

МРНТИ 76.03.39

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО ПРЕРЫВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

В.Б.Ткаченко, И.И. Воробьева, Н.Я. Скрипченко, С.Н.Толкач,
А.А. Живецкая-Денисова, Т.С. Наквасюк

Национальная академия медицинских наук Украины ГУ «Институт педиатрии,
акушерства и гинекологии им. акад. Е.М. Лукьяновой НАМН Украины»
Украина, Киев

АННОТАЦИЯ

АКТУАЛЬНОСТЬ

Изучение механизмов регуляции врожденного иммунитета играет решающую роль в понимании патогенеза преждевременного прерывания беременности.

Цель исследования: изучить роль функциональных полиморфизмов G753A в гене TLR2, C399T в гене TLR4 и G2848A в гене TLR9 в развитии невынашивания беременности у женщин украинской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ образцов ДНК проведен у 139 женщин украинской нации: 39 беременных с невынашиванием беременности и 100 с физиологическим течением беременности. Проводилось генотипирование по полиморфным маркерам: TLR2 (G753A), TLR4 (C399T), TLR9 (G2848A). Использованы мультипликативная и общая модели наследования.

Результаты: Показано, что при невынашивании аллель А гена TLR 2 повышает шанс на развитие прерывания беременности в 10,76 раз, генотип GA в 11,31; для аллели Т гена TLR4 это значение составляет 1,75, для генотипа СТ – 2,74; для аллели А гена TLR9 показатель отношения шансов составляет 2,44, для генотипа GA – 2,20. Выводы. Исследование генетических особенностей факторов врожденного иммунитета у женщин украинской нации показало, что носительство аллели А генов TLR2 и TLR9 и аллели Т гена TLR4 увеличивает риск преждевременного прерывания беременности.

Ключевые слова: НЕВЫНАШИВАНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ, ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА, АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, ГЕНОТИП.

Актуальность исследования. В период беременности происходит выраженная перестройка иммунной системы матери на уровне всего организма, в том числе и в зоне развития зародыша [1]. В последние годы уделяется большое внимание изучению роли провоспалительных и противовоспалительных реакций в патогенезе преждевременного прерывания беременности и реализации внутриутробного инфицирования [2].

Факторы врожденного иммунитета распознают присутствующие микроорганизмам молекулярные структуры, которые обозначаются термином патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Примерами таких структур могут быть компоненты бактериальных клеток: липополисахариды грамотрицательных бактерий, пептидогликаны и липотейхоевая кислота грамположительных бактерий и др. Эти структуры распознаются специальными клеточными рецепторами [3].

Доказано, что нарушение механизмов регуляции врожденного иммунитета играет решающую роль в развитии патологических процессов, при которых воспаление является ключевым фактором патогенеза, в том числе, и при преждевременном прерывании беременности [4]. Известно, что угнетение специфических иммунных реакций компенсируется усилением факторов врожденного

иммунитета. Эта система является первой линией иммунологической защиты от патогенов и реализует защитную функцию путем дифференцировки собственных молекул. Патогенные факторы могут проникать в матку вследствие несостоятельности защитных механизмов, которые в норме защищают плод от инфицирования. Первичный воспалительный ответ при этом, опосредован специфическими Toll-подобными рецепторами (TLRs), которые являются связующими между врожденной и адаптивной звеньями иммунной системы [5]. Поддерживая чрезмерную активацию (Th1)-профиля цитокинов, эта система стимулирует преимущество провоспалительные цитокины и инициирует хронизацию воспалительного процесса. Каждый конкретный Toll-подобный рецептор играет важную роль в быстром распознавании специфических микробных компонентов, включая бактерии, грибы, вирусы и некоторые простейшие [6].

