

ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В., ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ГЕЛЬНЕР Н.В.

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України"

Україна, 79000, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а, e-mail:root@ihp.lviv.ua

АСОЦІАЦІЯ МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ ПОЛІМОРФІЗМАМИ ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ ІЛ-10 ТА РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ У ЖІНОК

Роботи останніх років [1, 2] засвідчують, що продукція цитокінів знаходиться під генетичним контролем, і жінки з репродуктивними втратами мають генетичну предриспованість до типу імунної відповіді, яка власне відповідає за втрату вагітності. Цитокіни індують зміни в експресії генів в клітинах-мішенях і діють як імуномодулятори [3, 4]. Вони впливають на репродукцію безпосередньо через втручання в процеси гаметогенезу, імплантацію, інвазію трофобласта, децидуалізацію, розвиток плаценти та імунотолерантність вагітності. Th1-цитокіни опосередковують цитотоксичну, запальну та ембріотоксичну реакцію, Th2-цитокіни через гуморальний імунітет запобігають Th1-відповіді проти зародка [5, 6]. Отже, протікання вагітності залежить від типу та концентрації цитокінів, вони можуть як охороняти плід, так і впливати пагубно на нього.

Серед Th2-цитокінів ключову роль відіграє ІЛ-10. Підтримуючи Th2-цитокінове оточення, він є критичним цитокіном для пролонгування вагітності. Ген ІЛ-10 локалізований на хромосомі 1 в регіоні 1q31-q32, в промоторній ділянці якого (пІЛ-10) знаходиться багато SNP (single-nucleotide polymorphisms), котрі і забезпечують рівень його продукції. Найбільш дослідженими є SNP –1082 G→A, –819 T→C та –592 A→C. Результати по асоціації алельних поліморфізмів SNP з рівнем продукції ІЛ-10, отримані різними авторами [7, 8], неоднозначні, відповідно, такого роду дослідження є актуальними.

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP –819 T→C та –592 A→C промоторної ділянки гена ІЛ-10 в групі жінок з непліддям.

Матеріал і методи

Матеріалом для дослідження була ДНК, виділена з периферійної крові жінок з непліддям, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр. Обстежено 22 жінки з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ), 41 жінка з первинним непліддям (ПН) та 106 жінок контрольної групи без обтяженого акушерсько-генетичного анамнезу, котрі мають не менше двох здорових дітей.

Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно методу, описаного Giorgani L. et al. [9] з використанням реактивів "МВІ Fermentas". Детекція проводилася методом ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Eam1401 ("МВІ Fermentas") згідно інструкцій фірми-виробника. Фрагменти ПЛР-продукту, отримані методом ПДРФ, розділяли у агарозному гелі (3%, 0,5 мг

бромистого етидію). Отримані дані піддавались обробці методами варіаційної статистики: визначали критерій Пірсона χ^2 [10].

Результати та обговорення

Вивчали розподіл та частоти алелів, гаплотипів та генотипів SNP – 1082 G→A –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у жінок з первинним непліддям (вагітність не наступала протягом щонайменше 2-х років), з навиковим невиношуванням вагітності (щонайменше 2-о разове переривання вагітності до 12 тижнів вагітності) у порівнянні з контрольною групою жінок без обтяженого генетично-акушерського анамнезу, які мають щонайменше 2-х здорових дітей. За допомогою критерію Пірсона χ^2 були виділені групи алелів, які володіли позитивною, чи негативною асоціацією з обстеженими групами (непліддям, чи невиношуванням вагітності).

Результати вивчення частот алелів низької (А) та високої (G) експресії 1082 G→A гена ІЛ-10 засвідчили, що співвідношення частот А- та G-алелів в групі з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ) становило 38,6% до 61,4% алелей. Таким чином, обстежувана група жінок характеризувалася суттєво підвищеною частотою алелі G (61,4%) SNP –1082 G→A, тобто алелі високої експресії гена ІЛ-10 в порівнянні з алелем А (38,6%) — низька експресія гена ІЛ-10. Слід зазначити, що ці дані діаметрально протилежно відрізняються від показників контрольної групи, де підвищена частота належала алелі А (55%), а алель G характеризувалася заниженою частотою (45%). Оцінювання вірогідності відмінностей показників контрольної групи від обстежуваної групи з ННВ підтвердили статистично вірогідну різницю, а саме, заниження частоти алелі А та підвищення частоти G-алелі ($\chi^2 = 4,98$, $p < 0,05$).

В групі з первинним непліддям (ПН) встановлені показники не досягали вірогідно значимої різниці, порівняно з контролем. В групі подружніх пар з ПН, як і в контрольній групі, з найвищою частотою зустрічається АG генотип (45%, помірної експресії гена ІЛ-10). Цей факт засвідчує відмінність групи жінок з ПН з групою жінок з НВ, де найвищою частотою характеризувався генотип GG (45,7%, генотип високої експресії гена ІЛ-10).

