

Імуногенетичні чинники розвитку передчасного розриву плодових оболонок при недоношеній вагітності в Запорізькій області

К. С. Любомирська

Запорізький державний медичний університет, Україна

Мета роботи – дослідити однонуклеотидний поліморфізм генів прозапальних цитокінів *IL1β* (rs 1143627) і *TNFα* (rs 1800629) і визначити рівень мРНК генів *IL1β* та *IL17A* на місцевому рівні при передчасному розриві плодових оболонок (ПРПО) в терміні гестації 26–34 тижні в популяції Запорізького регіону.

Матеріали та методи. Дослідили маркери генів цитокінів у 50 жінок із ПРПО в терміні гестації 26–34 тижні та 50 вагітних із фізіологічним перебігом вагітності та терміновими пологами без ускладнень. Генотипування за допомогою TaqMan проб виконали на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Для визначення рівня мРНК генів прозапальних цитокінів *IL1β* (NM_000576.2) та *IL17A* (NM_002190.2) використовували метод ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ) і набір реактивів Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific, США).

Результати. Не вдалось виявити статистично значущі відмінності за кожним генотипом поліморфізму rs1143627 (GG, GA та AA) гена *IL1β* між основною групою дослідження та групою контролю ($\chi^2 = 0,18$, OR (GG) = 1,13; 95 % CI: 0,65–1,98; OR (GA) = 1,54; 95 % CI: 0,68–3,49; OR (AA) = 0,89; 95 % CI: 0,50–1,55 відповідно, $p > 0,05$). Між основною та групою контролю за всіма алелями поліморфізму rs1800629 (AA, GG та AG) гена *TNFα* спостерігали тенденцію, що не набула статистичної значущості – $\chi^2 = 0,44$, OR (AA) = 0,8; 95 % CI: 0,42–1,54; OR (GG) = 1,25; 95 % CI: 0,65–2,39; та OR (AG) = 0,67; 95 % CI: 0,28–1,62 відповідно, $p > 0,05$. Діапазон усіх значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена *IL1β* у плаценті становив 1,43–227,93 (mean – 25,08), у плодових оболонках – 1,23–139,24 (mean – 23,83). Розмах значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена *IL-17A* був меншим, ніж *IL1β* та у плаценті становив 1,15–62,76 (mean – 5,69), у плодових оболонках – 1,63–130,67 (mean – 19,31).

Висновки. У популяції Запорізького регіону відсутня вірогідна клінічна асоціація між генами *IL1β* (rs1143627) та *TNFα* (rs1800629) і високим ризиком розвитку передчасного розриву плодових оболонок при недоношеній вагітності. Метод ЗТ-ПЛР-РЧ дав змогу виявити імуноопосередковані ланки розвитку ПРПО в плаценті та плодових оболонках у терміні гестації 26–34 тижні, а саме значне зростання транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів *IL1β* та *IL17A*.

Ключові слова:

передчасні пологи, передчасний розрив плодових оболонок, однонуклеотидний поліморфізм генів, транскрипційна активність генів.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 3(44). – С. 309–318

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.3.151725

E-mail: lubomirskaa@gmail.com

Иммуногенетические факторы развития преждевременного разрыва плодных оболочек при недоношенной беременности в Запорожской области

Е. С. Любомирская

Цель работы – исследовать однонуклеотидный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов *IL1β* (rs1143627) и *TNFα* (rs 1800629) и определить уровень мРНК генов *IL1β* и *IL17A* на местном уровне при преждевременном разрыве плодных оболочек (ПРПО) в сроке гестации 26–34 недели в популяции Запорожского региона.

Материалы и методы. Исследовали маркеры генов цитокинов у 50 женщин с ПРПО в сроке гестации 26–34 недели и 50 беременных с физиологическим течением беременности и срочными родами без осложнений. Генотипирование с помощью TaqMan проб проводили на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc», США). Для определения мРНК генов провоспалительных цитокинов *IL1β* (NM_000576.2) и *IL17A* (NM_002190.2) использовали метод ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) и набор реактивов Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific, США).

Результаты. Не удалось установить статистически значимые различия по каждому генотипу полиморфизма rs1143627 (GG, GA и AA) гена *IL1β* между основной группой исследования и группой контроля ($\chi^2 = 0,18$, OR (GG) = 1,13; 95 % CI: 0,65–1,98; OR (GA) = 1,54; 95 % CI: 0,68–3,49; и OR (AA) = 0,89; 95 % CI: 0,50–1,55 соответственно, $p > 0,05$). Между основной и группой контроля по всем аллелям полиморфизма rs1800629 (AA, GG и AG) гена *TNFα* наблюдали тенденцию, которая не достигла статистической значимости – $\chi^2 = 0,44$, OR (AA) = 0,8; 95 % CI: 0,42–1,54; OR (GG) = 1,25; 95 % CI: 0,65–2,39; OR (AG) = 0,67; 95 % CI: 0,28–1,62 соответственно, $p < 0,05$. Диапазон всех полученных значений относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *IL1β* в плаценте составил 1,43–227,93 (mean – 25,08), в плодных оболочках – 1,23–139,24 (mean – 23,83). Размах значений относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *IL-17A* в плаценте составлял 1,15–62,76 (mean – 5,69), в плодных оболочках – 1,63–130,67 (mean – 19,31).

Выводы. В популяции Запорожского региона отсутствует достоверная клиническая ассоциация между генами *IL1β* (rs1143627) и *TNFα* (rs1800629) и высоким риском развития преждевременного разрыва плодных оболочек при недоношенной беременности. Метод ОТ-ПЦР-РВ позволил установить иммуноопосредованные звенья развития ПРПО на местном уровне в сроке гестации 26–34 недели в виде значительного роста транскрипционной активности генов провоспалительных цитокинов *IL1β* и *IL17A*.