Роль Toll-подобных рецепторов в период беременности изучена недостаточно. Установлено, что в норме при беременности TLR2 и TLR4 экспрессируются клетками синцитиотрофобласта и промежуточного трофобласта, которые взаимодействуют с микроорганизмами в зоне имплантации и способны к запуску иммунного ответа [7]. Таким образом, патогенные микроорганизмы, ко-

торые достигли децидуальной оболочки, представляют угрозу для плода. Установлено, что TLR2 и TLR4 экспрессируются как на клеточной поверхности, так и внутри клетки и располагаются преимущественно на материнской поверхности трофобласта, что обеспечивает более быстрый иммунный ответ в случае микробной агрессии матери [8]. Активация TLR4 липополисахаридами бактерий в I триместре приводит к активации противовоспалительных цитокинов в клетках трофобласта. При активации TLR2 увеличивается содержание интерлейкина (ИЛ)- 6 и ИЛ- 8. В целом стимуляция Toll-подобных рецепторов в клетках трофобласта, по данным некоторых исследований, приводит к увеличению продукции цитокинов, миграции иммунных клеток, что вызывает активацию провоспалительных реакций, приводящих к преждевременному прерыванию беременности [9].

С одной стороны, TLRs в трофобласте позволяет координировать местный иммунный ответ и способствовать формированию плаценты, с другой стороны - TLRs опосредует распознавание плацентой "сигналов опасности" и изменения иммунного ответа, результатом чего могут быть негативные последствия для беременности и ее преждевременное прерывание в разные сроки [10].

Цель исследования: изучить роль функциональных полиморфизмов G753A в гене TLR2, C399T в гене TLR4 и G2848A в гене TLR9 в развитии невынашивания беременности у женщин украинской популяции.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ образцов ДНК от 39 беременных женщин с невынашиванием (первая, основная группа) и 100 женщин с

физиологическим течением беременности (второй группа, контрольная), проживающих в центральном регионе Украины. Для установления влияния воспалительных реакций в патогенезе невынашивания беременности проводилось генотипирование промоторных участков по следующим полиморфным маркерам: G753A - для TLR 2, C399T - для TLR 4, G2848A - для TLR 9. Генетические исследования проведены в ГУ «Референс центр молекулярной диагностики МЗ Украины». Вероятность различия абсолютных величин признаков устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента, степень согласованности измерений в двух иерархиях и выявление различий в распределении признаков проводили с помощью критерия Пирсона. Достоверной признавали разницу при $p < 0,05$. Использовали мультипликативную и общую математические модели наследования.

Результаты исследования. Анализ исследований генотипа и аллельного полиморфизма G753A гена TLR2 среди обследованных женщин 1-й (основная) и 2-й (контрольной) группы представлены в таблице 1. Распределение частот генотипов TLR2 в контрольной группе составил: GG - 99%, GA - 1% AA - 0%. В группе женщин с невынашиванием беременности (случай) - GG - 89,7%, GA - 10,3%, AA - 0%. То есть, носителей гетерозигот в гене TLR2 в группе женщин с преждевременным прерыванием беременности больше, чем в контроле, ($p < 0,05$).

Данные о распределении частот аллелей и генотипов, согласно мультипликативной и общей модели наследования представлены в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 1. - Общая характеристика генотипов и аллелей гена TLR2

Аллель и генотип		Случай	Контроль	Итого
Аллель	G	74	199	
Аллель	A	4	1	
Генотип	G/G	35	99	134
Генотип	G/A	4	1	5
Генотип	AA	0	0	0
Итого		39	100	

Таблица 2. - Мультипликативная модель наследования аллельного полиморфизма гена TLR2 (тест χ^2 , $df = 2$)

Аллель	Случай n = 39	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
Аллель G	0.949	0.995	6.81	0,009	0.09	0.01 -85.03
Аллель A	0.051	0.005			10.76	1.18 - 97.81

Таблица 3. - Общая модель наследования генотипов гена TLR2 (тест χ^2 , $df = 2$)

Генотипы	Случай n = 39	Контроль n = 24	χ^2	p	OR	
					значение	95% CI
Генотип G/G	0.897	0.990	6.93	0,03	0.09	0.01 - 0.82
Генотип G/A	0.103	0.010			11.31	1.22 - 104.70
Генотип A/A	0.000	0.000			2.54	0.05 - 130.46

Согласно полученным данным относительный риск (OR) развития угрозы преждевременного прерывания у носителей аллели А увеличивает OR до 10,76; у носителей генотипа АА составляет 2,54; у носителей генотипа GA - 11,31, а для GG респондентов - 0,09.