Отримані результати також засвідчили, що у жінок з ПН частота алелів Т та А SNP –819 T→C та –592 A→C, які відносять до алелів “низької” експресії ІЛ-10, складає 25,6% при контрольних показниках — 24,1%, а частота алелю С (алель “високої” експресії ІЛ-10) складає 74,4% при 75,9 — відсотковій частоті в контролі.

Тобто, за частотами алелів SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 жінки з первинним непліддям не відрізняються від контрольної групи жінок. Окрім того, як видно з представлених результатів і нами перевірено в повторних досліджах, відзначається зчеплена залежність між алелем А –592 A→C та алелем Т –819 T→C, а також між алелями С цих двох локусів.

У групі жінок з ННВ за розподілом алелів відзначено вірогідно значиму різницю у порівнянні з контрольною групою. Частота алелю С у жінок з ННВ перевищувала 90%, відповідно частота алелів низької експресії ІЛ-10

A і T SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 складала 9,1% при 24,1% в контролі. Оцінюючи асоціативні зв'язки між ННВ та частотами алелів А і Т SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10, встановлена вірогідна відмінність показників контрольної групи від обстежуваної групи з ННВ, а саме, занижена частота алелі А і Т та підвищена частота С-алелі ($\chi^2 = 4,84$, $p < 0,05$).

Вірогідно значима різниця між контрольною групою жінок та групою жінок із ранніми перериваннями вагітності (ННВ) зафіксована при співставленні гапло- та генотипів SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у цих групах. АА/ТТ — генотип “низької” експресії ІЛ-10 не зустрічався в дослідній групі взагалі при 1,9 — відсотковій частоті в контролі. Частота генотипу СС/СС “високої” експресії ІЛ-10 вірогідно перевищувала контрольні показники ($\chi^2 = 5,9$ $p < 0,05$). Генотип АС/ТС “помірної” експресії ІЛ-10 в досліді був вірогідно знижений у порівнянні з контролем ($\chi^2 = 5,9$ $p < 0,05$).

Жінки з ПН практично не відрізнялися від контрольної групи за гаплотипами та генотипами. Вірогідна різниця порівняно з контролем виявлена лише стосовно генотипу “низької” експресії (АА/ТТ).

Отже, підсумовуючи вище сказане, ми згідні з іншими дослідниками, що ІЛ-10 має вплив на розвиток плоду [11, 12, 13], а його генетичне регулювання виглядає ключем до розвитку успішної вагітності. Результати, представлені нами в цій праці принципово співпадають з результатами D'Alfonso et al. [14] щодо сильнішої лінійної залежності між –1082А/С, –819Т/С і –592А/С SNPs та трьома гаплотипами (АСС, АТА, ССС) при ННВ. Слід особливо наголосити, що за нашими даними група жінок з ННВ принципово відрізняється від групи жінок з ПН по розподілі та частоті алелів, гаплотипів та генотипів SNP –1082А/С, –819 Т→С та –592 А→С, а це опосередковано підтверджує тезу, що саме при ННВ може запускатися так звана “материнська імунна відповідь на плід” через генетично обумовлені порушення цитокінового статусу у жінки.

Висновки

1. Алельний поліморфізм SNP 1082 G→A –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у жінок з первинним непліддям не відрізняються від контрольної групи жінок.

2. Вірогідно значима різниця між контрольною групою жінок та групою жінок із навиковим невиношуванням вагітності зафіксована при співставленні частоти та розподілу алелів, гапло- та генотипів SNP –1082 G→A –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у цих групах.

3. Підтримується теза, що при навиковому невиношуванні вагітності може запускатися так звана “материнська імунна відповідь на плід” через генетично обумовлені порушення цитокінового статусу у жінки.

Література

1. Zammitti W., Mтираoui N., Kallel C. et al. A case-control study on the association of idiopathic recurrent pregnancy loss with autoantibodies against b2-glycoprotein I and annexin V // *Reproduction*.— 2006.— N131.— P. 817–822.

2. D'Alfonso S., Rampi M., Rolando V. et al. New polymorphisms in the IL-10 promoter region // *Genes Immun*.— 2000.— N1.— P. 231–233.