Ключевые слова:

преждевременные роды, преждевременный разрыв плодных оболочек, транскрипционная активность генов.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 3(44). – С. 309–318

Key words:

preterm labor,
preterm premature
rupture of fetal
membranes,
single nucleotide
polymorphism,
trans-activation
genetic.

Pathologia

2018; 15 (3), 309–318

Immunogenetic factors for the development of premature rupture of membranes in preterm labour in Zaporizhzhia region

K. S. Liubomyrska

Aim. To study single nucleotide polymorphism of proinflammatory cytokine genes IL1 β (rs1143627) and TNF α (rs1800629) and determine mRNA level of IL1 β IL17A genes at the local level in PROM during 26–34 weeks of pregnancy in the population of Zaporizhzhia region.

Materials and methods. Cytokine gene markers were studied in 50 women with PROM in gestational age of 26–34 weeks and 50 pregnant women with physiological pregnancy and term labor without complications. Genotyping with TaqMan samples was performed on CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems amplifier (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). For determination of mRNA level of proinflammatory cytokine genes IL1 β (NM_000576.2) and IL17A (NM_002190.2) PCR in real time and the Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix reagent kit (ThermoScientific, USA) were used.

Results. We were unable to identify statistically significant differences for each of the rs1143627 polymorphism genotypes (GG, GA and AA) of the IL1 β gene between the main study group and the control group ($\chi^2 = 0.18$, OR (GG) = 1.13; 95 % CI: 0.65–1.98; OR (GA) = 1.54; 95 % CI: 0.68–3.49; and OR (AA) = 0.89; 95 % CI: 0.50–1.55, respectively, $P > 0.05$). Between the main and control groups, including all alleles of the rs1800629 polymorphism (AA, GG and AG) of the TNF α gene there was a tendency that didn't become of statistical significance – $\chi^2 = 0.44$, OR (AA) = 0.8; 95 % CI: 0.42–1.54; OR (GG) = 1.25; 95 % CI: 0.65–2.39; and OR (AG) = 0.67; 95 % CI: 0.28–1.62, respectively, $P < 0.05$. The range of all obtained values of the relative normalized expression of IL1 β gene mRNA in placenta was 1.43–227.93 (mean – 25.08), in fetal membranes – 1.23–139.24 (mean – 23.83). The range of relative normalized expression of mRNA of the IL-17A gene in placenta was 1.15–62.76 (mean – 5.69), in fetal membranes – 1.63–130.67 (mean – 19.31).

Conclusions. In the population of Zaporizhzhia region, there is no reliable clinical association between the IL1 β (rs1143627) and TNF α (rs1800629) genes and a high risk of developing premature rupture of the membranes in preterm pregnancy. PCR in real time allowed to identify the immune-mediated level of the development of PROM at the local level in the gestation period of 26-34 weeks as great increased genes transcriptional activity of pro-inflammatory cytokines IL1 β and IL17A.

Незважаючи на те, що багато наукових колективів в Україні та за її межами працюють над розв'язанням проблеми передчасних пологів, частота їх реєстрації в різних регіонах країни коливається в межах від 3 % до 12 %. У структурі невиношування вагітності (НВ) передчасні пологи (ПП) посідають особливе місце, оскільки є однією з основних причин перинатальної смертності та захворюваності новонароджених (75 % випадків припадає на передчасно народжених дітей).

Останніми роками для розробки генетичної платформи персоналізованої медицини велику увагу приділяють асоціативному пошуку поліморфних маркерів генів цитокінів із комплексними фенотипами захворювань різної етіології [1]. Здійснюють наукові дослідження, що присвячені вивченню імунного статусу, генетичних мутацій у вагітних із передчасним розривом плодкових оболонок (ПРПО) як фактора ініціації ПП [3].

Загальними біологічними шляхами, які відіграють важливу роль у патогенезі передчасних пологів, є інфекції та запалення, активація гіпоталамо-гіпофізарної функції у матері та плода, децидуальні дефекти та патологічне перерозтягнення матки. Передчасні пологи мають багатофакторне походження, та часто декілька систем в організмі взаємодіють і збільшують ризик їх розвитку. За оцінками інших дослідників, тільки 50 % передчасних пологів можна пояснити конкретним фактором, а решта залишаються ідіопатичними.

Найпрогресивіші медичні видання світу з високим impact-factor мають лавиноподібний потік публікацій, що присвячені цій проблемі [4,5]. Але більшість досліджень є суперечливими, і це демонструє важливість стандартизованих методів і репродуктивних технологій, а також потребує точного оцінювання отриманих результатів. Крім того, чимала частина виявлених у фаховій літературі невідповідностей може бути пов'язана з відмінностями в генетичному фоні, впливом

довкілля, а також параметрів, які різняться в окремих популяціях, як-от культурологічні, соціально-економічні та середовищні чинники, що визначаються стилем життя загалом і стилем харчування зокрема [5].

Секвенування генома людини та відкриття явища однонуклеотидного поліморфізму (single nucleotide polymorphism – SNP) генів стало зорею вивчення впливу генетичного коду на кількісні зміни експресії та наступне біологічне функціонування білків. Більшість SNP генів цитокінів знаходяться в регуляторних ділянках гена та безпосередньо впливають на їхню транскрипційну активність і концентрацію цитокіну у крові. Ці генетичні варіації впливають на індивідуальні особливості імунної відповіді при ПП і ПРПО [2,6].

Відомості про поліморфізм сигнальних молекул при ПРПО при недоношеній вагітності нечисленні, тому наукова робота в цьому напрямі може забезпечити ресурси для аналізу поліморфних маркерів в асоціативних дослідженнях, поглибити уявлення про імунну ланку патогенезу ПРПО та ПП, розробити генетичну платформу персоналізованої медицини та нові ефективні методи прогнозування таких ускладнень вагітності.

Мета роботи

Дослідити однонуклеотидний поліморфізм генів прозапальних цитокінів IL1 β (rs1143627) та TNF α (rs1800629) і визначити рівень мРНК генів IL1 β і IL17A на місцевому рівні при ПРПО в терміні гестації 26–34 тижні в популяції Запорізького регіону.