Таким образом, носительство мутантной аллели обладает предиктор привычного невынашивания беременности. Замена аминокислоты (G) на (A) в положении 753 (G / A) приводит к нарушению функции проведения сигнала TLR2 от пептидогликана, липопротеинов, линолейковой кислоты и других структур инфекционного фактора, способствующего распространению инфекции при недостаточной активности местного иммунитета.

Исследование распределения аллельных вариантов полиморфизма гена TLR4 (C399T) показало, что частота

генотипа C/C в контрольной группе составило 95% C/T - 4% и T/T -1%. В группе беременных с невынашиванием - соответственно 89,7%, 10,3 и 0% (таблица 4).

Как видно из таблицы 4, дикий генотип встречался в 95% случаев у здоровых беременных, частота гетерозиготного генотипа составляла 4%, а гомозиготный генотип по мутантным аллелям наблюдался лишь у 1% женщин контрольной группы. В группе женщин с невынашиванием частота генотипа C/C составляла 89,7% C/T-10,3%, а T/T 0%.

Исходя из полученных данных о распределении частот, относительный риск (OR) развития угрозы преждевременного прерывания у носителей генотипа C/C равна - 0,46, у носителей генотипа C/T - 2,74, а для генотипа T/T - 0,09, (таблица 5 и 6).

Таблица 4. - Общая характеристика генотипов и аллелей гена TLR2

Аллель и генотип		Случай	Контроль	Итого
Аллель	С	74	194	
Аллель	Т	4	6	
Генотип	С/С	35	95	130
Генотип	С/Т	4	4	8
Генотип	Т/Т	0	1	1
	Итого	39	100	

Таблица 5. - Мультипликативная модель наследования аллельного полиморфизма гена TLR-4 (тест χ^2 , $df = 2$)

Аллель	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 39	n = 100			значение	95 % CI
С	0.949	0.970	0,73	0.39	0.57	0.16 – 2.09
Т	0.051	0.030			1.75	0.48 – 6.37

Таблица 6. - Общая модель наследования генотипов гена TLR-4 (тест χ^2 , $df = 2$)

Генотип	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 39	n = 100			значение	95 % CI
С/С	0.897	0.950	2,38	0.30	0.46	0.12 – 1.81
С/Т	0.103	0.040			2.74	0.65 – 11.56
Т/Т	0.000	0.010			0.84	2.03 – 21.05

При сравнении частот генотипов полиморфизма TLR4 (C399T) у обследованных женщин выявлены достоверная связь наличия мутантной аллели Т и самопроизвольных выкидышей в анамнезе. Так относительный риск развития преждевременного прерывания беременности при наличии аллели Т - составляет 1,75. А у носителей гетерозиготного генотипа СТ - относительный риск повышается почти в три раза и составляет 1,74.

Распространенность и вклад полиморфных вариантов гена TLR9 (G2848A) в развитии преждевременного прерывания беременности была следующей: у здоровых женщин гомозиготный G/G полиморфизм составил 60%, G/A-26%, A/A - 14%. У беременных с невынашиванием генотип G/G - имел место у 30,8% G/A - 43,6%, A/A - 25,6%, (таблица 7).

Исследование распределения аллельных вариантов полиморфизма гена TLR9 (G2848A) показало, что у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе преобладают гетерозиготные и гомозиготные варианты генотипа: G/A и A/A. Относительный риск для носительниц аллели А составляет 2,44, что достоверно выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). Исходя из полученных данных о распределении частот генотипов у обследованных женщин, относительный риск (OR) развития угрозы прерывания беременности у носителей генотипа G/G равен - 0,30, у носителей генотипа G/A - 2,20, а для генотипа A/A - 2.12 (таблица 8 и таблица 9).