3. *Medica I., Ostojic S, Perez N. et al.* Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage — a meta-analysis // *Reproductive BioMedicine Online.*— 2009.— Vol.19.— N3.— P. 406–414.
4. *Parham P.* *The Immune System / Garland Publishing.* — London.— 2000.— 171 p.
5. *Заставна Д.В.* Інтерферонові показники у вагітних жінок на різних термінах вагітності // *Педіатрія, акушерство та гінекологія.*— 2000.— №1.— С. 72–74.
6. *Hales D.B.* *Cytokines and testicular function.*— Wiley-Liss.— New York.— 2000.— 305 p.
7. *Kwak-Kim J.Y., Gilman-Sachs A., Kim C.E. et al.* Thelper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures // *Chem Immunol Allergy.*— 2005.— N88.— P. 64–79.
8. *Prigoshin N., Tambutti M., Larriba J. et al.* Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause // *Am J. Reprod Immunol.*— 2004.— N52.— P. 36–41.
9. *Giordani L., Bruzzi P., Lasalandra C.* Association of breast cancer and polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α genes // *Clin. Chem.*— 2003.— Vol.49.— P. 1664–1667.
10. *Певницкий Л.А.* Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // *Вестник АМН СССР.*— 1988.— №7.— С. 48–51.
11. *Costeas P. A., Koumouli A., Giantsiou-Kyriakou A. et al.* Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss // *Hum Immunol.*— 2004.— N65.— P. 135–141.
12. *Crilly A., Hamilton J., Clark C.J. et al.* Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis // *Rheumatology (Oxford).*— 2003.— N42.— P. 1295–1298.
13. *Temple S.E., Lim E., Cheong K.Y., Almeida C.A., Price P., Ardlie K.G. and Waterer G.W.* Allele carried at positions-819 and -592 of the IL-10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with streptococcus pneumoniae // *Immunogenetics.*— 2003.— N55.— P. 629–632.
14. *D'Alfonso S.* New polymorphisms in the IL-10 promoter region / *S. D'Alfonso, M. Rampi, V. Rolando, [et al.] // Genes Immun.*— 2000.— N1.— P. 231–233.

Резюме

Вивчали особливості розподілу поліморфних варіантів SNP 1082 G \rightarrow A -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C промоторної ділянки гена ІЛ-10 в групі жінок з непліддям. Встановлено, що вірогідно значиме підвищення частоти GG/CC/CC-генотипу високої експресії ІЛ-10 є прогностично негативним маркером протікання вагітності. Припускаємо, що ІЛ-10 може бути задіяний в патогенезі навикового невиношування вагітності.

Изучали нуклеотидные полиморфизмы SNP 1082 G \rightarrow A -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C промоторного участка гена ИЛ-10 в группе женщин с бесплодием. Установлено, что достоверно повышенная частота генотипа GG/CC/CC-генотипа высокой экспрессии ИЛ-10 является негативным маркером для течения беременности. Допускаем, что ИЛ-10 может быть задействован в патогенезе привычного невынашивания беременности.

We studied the SNP 1082 G \rightarrow A -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C of the gene IL-10 promoter region in infertility women. It was confirmed, that increase of high expression CC-genotypes SNP -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C пІЛ-10 was prognostically unfavourable for running of pregnancy. It is expected, that IL-10 gene may be active in pathogenesis of accustomed miscarriages.

ФЕДОТА А. М., ГАВИЛЕЙ Н. С., ПОЛТАВСКАЯ А. Ю.

*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы 4, e-mail: afedota@mail.ru*

ГЕНОДЕРМАТОЗЫ КАК МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОТЯГОЩЕННОСТИ ПОДРАЗДЕЛЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИНФРАСТРУКТУРЫ

Исследования украинских популяций начались в начале 90-х годов XX века, когда были получены первые данные про генетико-демографическую структуру и особенности генетических процессов в харьковской популяции [1]. Генетико-демографические исследования малых городов и сел Восточной Украины в конце 90-х годов XX века показали увеличение коэффициента инбридинга, изоляции расстоянием по сравнению с 60–80-ми годами XX века [2]. Поскольку сельское население составляет более 30% населения Украины, понимание особенностей генетической структуры и направление генетических процессов в сельских популяциях имеет существенное значение для генетического мониторинга и генетического прогнозирования, для анализа природы генетического груза, в частности, груза наследственных болезней, представляющего угрозу генетической безопасности населения.

По данным ряда авторов, сопоставление таких важных в медико-генетическом отношении популяционных характеристик, как отягощенность ее наследственной патологией и подразделенность популяции, имеет серьезные методические сложности. Большинство подходов к оценке генетических параметров популяции рассчитаны на работу в элементарной, менделеевской, относительно небольшой популяции, тогда как сбор сведений о частоте и распространенности наследственной патологии в силу редкости каждой отдельной нозологической единицы часто проводится в крупной популяции [3].

Во избежание описанных выше методических сложностей, в данной работе авторы предполагают проанализировать влияние различных элементов и объектов инфраструктуры на подразделенность малочисленных популяций, и, соответственно, на отягощенность популяций моногенной патологией, используя в качестве “сторожевых” фенотипов моногенные генодерматозы, распространенность которых оценивалась в исследуемых популяциях.

Моногенные дерматозы, например, различные формы ихтиоза, буллезного эпидермолиза, в первом приближении не используются в качестве “сторожевых” или “индикаторных” фенотипов для оценки динамики параметров генетического груза [4] в силу невысокой распространенности в популяциях, трудностей ее оценки в связи с необходимостью высококвалифицированного подхода при диагностике различных форм этих патологий. Однако авторы данной работы предлагают показать приемлемость генодерматозов, при соблюдении вышеописанных условий, в качестве маркеров при исследовании генетической структуры, в данном случае подразделенности популяции, для оценки степени генетической безопасности населения.