Матеріали і методи дослідження

Проаналізували перебіг вагітності, пологів і перинатальних наслідків, дослідили маркери генів цитокінів

у 50 жінок із ПРПО в терміні гестації 26–34 тижні та 50 вагітних із фізіологічним перебігом вагітності та терміновими пологоми без ускладнень, розроджених на базі Запорізького обласного перинатального центру у 2015–2017 рр.

Для генотипування використали зразки тотальної ДНК людини, яку виділяли з цільної крові згідно з інструкцією виробника за допомогою комплексу реагентів «ДНК-експрес-кровь-плюс» («Литех», РФ). Генотипування за допомогою TaqMan проб виконали на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для TaqMan генотипування виконали за інструкцією Applied Biosystems, США.

Для аналізу транскрипційної активності генів прозапальних цитокинів IL1 β (NM_000576.2) та IL17A (NM_002190.2) використовували також метод ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ) і набір реактивів Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific, США). Об'єкт дослідження – плацента та плодові оболонки, фіксовані в нейтральному формаліні. Тотальну РНК виділяли з використанням набору «NucleoZOL» (Macherey-Nagel, ФРН). Для цього попередньо відмиті від формаліну шматочки плаценти та плодових оболонок гомогенізували (100 мг тканини/1 мл «NucleoZOL»). Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у 3 повторях. Визначення мРНК досліджуваних генів виконали з розрахунком відносної нормалізованої кількості кДНК досліджуваних генів, коли дані контрольної групи брали як «1», а результати досліджуваної групи визначали відносно показників контрольної. Нормалізацію відносної кількості кДНК виконали за методом $\Delta\Delta C_t$ із референс-геном гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Дослідження здійснили на базі відділу молекулярно-генетичних досліджень Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету.

Статистичне опрацювання даних виконали за допомогою пакета програм Statistica 13.0. (StatSoft Software № JPZ8041382130ARCN10-J) за загальноприйнятою методикою. Якісні показники порівнювали за допомогою критерію χ^2 з поправкою Йейтса та точного критерію Фішера (F). Для оцінювання внеску поліморфізму генів у вірогідність розвитку ПРПО при недоношеній вагітності розраховували відношення шансів (ВШ – odds ratio – OR) із визначенням 95 % довірчого інтервалу (ДІ – CI). Дані, що отримали, наведені як кількість спостережень (n), середнє арифметичне величини (mean), стандартна помилка середньої ($\pm m$), відносні величини (абс., %), рівень статистичної значущості (p). Відмінність вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Нормальність розподілу кількісних ознак оцінювали за допомогою критеріїв Шапіро–Уїлка та Колмогорова–Смірнова. Статистичні характеристики між групами порівнювали з використанням непараметричного критерію Mann–Whitney U test.

Результати

За результатами генотипування поліморфізму rs1143627 гену IL1 β у вагітних основної групи дослі-

дження гомозиготи GG виявили в 12 (24 %) випадках основної групи дослідження, гетерозиготи GA – у 21 (42 %), гомозиготи AA – у 17 (34 %) випадках відповідно. Досліджуючи поліморфізм rs1143627 гену IL1 β у вагітних контрольної групи, гомозиготи GG визначили у 13 (26 %) випадках, гетерозиготи GA – у 16 (32 %), гомозиготи AA у 21 (42 %) випадках (рис. 1, 2).

Розподіл алелів поліморфізму rs1800629 гену TNF α у вагітних основної групи дослідження: гомозиготи AA визначені у 5 (10 %) випадках, гетерозиготи AG – у 12 (24 %), гомозиготи GG у 33 (66 %) випадках. Під час дослідження поліморфізму rs1800629 гену TNF α у вагітних контрольної групи гомозиготи GG визначили у 29 (58 %) випадках, гетерозиготи AG – у 16 (32 %), гомозиготи AA – у 5 (10 %) випадках (рис. 1, 2).

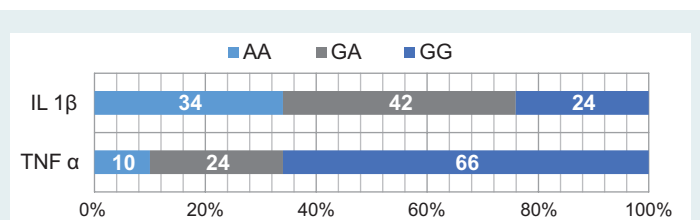


Рис. 1. Розподіл генотипів при передчасному розриві плодових оболонок при недоношеній вагітності (%).

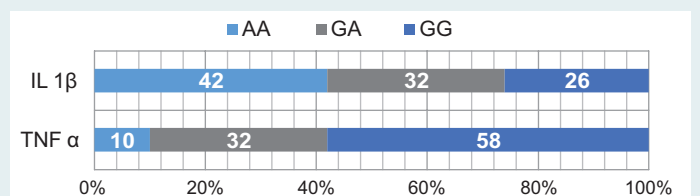


Рис. 2. Розподіл генотипів імунорегуляторних генів у групі контролю (%).

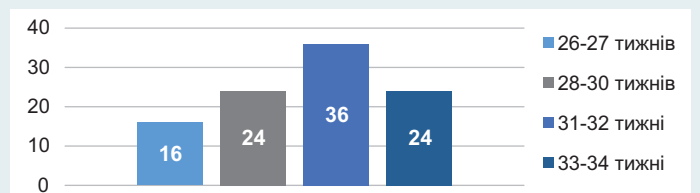


Рис. 3. Поділ вагітних (%) залежно від терміну маніфестації ПРПО.

