при гетерозиготной форме 2R/4R ПР происходили на сроке 26–31 неделя (табл. 1).

У гена цитокина *IL-4* (VNTR, интрон 3) 2R является доминантным «противовоспалительным» аллелем. При молекулярно-генетическом анализе частоты аллелей и генотипов этого гена

Таблица 1. Распределение полиморфизмов генов цитокинов у женщин с ПР (основная группа) и своевременными родами (группа сравнения)

Показатель	Основная группа	Группа сравнения	Критерий Фишера	RR	95% CI
Ген <i>IL-1B</i> +3953C→T (rs1143634)					
Аллель T	24 (36,4%)	2 (4,8%)	0,0001422927	1,802	1,420–2,288
Аллель C	42 (63,6%)	40 (95,2%)	0,0001422927	0,555	0,437–0,704
Генотип TT	6 (9,1%)	0 (0,0%)	0,0000454895	1,700	1,445–2,000
Генотип CT	18 (27,3%)	2 (4,8%)	0,0000454895	1,650	1,298–2,098
Генотип CC	42 (63,6%)	40 (95,2%)	0,0000454895	0,555	0,437–0,704
Ген <i>TNFG</i>→A (rs1800629)					
Аллель A	12 (18,2%)	2 (4,8%)	$p > 0,05$	1,492	1,133–1,966
Аллель G	54 (81,8%)	40 (95,2%)	$p > 0,05$	0,670	0,509–0,883
Генотип GA	12 (18,2%)	2 (4,8%)	$p > 0,05$	1,492	1,133–1,966
Генотип GG	54 (81,8%)	40 (95,2%)	$p > 0,05$	0,670	0,509–0,883
Генотип AA	0 (0,0%)	0 (0,0%)			
Ген <i>IL-1RA</i>					
Аллель 2R	42 (63,6%)	18 (42,8%)	$p < 0,05$	1,400	1,009–1,943
Аллель 4R	24 (36,4%)	24 (57,2%)	$p < 0,05$	0,714	0,515–0,991
Генотип 2R/2R	6 (9,1%)	0 (0,0%)	$p < 0,05$	1,700	1,445–2,000
Генотип 2R/4R	36 (54,5%)	18 (42,9%)	$p > 0,05$	1,200	0,885–1,627
Генотип 4R/4R	24 (36,4%)	24 (57,1%)	$p < 0,05$	0,714	0,515–0,991
Ген <i>IL-4</i> (VNTR)					
Аллель 2R	24 (36,4%)	30 (71,4%)	$p < 0,01$	0,571	0,411–0,795
Аллель 3R	42 (63,6%)	12 (28,6%)	$p < 0,01$	1,750	1,257–2,435
Генотип 2R/2R	6 (9,1%)	6 (14,3%)	$p < 0,01$	0,800	0,445–1,438
Генотип 2R/3R	18 (27,3%)	24 (57,1%)	$p < 0,01$	0,589	0,403–0,861
Генотип 3R/3R	42 (63,6%)	12 (28,6%)	$p < 0,01$	1,750	1,257–2,435

выявлено, что аллель 2R в 2 раза реже встречался у женщин группы ПР, чем группы сравнения (36,4 и 71,4% соответственно; $p < 0,01$; RR = 0,571; 95% CI = 0,411–0,795). Генотип 2R/2R в 1,6 раза реже (9,1 и 14,3%; RR = 0,8; 95% CI = 0,445–1,438; $p < 0,01$), а генотип 2R/3R – в 2,1 раза реже (27,3 и 57,1%; RR = 0,589; 95% CI = 0,403–0,861; $p < 0,01$) выявлялся у женщин основной группы, чем в группе сравнения.

Но «провоспалительный» генотип 3R/3R в 2 раза чаще встречался у женщин с ПР, чем у пациенток группы сравнения (63,6 и 28,6%; RR = 1,750; 95% CI = 1,257–2,435; $p < 0,01$). У женщин с генотипом 3R/3R ПР произошли на сроке 23–30 недель, а с генотипами 2R/3R и 2R/2R – после 32 недель беременности.