Как видно из таблицы 8, носителей мутантной аллели среди женщин основной группы (0,474) было вдвое больше, чем в контрольной (0,270), ($p < 0,05$).

Таблица 7. - Общая характеристика генотипов та аллелей гена TLR9

Аллель и генотип		Случай	Контроль	Итого
Аллель	G	41	146	
Аллель	A	37	54	
Генотип	G/G	12	60	72
Генотип	G/A	17	26	43
Генотип	A/A	10	14	24
	Итого	39	100	

Таблица 8. - Мультипликативная модель наследования аллельного полиморфизма гена TLR9 (тест χ^2 , $df = 2$)

Аллель	Число наблюдений n = 39	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
					значение	95 % CI
G	0.526	0.730	10.24	0.001	0.41	0.24 – 0.71
A	0.474	0.270			2.44	1.42 – 4.20

Таблица 9. - Общая модель наследования генотипов гена TLR9 (тест χ^2 , $df = 2$)

Генотип	Число наблюдений n = 39	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
					значение	95 % CI
Генотип G/G	0.308	0.600	9.64	0.008	0.30	1.13 – 0.65
Генотип G/A	0.436	0.280			2.20	1.01 – 4.77
Генотип A/A	0.256	0.140			2.12	0.85 – 5.28

Носителей гомозиготного генотипа по мутантным аллелям встречались чаще среди женщин с невынашиванием беременности (25,6%), чем среди здоровых беременных (14%).

Таким образом, можно сделать вывод, что аллель A гена TLR9 (G2848A) увеличивает риск развития невынашивания беременности.

Анализ полученных результатов показал, что относительный риск развития преждевременного прерывания беременности у беременных носителей генотипов A / G и A / A гена TLR9 (G2848A) - увеличивается соответственно в 2,20 и 2,12 раза. Относительный риск у обладателей дикой аллели составил 0,41, для женщин с мутантным геном A этот показатель равен 2,44.

Анализ полученных результатов показал, что относительный риск (OR) развития преждевременного прерывания беременности у носителей аллели G составляет 0,41 (95% CI 0,24-0,71), а при аллели A он увеличивается в два раза и составляет 2,44 (95% CI 1,42-4,20) и у носителей генотипов G / и A / A - OR составляет соответственно - 2,20 и 2,12.

Обсуждение. Как известно развитие инфекционных осложнений является одной из причин преждевременного прерывания беременности. Таким образом, отсутствие адекватного ответа на инфекцию может быть следствием носительства определенной аллели.

Аллель A и генотип G/A гена TLR2 (G753A) можно считать маркерами предрасположенности к развитию преждевременного прерывания беременности

инфекционного генеза у женщин украинской нации.

Наличие хотя бы одной полиморфной аллели T (носители генотипов C/T) гена TLR4 указывает на возможную ассоциацию с преждевременным прерыванием беременности. Мутация в гене TLR4 меняет экстрацеллюлярный домен, который отвечает за связывание молекулярных паттернов патогенов и обуславливает снижение ответа на липополисахаридные комплексы, что приводит к выборочному нарушению защитных реакций организма против грамотрицательных бактерий [90].

Исследование роли гена TLR9 (G2848G) показало, что носительство мутантной аллели A как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии может приводить к преждевременному прерыванию беременности. Аллель A полиморфного маркера TLR9 (G2848G) способствует повышению транскрипционной активности гена и, как следствие, приводит к увеличению продукции цитокинов и хемокинов, задействованных в механизмах невынашивания. В результате проведенного исследования генотипов и аллельного полиморфизма TLR9 в основной группе значение OR для аллели A гена TLR9 составляет 2,44, генотипа GA – 2,20.

Данные исследования генотипов и аллельного полиморфизма генов TLR2, TLR4 и TLR9 у всех беременных украинской нации с невынашиванием и физиологическим течением гестации обнаружены TLRs-рецепторы как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии. При носительстве указанных полиморфизмов генов TLRs-рецепторов риск преждевременного прерывания бе-

ременности в отдельных случаях возрастает от 1,5 до 11,35 раз.