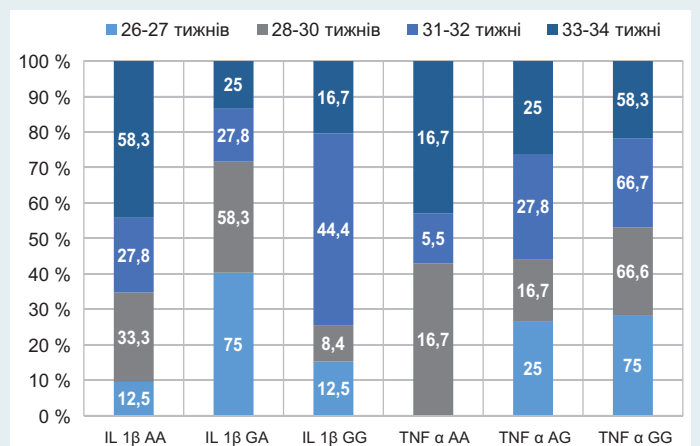


Рис. 4. Розподіл генотипів (%) залежно від терміну маніфестації ПРПО.

Таблиця 1. Асоціація поліморфізму генів цитокінів із ПРПО та передчасними пологами в запорізькій популяції

SNPs	Апель / Генотип	Public location	OR	95 % CI	χ^2	p
<i>IL1β</i> rs1143627	Allele G	112836810	1,13	0,65–1,98	0,18	0,67
	Genotype GA		1,54	0,68–3,49		
	Allele A		0,89	0,51–1,55		
<i>TNFα</i> rs1800629	Allele A	31575254	0,8	0,42–1,54	0,44	0,51
	Genotype AG		0,67	0,28–1,62		
	Allele G		1,25	0,65–2,39		

Критерій включення в основну групу дослідження – передчасний розрив плодових оболонок у 26–34 тижні гестації з ініціацією надалі передчасних пологів. Поділ вагітних залежно від терміну маніфестації ПРПО наведений на рис. 3, з якого видно, що найбільшим (36 %) був відсоток вагітних у терміні 31–32 тижні гестації.

Аналізуючи дані репертуару генотипів досліджуваних прозапальних цитокінів *IL1 β* (rs1143627) та *TNF α* (rs1800629) залежно від терміну виникнення ПРПО,

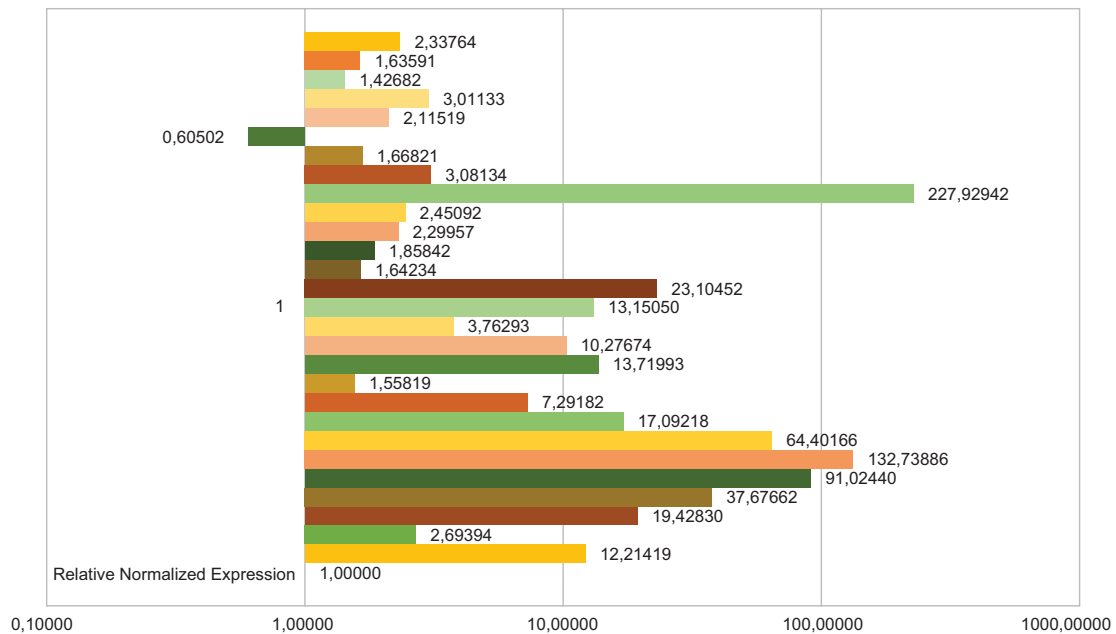


Рис. 5. Відносна нормалізована експресія mRNA прозапального цитокіну *IL1 β* у плаценті у вагітних із передчасним розривом плодових оболонок при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном GAPDH).