На следующем этапе работы нами были проанализированы сочетания нескольких «провоспалительных» генотипов исследуемых цитокинов и исходов беременностей (табл. 2). При выявлении одного или двух аллелей провоспалительных

цитокинов не обнаружено достоверных отличий в частоте и сроках наступления ПР. Однако сочетание «провоспалительных» аллелей трех и/или четырех цитокинов было выявлено только у женщин с ПР. Сочетание трех «провоспалительных» аллелей было обнаружено у 9,1% женщин ($p < 0,05$; RR = 1,700; 95% CI = 1,445–2,000), а четырех «провоспалительных» аллелей – у 18,2% женщин группы ПР ($p < 0,01$; RR = 1,778; 95% CI = 1,490–2,121). У всех пациенток с наличием трех и/или четырех «провоспалительных» генотипов ПР были очень ранними (табл. 2).

В нашем исследовании генотип GA гена *TNFG*→A (rs1800629) всегда сочетался с наличием «провоспалительных» генотипов цитокинов *IL-1B* +3953C→T (rs1143634), *IL-1RA* (VNTR) и *IL-4* (VNTR, интрон 3). Результатом этой генетической комбинации были очень ранние ПР (до 27 недель). Также показано, что генотип TT гена *IL-1B* +3953C→T (rs1143634) всегда сочетался с присутствием «провоспалительных» ге-

Таблица 2. Распределение сочетаний «провоспалительных» генотипов и исходов беременности

Сочетание «провоспалительных» генотипов	Основная группа	Группа сравнения	Срок ПР, недели	Критерий Фишера	RR	95% CI
Нет «провоспалительных» аллелей цитокинов	12 (18,2%)	18 (42,9%)	30–36	$p < 0,01$	0,578	0,364–0,918
«Провоспалительный» аллель одного цитокина	21 (31,8%)	18 (42,9%)	30–32	$p > 0,05$	0,826	0,589–1,157
«Провоспалительные» аллели двух цитокинов	15 (22,7%)	6 (14,2%)	28–34	$p > 0,05$	1,218	0,882–1,683
«Провоспалительные» аллели трех цитокинов	6 (9,1%)	–	23–25	$p < 0,05$	1,700	1,445–2,000
«Провоспалительные» аллели четырех цитокинов	12 (18,2%)	–	24–26	$p < 0,01$	1,778	1,490–2,121

нотипов цитокинов *IL-1RA* (VNTR) и *IL-4* (VNTR, интрон 3). Исходом этой генетической комбинации были ранние ПР, наступившие при сроке беременности 23–25 недель.

Гетерозиготная форма СТ гена *IL-1B* +3953C→T (rs1143634) в 66,7% случаев сочеталась с «провоспалительными» генотипами *TNF* G→A (rs1800629) и *IL-1RA* (VNTR). Исходами этой комбинации были очень ранние ПР. Если гетерозигота СТ гена *IL-1B* +3953C→T (rs1143634) обнаруживалась одна, без сопутствующих мутаций, то у этих женщин происходили ПР на сроке 32–33 недели беременности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время проводится большое количество исследований полиморфизма генов цитокинов. Роль провоспалительных цитокинов в генезе ПР уже не вызывает сомнений. Многочисленные исследования показали, что при ПР обнаруживается повышенная концентрация провоспалительных цитокинов в околоплодных водах, плаценте, миометрии, пуповинной крови [20, 21].

Однако не до конца понятна причина повышенной выработки провоспалительных цитокинов. Одна из вероятных причин – полиморфизм генов цитокинов. При изучении полиморфизма гена *IL-1B* +3954 Yilmaz et al. (2012) показали, что среди женщин с ПР преобладал генотип ТТ гена *IL-1B*, а у недоношенных новорожденных значительно чаще встречались полиморфизмы ТТ гена *IL-1A* и ТТ гена *IL-1B* [21]. В нашем исследовании доминантный аллель Т гена цитокина *IL-1B* +3953C→T (rs1143634) в 7,6 раза чаще встречался у женщин с ПР относительно группы сравнения (36,4 и 4,8%; RR = 1,802; 95% CI = 1,420–2,288, $p < 0,05$), при этом его гомозиготная форма была выявлена только у пациенток с ПР, а беременность прерывалась в очень ранние сроки – до 26 недель. Таким образом, наличие

«провоспалительного» аллеля Т можно достоверно рассматривать как фактор риска ПР. При этом генотип ТТ приводит к очень ранним, а генотип СТ – к ранним ПР.