Вероятно, действие рецепторов в условиях патологического процесса обусловлено генетически детерминированной особенностью TLR-рецепторов и изменением передачи сигнала от него в клетку. Вследствие этого цитокиновый дисбаланс запускает воспалительный процесс, который занимает ведущее место среди звеньев патогенеза преждевременного прерывания беременности.

Выводы. Исследование генетических особенностей факторов врожденного иммунитета у женщин украинской нации в развитии преждевременного прерывания беременности показало, что отсутствие адекватного ответа на инфекцию с развитием провоспалительных

реакций является следствием особенностей регуляции полиморфных вариантов G753A в гене TLR2, C399T в гене TLR4 и G2848A в гене TLR9.

Согласно мультипликативной и общей модели наследования относительный риск (OR) развития угрозы преждевременного прерывания у носителей генотипа AA полиморфного маркера TLR2 (G753A) составляет 2,54; у носителей генотипа GA - 11,31,

Аллель T полиморфного маркера TLR4 (C399T) повышает риск развития преждевременного прерывания беременности в 1,75 раз, генотип CT в 2,74 раза.

Аллель A полиморфного маркера TLR9 (G2848G) повышает риск развития преждевременного прерывания беременности в 2,44, генотип GA - 2,20 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Well G.J., Daalderop L.A., Wolfs T., Kramer B. Mol Cell Pediatr. - 2017.- № 4.- P. 4.
2. Subramaniam A., Abramovici A., Andrews W.W., Tita A.T. Infect. Dis. Obstet. Gynecol. - 2012. - p. 157-159.
3. Choi S.J., Jung S.H., Eom M., Han K.H., Chung I.B., Kim S.K. J Obstet Gynaecol Res.- 2012.- №38(1).- p. 108-112.
4. Grimstad F., Krieg S. J Assist Reprod Genet.- 2016.- №33(7):833-847.
5. Lashkari B. S., Shahana S., Anumba D. O. Journal of reproductive immunology.-2015.- Vol. 107.- P. 43-51.
6. Duriez M., Quillay H., Madec Y., El Costa H., Cannou C., Marlin R. Front Microbiol.- 2014.- № 5.- P. 316.
7. Schatz F., Kayisli U.A., Vatandaslar E., Ocak N., Guller S., Abrahams V.M., Krikun G., Lockwood C.J. Am J Reprod Immunol.- 2012.- № 68(2).- P. 146-153.
8. Moço N.P., Martin L.F., Pereira A.C., Polettini J., Peraçoli J.C., Coelho K.I., da Silva M.G. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.- 2013.-№171(1).- p.12-17.
9. Mor G., Kwon J. American Journal of Obstetrics and Gynecology.- 2015.- № 213 (4).- S. 131.
10. Kumar N., Nandula P., Menden H., Jarzembowski J., Sampath V. J Matern Fetal Neonatal Med.- 2017.- №30(13). - P.1588-1595.

SUMMARY

GENETIC FEATURES OF FACTORS OF INNATE IMMUNITY IN THE DEVELOPMENT OF PREMATURE TERMINATION OF PREGNANCY

Tkachenko V.B., Vorobyeva I.I., Skripchenko N.Ya., Tolkach S.N., Zhivetskaya-Denisova A.A., Nakvasnyuk T.S.

National Academy of Medical Sciences of Ukraine State Institution "Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician E.M. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine"
Ukraine, Kyiv

RELEVANCE

Studying the mechanisms of regulation of innate immunity plays a crucial role in understanding the pathogenesis of miscarriage. Objective: to study the role of functional polymorphisms G753A in the TLR2 gene, C399T in the TLR4 gene and G2848A in the TLR9 gene in the development of miscarriage in women of the Ukrainian population.