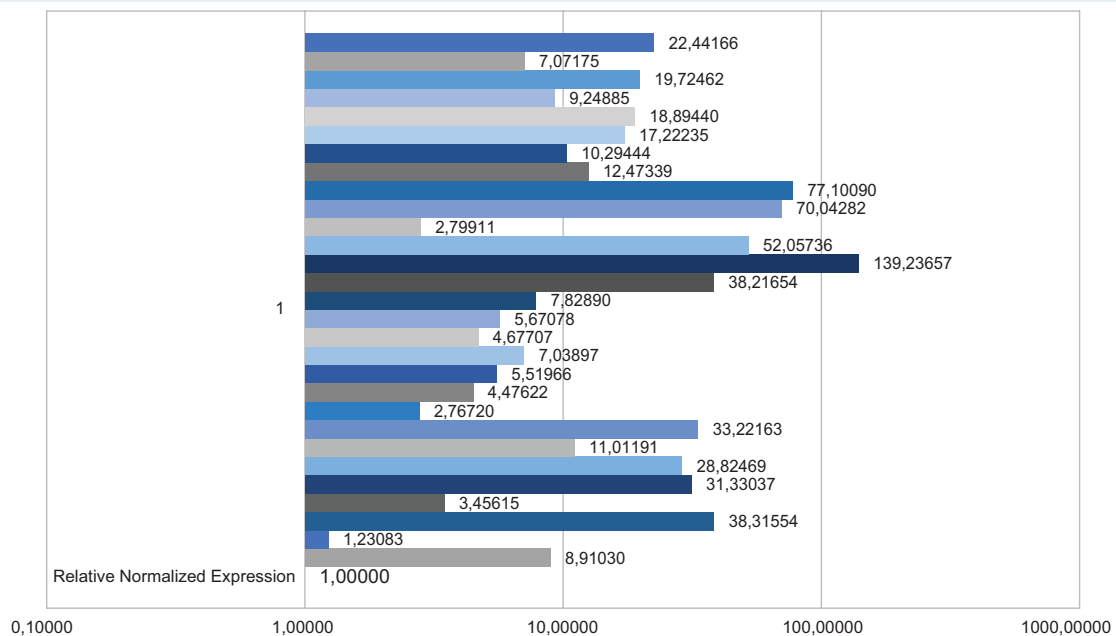


Рис. 6. Відносна нормалізована експресія mRNA прозапального цитокіну *IL1 β* у плодових оболонках у вагітних із передчасним розривом плодових оболонок при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном GAPDH).

виявлено: у 26–27 тижнів гестації у вагітних із ПРПО несприятливими генотипами, що лідирують, – по 75 % – були GA IL1 β і GG гена TNF α (рис. 4). У терміні маніфестації ПРПО 28–30 тижні репертуар несприятливих генотипів, які лідирують, був тим самим – GA IL1 β (58,3 %) та GG гена TNF α (66,6 %). Генотипи GG IL1 β (rs1143627) і GG TNF α (rs1800629) були несприятливими у вагітних в 31–32 тижні – 44,4 % та 66,7 % відповідно. В 33–34 тижні вагітності генотипами, що лідирують, – по 58,3 % – були гомозиготи AA IL1 β та GG TNF α .

Не вдалося виявити статистично значущі відмінності за кожним генотипом поліморфізму rs1143627 (GG, GA та AA) гена IL1 β між основною групою дослідження та групою контролю ($\chi^2 = 0,18$, OR (GG) = 1,13; 95 % CI: 0,65–1,98; OR (GA) = 1,54; 95 % CI: 0,68–3,49; OR (AA) = 0,89; 95 % CI: 0,50–1,55 відповідно, $p > 0,05$).

Між основною та групою контролю за всіма алелями поліморфізму rs1800629 (AA, GG та AG) гена TNF α спостерігали тенденцію, що не набула статистичної значущості – $\chi^2 = 0,44$, OR(AA) = 0,8; 95 % CI:

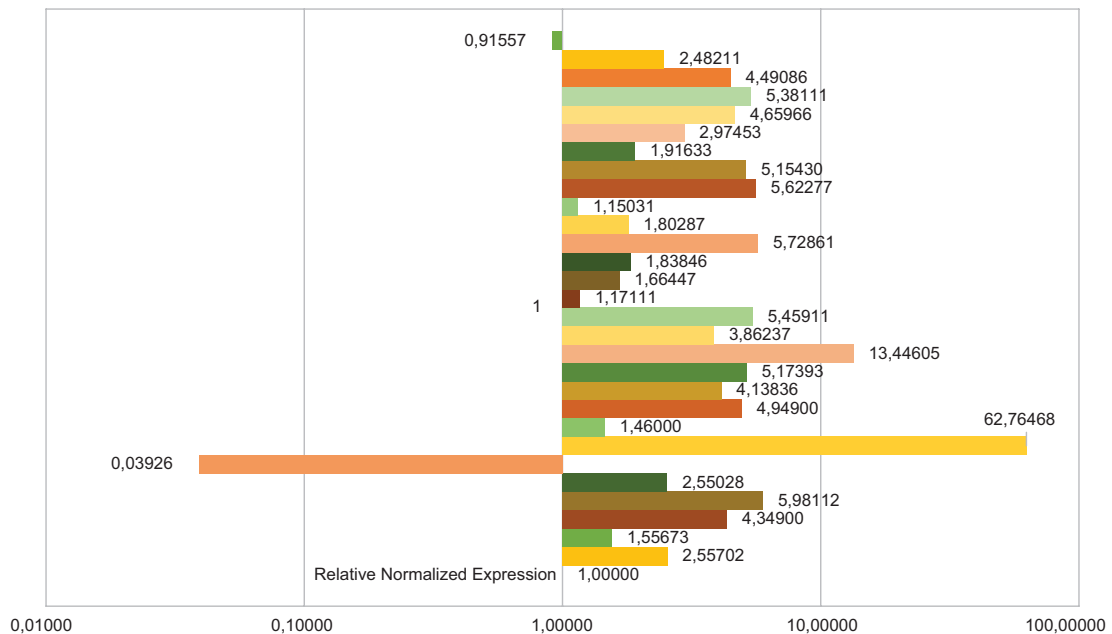


Рис. 7. Відносна нормалізована експресія mRNA прозапального цитокіну IL 17A в плаценті у вагітних із передчасним розривом плодових оболонок при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном GAPDH).