У гена *TNF* обнаружено несколько полиморфизмов (–237 G>A, –308 G>A, –307 G>A, –857 C>T, –863 C>A, –1032 T>C, –238 G>A, –851, –323, +691 и –376 G>A), и во многих исследованиях показана их связь с ПР [1, 21]. Было выявлено, что генотипы АА гена *TNF* –308, а также генотипы GA и АА гена *TNF* –238 чаще обнаруживаются у женщин с ПР [22, 23]. Однако такие полиморфизмы гена *TNF*, как rs1799964, rs1799724 и rs1800629, не связаны с ПР [24]. В нашем исследовании «провоспалительный» аллель А гена *TNF* (rs1800629) в 3,8 раза чаще отмечен у женщин с ПР относительно группы сравнения (18,2 и 4,8%; RR = 1,492; 95% CI = 1,133–1,966; $p > 0,05$), при этом его наличие даже в гетерозиготной форме привело к ранним ПР. Однако отсутствие достоверных различий результатов в группах также не позволяет считать выявление «провоспалительного» аллеля А гена *TNF* G→A (rs1800629) фактором риска очень ранних и ранних ПР.

В исследовании Bitner и Kalinka (2010) не было выявлено статистически достоверного преобладания «провоспалительного» аллеля 2R гена *IL-1RA* у женщин с ПР [17], однако в большинстве исследований показано, что наличие аллеля 2R достоверно повышает риск преждевременного прерывания беременности [25–27]. В нашем исследовании наличие доминантного «провоспалительного» аллеля 2R гена *IL-1RA* (VNTR) в 1,5 раза чаще отмечено у женщин с ПР относительно группы сравнения (63,6 и 42,8%; RR = 1,400; 95% CI = 1,009–1,943; $p < 0,05$). Полученный результат позволяет достоверно считать, что выявление доминантного аллеля 2R является фактором риска ПР. При этом генотип 2R/2R приводит к очень ранним, а генотип 2R/4R – к ранним ПР.

Противовоспалительный цитокин *IL-4* выполняет протективную функцию. В экстраваску-

лярном матриксе он активирует переход макрофагов в активные клетки, тем самым блокируя переход макрофагов в активную форму, что приводит к снижению воспалительной реакции [1]. Однако по данным литературы наличие генотипа *IL-4*–509C/C увеличивает риск ПР [28]. В исследовании Zhu et al. (2014) было показано, что полиморфизм гена *IL-4* в контрольном локусе ассоциирован с развитием спонтанных ПР [1]. Наличие гена *IL-4* в гомо- или гетерозиготной форме 2R/2R или 2R/3R позволяет избежать ПР. При генотипе 3R/3R не происходит выработка протективного цитокина, что приводит к преждевременному прерыванию беременности. В нашем исследовании генотип 3R/3R достоверно чаще обнаруживался в группе с ПР, чем в группе сравнения (63,6 и 28,6%; RR = 1,750; 95% CI = 1,257–2,435; $p < 0,01$). Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что выявление генотипа 3R/3R гена *IL-4* (VNTR) является достоверным фактором риска очень ранних и ранних ПР.

Сочетание «провоспалительных» генотипов нескольких цитокинов также является фактором риска ПР, т.к. приводит к повышенной выработке сразу нескольких цитокинов. В нашем исследовании такое сочетание трех и/или четырех «провоспалительных» генотипов выявлено только у женщин с очень ранними ПР, что подтверждает предположение о том, что сочетание нескольких «провоспалительных» генотипов является крайне неблагоприятным фактором для пролонгирования беременности, несмотря на проводимую терапию ПР.

Итак, проведение оценки аллельных вариантов генов цитокинов у женщин с ПР в анамнезе имеет важное прогностическое значение для последующих беременностей. Выявление генетических особенностей иммунного статуса женщины на этапе подготовки к беременности может провести своевременную профилактику и лечение угрозы преждевременного прерывания беременности, что позволит снизить частоту ПР, а также перинатальную заболеваемость и смертность.