MATERIALS AND RESEARCH METHODS

DNA samples were analyzed in 139 women of the Ukrainian nation: 39 pregnant women with miscarriage and 100 pregnant women with physiological pregnancy. Genotyping by polymorphic markers was performed: TLR2 (G753A), TLR4 (C399T), TLR9 (G2848A). The multiplicative and general models of inheritance are used.

RESULTS

It was shown that when miscarriage of the A allele of the TLR 2 gene is shown to increase the chance of developing termination of pregnancy by 10.76 times, the GA genotype by 11.31; for the T allele of the TLR4 gene, this value is 1.75; for the CT genotype, 2.74; for the TLR9 gene A allele, the odds ratio is 2.44; for the GA genotype, 2.20.

FINDINGS

A study of the genetic characteristics of innate immunity factors in women of the Ukrainian nation showed that the carriage of the A allele of the TLR2 and TLR9 genes and the T allele of the TLR4 gene increases the risk of premature termination of pregnancy.

Key words: miscarriage, factors of congenital immunity, allelic polymorphism, genotype.

ТҮЙІНДЕМЕ

ЖҮКТІЛІКТІҢ МЕРЗІМІНЕН БҰРЫН ТОҚТАТЫЛУЫНЫҢ ДАМУЫНДАҒЫ ТУА БІТКЕН ИММУНИТЕТ ФАКТОРЛАРЫНЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

В.Б. Ткаченко, И.И. Воробьева, Н.Я. Скрипченко, С.Н. Толкач,
А.А. Живецкая-Денисова, Т.С. Наквасюк

«Педиатрия, акушерия және гинекология институты» мемлекеттік мекемесі
Академик Е.М. Лукьянов атындағы Украинаның МҒҰА»

Өзектілік. Туа біткен иммунитетті реттеу механизмін зерттеу жүктіліктің мерзімінен бұрын тоқтатылуының патогенезін түсінуде маңызды рөл атқарады.

Зерттеудің мақсаты: TLR2 геніндегі G753A, TLR4 геніндегі C399T және TLR9 геніндегі G2848A функционалды полиморфизмдердің украин халқының әйелдерінде жүктіліктің соңына дейін жетіспеуінің дамуындағы рөлін зерттеу.

Материалдар мен зерттеу әдістері. Украин ұлтының 139 әйелінде ДНҚ сынамалары алынды: жүктілігі соңына дейін жетпеген 39 әйел және физиологиялық жүктілігі бар 100 жүкті әйел. Полиморфты маркерлермен генотиптеу жүргізілді: TLR2 (G753A), TLR4 (C399T), TLR9 (G2848A). Мұрагерліктің мультипликативті және жалпы модельдері қолданылады.

Нәтижелер: Жүктіліктің болмауы кезінде TLR 2 аллелі жүктіліктің тоқтатылуын 10,76 есеге, GA генотипін 11,31-ге арттыратынын көрсетті. TLR4 генінің T аллелі үшін бұл мән 1,75 құрайды; CT генотипі үшін - 2,74; TLR9 генінің A алласы үшін, коэффициенттер коэффициенті - 2,44; GA генотипі үшін - 2.20.

Қорытындылар. Украин ұлтындағы әйелдерде туа біткен иммунитет факторларының генетикалық сипаттамаларын зерттеу TLR2 және TLR9 гендерінің A аллелін және TLR4 генінің T аллелін тасымалдау жүктіліктің мерзімінен бұрын тоқтатылу қаупін арттыратынын көрсетті.

Түйін сөздер: жүктіліктің соңына дейін жетпеуі, туа бітті иммунитеттің факторлары, аллельді полиморфизм, генотип.

Контактная информация:

Ткаченко Виктория Борисовна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник отдела научных проблем невынашивания беременности ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии им. акад. Е.М.Лукьяновой НАМН Украины». г. Киев, 04050, ул. Платона Майбороды, 8

Тел. (+38044) 483-80-59, Viber 0633416440,
e-mail: mdviktoriiaatkachenko@gmail.com ORCID 0000-0001-6622-9324