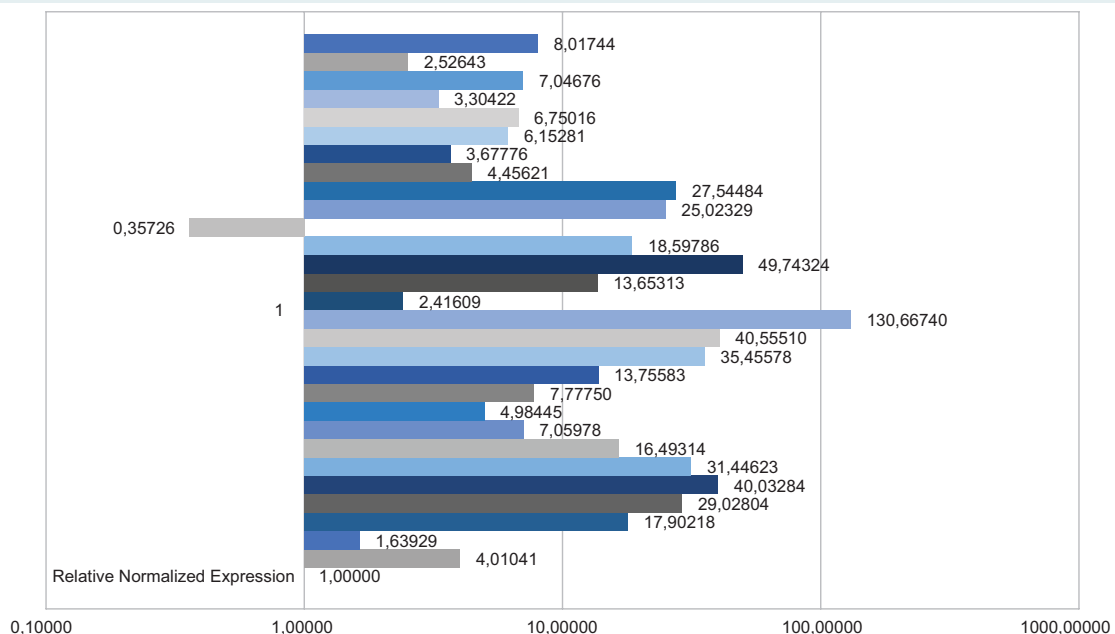


Рис. 8. Відносна нормалізована експресія mRNA прозапального цитокіну IL 17A в плодових оболонках у вагітних із передчасним розривом плодових оболонок при недоношеній вагітності (fold-change, нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ із референс-геном GAPDH).

IL1b/IL17A mRNA expression heat maps plot

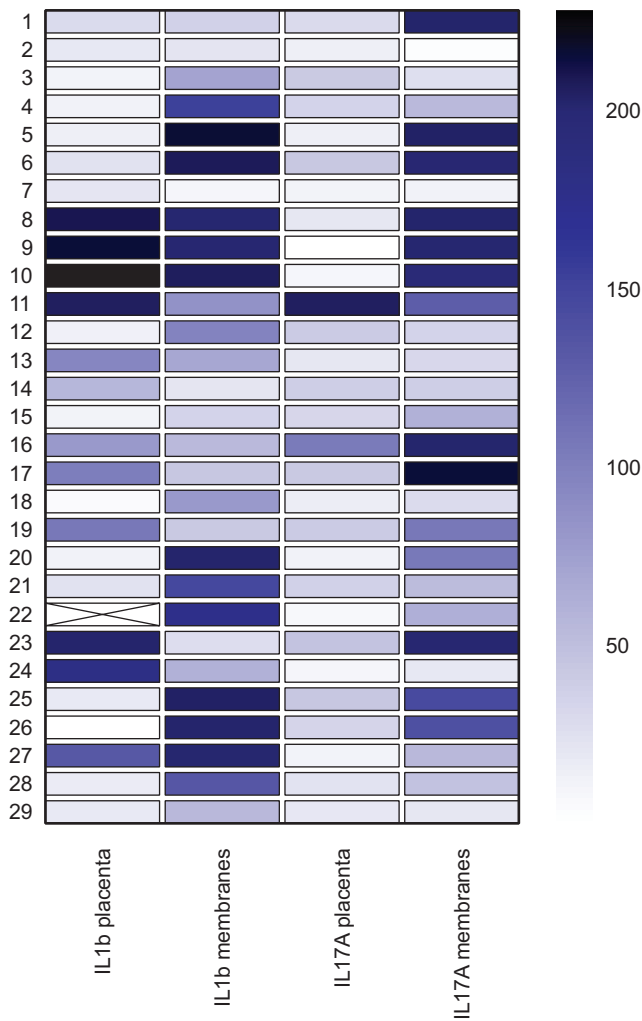


Рис. 9. Транскрипційна активність генів прозапальних цитокінів IL1β і IL17A у плаценті та плодових оболонках вагітних із передчасним розривом плодових оболонок при недоношеній вагітності (heat map plots, використано пакет статистичного аналізу GraphPad Prism v7).

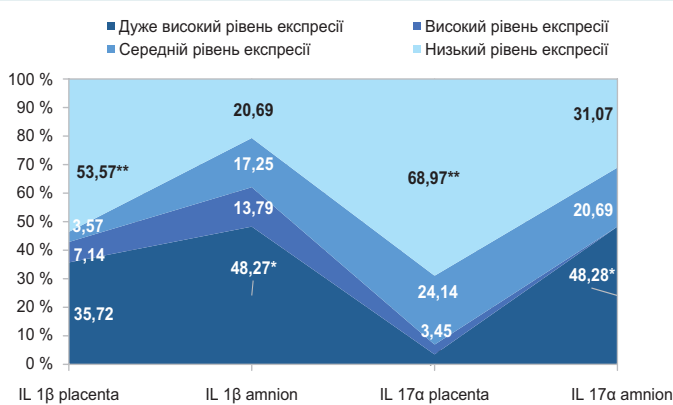


Рис. 10. Особливості експресії м-РНК прозапальних цитокінів у клітинах плаценти та плодових оболонках (% вагітних).

*: статистично значущі відмінності $p < 0,05$ (Mann–Whitney U test) порівняно з дуже низьким рівнем експресії; **: статистично значущі відмінності $p < 0,05$ (Mann–Whitney U test) порівняно з дуже високим рівнем експресії.

0,42–1,54; OR (GG) = 1,25; 95 % CI: 0,65–2,39; OR (AG) = 0,67; 95 % CI: 0,28–1,62 відповідно, $p > 0,05$. Результати мультиплікативної моделі усадкивання наведені в таблиці 1.

Для виділення ключових імуноопосередкованих ланок розвитку ПРПО при недоношеній вагітності наступний етап дослідження – визначення відносного рівня мРНК прозапальних цитокінів IL1β та IL17A на місцевому рівні окремо у плаценті та плодових оболонках. Особливості транскрипційної активності гена системного прозапального цитокіну IL1β у плаценті та плодових оболонках наведені на рис. 5, 6.