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллективу ГБУЗ г. Москвы «ГКБ им. С.С. Юдина» Департамента здравоохранения города Москвы за содействие и поддержку в проведении исследования, а также коллективу лаборатории генетики Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова за проведение генетических исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Информированное согласие. От каждой из включенных в исследование участниц было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhu, Q., Sun, J., and Chen, Y. (2014) Preterm birth and single nucleotide polymorphisms in cytokine genes, *Transl. Pediatr.*, **3**, 120–134, doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.02.
- Payne, A.H., Hintz, S.R., Hibbs, A.M., Walsh, M.C., Vohr, B.R., Bann, C.M., and Wilson-Costello, D.E. (2013) Low-gestational-age neonates with low-grade periventricular-intraventricular hemorrhage, *JAMA Pediatr.*, **167**, 451–459, doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.866.
- Стрижаков А.Н., Белоусова В.С., Свитич О.А. (2016) Клиническое значение toll-подобных рецепторов в патогенезе преждевременных родов, *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*, **15**, 35–41, doi: 10.20953/1726-1678-2016-1-35-40.
- Амирова Ж.С. (2006) Система цитокинов у беременных с персистирующей и рецидивирующей угрозой прерывания беременности, *Вестник новых медицинских технологий*, **4**, 66–67.
- Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. (2010) *Невынашивание беременности: руководство для практикующего врача*, Москва, МИАС.
- Belfer, I., Buzas, B., Hipp, H., Dean, M., Evans, C., Lorincz, I., Max, M.B., and Goldman, D. (2004) Haplotype structure of inflammatory cytokines genes (*IL1B*, *IL6* and *TNF/LTA*) in US Caucasians and African Americans, *Genes Immun.*, **6**, 505–512, doi: 10.1038/sj.gene.6364118.
- Имангулова М.М., Бикмаева А.Р., Хуснутдинова Э.К. (2005) Полиморфизм кластера гена интерлейкина 1 у больных туберкулезом легких, *Цитокины и воспаление*, **4**, 36–41.
- Hertelendy, F., Molnar, M., and Romero, R. (2002) Interferon γ antagonizes interleukin-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human myometrial cells, *J. Soc. Gynecol. Investig.*, **9**, 215–219.
- Settin, A., Abdel-Hady, H., El-Baz, R., and Saber, I. (2007) Gene polymorphisms of $TNF-\alpha^{-308}$, $IL-10^{-1082}$, $IL-6^{-174}$, and $IL-1Ra^{VNTR}$ related to susceptibility and severity of rheumatic heart disease, *Pediatr. Cardiol.*, **28**, 363–371, doi: 10.1007/s00246-006-0002-7.
- Цыбульская О.В., Жаркин Н.А., Бурова Н.А. (2012) Современные аспекты профилактики ранней потери беременности, *Лекарственный вестник*, **6**, 3–7.
- Casart, Y., Tarrazzi, K., and Camejo, M. (2007) Serum levels of interleukin-6, interleukin-1 β and human chorionic gonadotropin in pre-eclamptic and normal pregnancy, *Gynecol. Endocrinol.*, **23**, 300–320, doi: 10.1080/09513590701327638.
- Salamonsen, L.A., Hannan, N.J., and Dimitriadis, E. (2007) Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation, *Semin. Reprod. Med.*, **25**, 437–444, doi: 10.1055/s-2007-991041.

13. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. (2005) Функциональный полиморфизм генов цитокинов регуляторных молекул воспаления, *Цитокины и воспаление*, **4**, 3–10.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984) *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*, Мир, Москва.
15. Kamenarska, Z., Dzhebir, G., Hristova, M., Savov, A., Vinkov, A., Kaneva, R., Mitev, V., and Dourmishev, L. (2014) IL-1RN VNTR polymorphism in adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus, *Dermatol. Res. Pract.*, **5**, 101–106, doi: 10.1155/2014/953597.
16. Makhlof, M.M., and Abd Elhamid, S.M. (2014) Expression of IL4 (VNTR intron 3) and IL10 (–627) genes polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura, *Lab. Med.*, **45**, 211–219, doi: 10.1309/LMB0QC5T1RXTRZQ.
17. Bitner, A., and Kalinka, J. (2010) IL-1 β , IL-6 promoter, TNF- α promoter and IL-1RA gene polymorphisms and the risk of preterm delivery due to preterm premature rupture of membranes in a population of Polish women, *J. Arch. Med. Sci.*, **6**, 552–557, doi: 10.5114/aoms.2010.14467.
18. Стентон Г. (1999) *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва.
19. Salminen, A., Paananen, R., Vuolteenaho, R., Metsola, J., Ojaniemi, M., Autio-Harjainen, H., and Hallman, M. (2008) Maternal endotoxin-induced preterm birth in mice: fetal responses in toll-like receptors, collectins, and cytokines, *Pediatr. Res.*, **63**, 280–286, doi: 10.1203/PDR.0b013e318163a8b2.
20. Макаров О.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. (2007) *Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет*, Гэотар-Медиа, Москва.
21. Yilmaz, Y., Verdi, H., Taneri, A., Yazici, A.C., Ecevit, A.N., Karakas, N.M., Tarcan, A., Haberal, A., Ozbek, N., and Atac, F.B. (2012) Maternal-fetal proinflammatory cytokine gene polymorphism and preterm birth, *DNA Cell Biol.*, **31**, 92–97, doi: 10.1089/dna.2010.1169.
22. Moura, E., Mattar, R., de Souza, E., Torloni, M.R., Goncalves-Primo, A., and Daher, S. (2009) Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth, *J. Reprod. Immunol.*, **80**, 115–121, doi: 10.1016/j.jri.2008.11.007.
23. Harper, M., Zheng, S.L., Thom, E., Klebanoff, M.A., Thorp, J., Sorokin, Y., Varner, M.W., Iams, J.D., Mercer, B.M., Rouse, D.J., Ramin, S.M., and Anderson, G.D. (2011) Cytokine gene polymorphisms and length of gestation, *Obstet. Gynecol.*, **117**, 125–130, doi: 10.1097/AOG.0b013e318202b2ef.
24. Jones, N.M., Holzman, C., Friderici, K.H., Jernigan, K., Chung, H., Wirth, J., and Fisher, R. (2010) Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery, *J. Reprod. Immunol.*, **87**, 82–89, doi: 10.1016/j.jri.2010.06.158.
25. Heinzmann, A., Mailaparambil, B., Mingirulli, N., and Krueger, M. (2009) Association of interleukin-13/–4 and toll-like receptor 10 with preterm births, *Neonatology*, **96**, 175–181, doi: 10.1159/000210091.
26. Genc, M.R., Gerber, S., Nesin, M., and Witkin, S.S. (2002) Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **187**, 157–163.
27. Kalish, R.B., Vardhana, S., Gupta, M., Chasen, S.T., Perni, S.C., and Witkin, S.S. (2003) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and multifetal pregnancy outcome, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **189**, 911–914, doi: 10.5114/aoms.2010.14467.
28. Murtha, A.P., Nieves, A., Hauser, E.R., Swamy, G.K., Yonish, B.A., Sinclair, T.R., and Heine, R.P. (2006) Association of maternal IL-1 receptor antagonist intron 2 gene polymorphism and preterm birth, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **195**, 1249–1253, doi: 10.1016/j.ajog.2006.09.002.

THE POLYMORPHISM OF THE CYTOKINE GENES *IL-1B*, *TNF*, *IL-1RA*, AND *IL-4* SIGNIFICANTLY INCREASES THE RISK OF PRETERM BIRTH

V. S. Belousova^{1*}, O. A. Svitich², E. V. Timokhina^{1*}, A. N. Strizhakov¹, and I. M. Bogomazova¹

¹ *Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, 119991 Moscow, Russia; E-mail: desdemosha@mail.ru; elena.timokhina@mail.ru*

² *Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, 105064 Moscow, Russia*

Received November 19, 2018

Revised April 11, 2019

Accepted May 21, 2019

Premature birth is not only a medical, but also a social problem. The global goal of medicine is to prevent preterm labor, identify risk factors and take preventive measures. The objective of this study was to search for the association of polymorphic markers in the cytokine genes *IL-1B*, *TNF*, *IL-1RA*, *IL-4* with the risk of preterm labor. A prospective study included 108 pregnant women with the risk of premature labor. The main group consisted of 66 women whose pregnancy ended by preterm labor despite the prophylactic therapy. The control group included 42 women with term delivery. The dominant T allele of the cytokine IL-1 β gene was 7.6 times more common in women with preterm labor than in control group (36.4 and 4.8%; RR = 1.802; 95% CI = 1.420–2.288; $p < 0.05$); at that its homozygous form was detected only in patients with preterm labor, and the pregnancy was terminated at a very early time – up to 26 weeks. The dominant proinflammatory allele 2R of the IL-1 receptor antagonist gene (*IL-1Ra*) was 1.5 times more common in women with preterm labor than in control group (63.6 and 42.8%; RR = 1.400; 95% CI = 1.009–1.943; $p < 0.05$). At that the 2R/2R genotype leads to very early preterm labor, and the 2R/4R genotype leads to early preterm labor. The combination of three and/or four “proinflammatory” alleles was detected only in women with very early preterm labor, confirming that such combinations is extremely unfavorable factor for prolong pregnancy. Thus, identification of the genetic polymorphisms of interleukins at the periconceptional stage will be helpful for the prevention of preterm birth and for the reducing perinatal morbidity and mortality.

Keywords: preterm labor, cytokines, IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-4, TNF- α interleukins, cytokine gene polymorphism