Відзначимо, що активність імунних клітин у біологічному матеріалі здорових вагітних нормалізована за методом $\Delta\Delta Ct$ із референс-геном GAPDH і взята за 1. Про напруженість і гіперактивність прозапальної імунної відповіді на місцевому рівні при ПРПО при недоношеній вагітності свідчить дуже високий рівень мРНК гена IL1β порівняно з групою контролю.

Резюмуючи отримані дані про активність IL1β, відносна нормалізована кількість мРНК цього гена у плаценті у вагітних із ПРПО щодо контролю в середньому (mean) становила 25,08, у плодових оболонках – 23,83, що свідчить про суттєву індукцію його транскрипційної активності.

Подібну тенденцію високої експресії спостерігали по-іншому, Th17-залежному, цитокіну IL17A. На рис. 7 і 8 наведено, у скільки разів порівняно з групою здорових вагітних була більшою активність дослідженого гена прозапальної ланки імунної відповіді у плодових оболонках і меншою мірою у плаценті. Кількість мРНК гена IL17A у плаценті вагітних із ПРПО щодо контролю в середньому (mean) дорівнювала 5,69, у плодових оболонках – 19,31.

Абсолютний рівень експресії мРНК генів імунної відповіді був різним, що зумовило необхідність визначення середньостатистичного транскрипційного профілю за кількістю мРНК у біологічному матеріалі. Усі гени можна умовно поділені на 4 групи: з дуже високим рівнем експресії, високим, середнім і низьким рівнем. Обговорюючи наведені на рис. 9 і 10 відсотки вагітних із певним рівнем активності названих генів, відзначимо: частка вагітних із дуже високим рівнем експресії (48,27 %, $p < 0,05$) прозапальних цитокінів IL1β та IL17A була саме у плодових оболонках. Це показує патогенез запальних і деструктивних реакцій у плодових оболонках у жінок із ПРПО при недоношеній вагітності. У таблиці 2 наведено середньостатистичний рівень транскрипції цитокінів IL1β та IL17A на місцевому рівні залежно від гестаційного терміну виникнення ПРПО.

Обговорення

Передчасні пологи як глобальна проблема потребує глобальних рішень. Останні дослідження генома розкривають інформацію для розуміння причин передчасних пологів. Для того, щоб повністю оцінити та зрозуміти патогенез розвитку ПРПО та передчасних пологів, важливі дослідження з використанням методів секвенування високої пропускну здатності та секвенування цілого генома. Тому завдання полягає у вияв-

Таблиця 2. Транскрипційний профіль генів прозапальної імунної відповіді у клітинах плаценти та плодових оболонках залежно від терміну виникнення передчасного розриву плодових оболонок (Mean (L-H))

Цитокин/ локалізація	26–27 тижнів n = 4	28–30 тижнів n = 8	31–32 тижні n = 10	33–34 тижні n = 7
IL1 β плацента	2,32 (1,43–3,76)	65,67 (1,67–227,93)	7,05 (0,61–13,72)	14,86 (2,12–37,68)
IL1 β плодові оболонки	9,11 (2,80–19,72)*	46,41 (1,23–139,24)*	12,42 (2,77–38,22)	22,74 (3,46–52,06)*
IL17A плацента	3,88 (1,80–5,38)	10,08 (0,04–62,77)	4,49 (0,92–13,45)	3,45 (1,17–5,98)
IL17A плодові оболонки	12,82 (0,36–40,56)*	24,55 (1,64–49,74)*	22,87 (3,68–130,67)*	11,95 (2,42–29,03)*

*: статистично значущі відмінності $p < 0,05$ (Mann–Whitney U test) порівняно з рівнем експресії досліджуваного цитокину у плаценті.

ленні жінок із високим ступенем ризику для надання персоналізованої медичної допомоги та зменшення відсотка передчасних пологів, і, як наслідок, зниження перинатальної захворюваності та смертності.

У зв'язку з наведеним виникла необхідність вивчення мутацій генів IL1 β (rs1143627) і TNF α (rs1800629) у популяції Запорізького регіону для визначення їхньої ролі в патогенезі ПРПО і передчасних пологів для виявлення закономірностей і механізмів формування ПРПО, визначення груп високого ризику, ранньої діагностики, прогнозування та профілактики. В Україні не здійснювали вивчення такої комбінації генів у цій патології на початку цього дослідження.

TNF α належить до системних прозапальних цитокинів, є центральним регулятором імунної відповіді, відіграє ключову роль у запуску запальних реакцій завдяки таким властивостям, як активація лейкоцитів, індукування продукції інших прозапальних цитокинів – інтерлейкіну 1 β . IL1 β впливає на судинний опір, активує ендотелій, сприяє адгезії лейкоцитів до ендотелію шляхом збільшення експресії рецепторів адгезії на ендотеліальних клітинах судин. Відзначають, що матері, в яких у навколоплідних водах була збільшена концентрація TNF α , надалі частіше мали дітей із психічними розладами.

Беручи до уваги, що гіпоксія активує синтез TNF α клітинами амніону, хоріона децидуальної та плодовими тканинами, що призводить до порушень системи гемостазу, дисфункції ендотелію клітин плаценти, зміни матково-плацентарного кровообігу, посилення проникності плаценти, а отже до внутрішньоутробного страждання плода. Високий рівень TNF α може бути пусковим фактором запальних деструктивних реакцій у плаценті, що спричиняють ішемію її ділянок. Крім того, підвищення рівня прозапальних цитокинів у середовищі, що оточує ембріон, може мати суттєвий вплив на мозок, що розвивається, призводить до порушення проникності гематоенцефалічного бар'єра й появи неврологічної симптоматики в ранньому періоді новонародженості.

IL1 β є центральним медіатором локальних і системних запальних реакцій. Зв'язування IL1 β із рецепторами в материнському організмі є необхідним для імплантації, стимулює проліферацію клітин, що утворюють плацентарний бар'єр, вибірково активує процеси синтезу й секретії стероїдних гормонів, рівень яких впливає на перебіг вагітності. З іншого боку, для IL1 β характерна здатність стимулювати продукцію простагландинів, тим самим запускатися механізми передчасного відторгнення плоду.

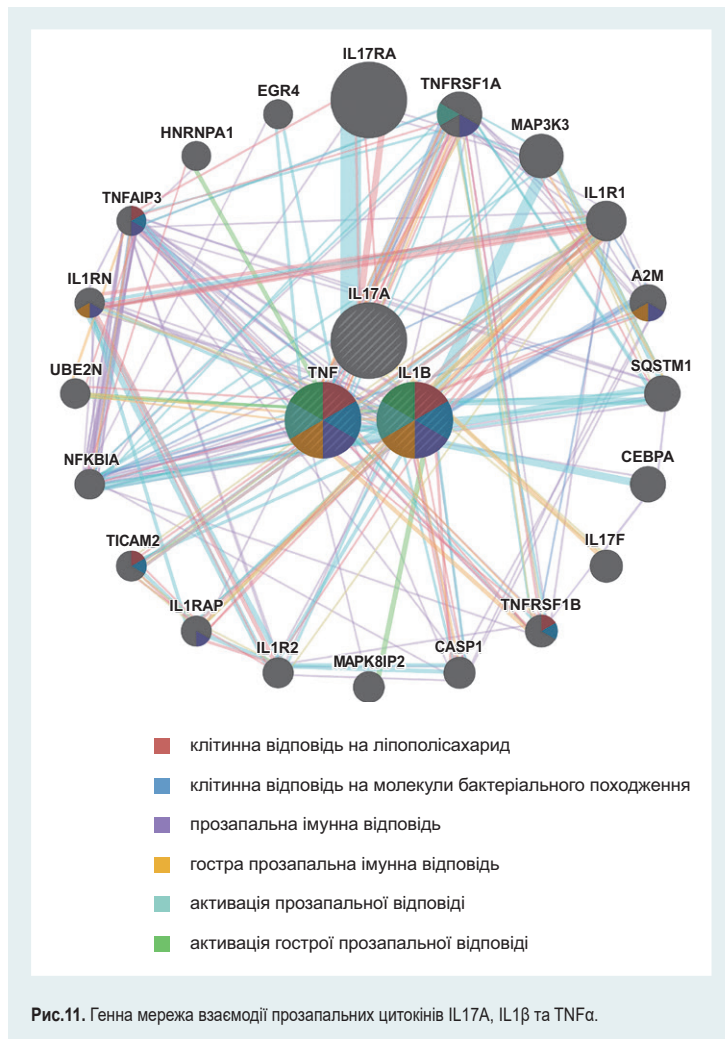
Sata F. et al. (Японія) довели зв'язок поліморфізму прозапальних цитокинів IL1 β та IL1 α з передчасними пологами [8]. Пізніше в дослідженні, що виконане Н. М. Jones, С. Holzman, на великій репрезентативній вибірці жінок США (n = 3019 за 6 років спостереження) поліморфізм гена IL1 β контрверсійно представлений як неасоційований із передчасними пологами [9]. На меншій вибірці жінок Данії підвищений ризик ПП та SNP IL1 β і TNF α продемонстрували М. V. Hollegaard, J. Grove [11]. Всупереч дослідженню М. V. Hollegaard ми не визначили асоціацію поліморфізму IL1 β (rs1143627) з виникненням ПРПО при недоношеній вагітності на популяції Запорізького регіону.

Moura E. et al. показали, що поліморфізми TNF α , інтерферону γ та IL6 асоційовані з передчасними пологами [7]. Bitner A., Devi S. G. у своїх дослідженнях на популяції жінок Польщі та Індії відповідно не виявили асоціації TNF α з передчасними пологами, ініційованими ПРПО [10,12]. Ми також оцінили внесок TNF α (rs1800629) у генетичну схильність вагітних до передчасних пологів. Довести зв'язок TNF α (rs1800629) із високим ступенем ризику ПРПО при недоношеній вагітності в Запорізькій області не вдалося.

Відкритий ресурс GeneMania (<https://genemania.org/>) дає змогу будувати генні мережі, які допомагають визначити, як гени-кандидати взаємодіють з іншими генами. Як видно з рис. 11, до складу генної мережі, що контролює активацію прозапальної імунної відповіді, входять досліджувані гени, які впливають на відповідь клітин на ліпополісахарид та інші молекули бактеріального походження, активацію запальної ланки імунітету (IL17A, NFKB1A, SQSTM1). Кожна генна мережа взаємодії має відповідне посилання на публікації наукометричних журналів світу. Найтісніші функціональні зв'язки спостерігали між генами TNF α , IL1 β , NFKB1A та IL1R1.

Підсумовуючи дані досліджуваного репертуару генів SNP, що включені в дослідження, не отримали статистичної значущості за маркерами IL1 β (rs1143627) і TNF α (rs1800629) як асоційованих із високим ризиком ПРПО і передчасних пологів у 26–34 тижні гестації. Тому наступна дослідницька точка дослідження – транскрипційний профіль прозапальних цитокинів IL1 β та IL17A у плаценті та плодових оболонках при ПРПО при недоношеній вагітності.

Загальним недоліком багатьох досліджень є те, що вони визначають кількісний бік змін (підвищення або зниження вмісту тих чи інших біологічно активних речовин, кількості рецепторів, рівня гормонів), але не



вивчають біологічне значення цих показників. Аналіз будь-якого процесу в аспекті дизрегуляційної патології потребує розуміння біологічної значущості змін, що виявляють, – вони є патогенетичними чи саногенетичними. Дослідження стану експресії генів мають певні переваги для ретроспективного оцінювання характеру перебігу патогенетичних і саногенетичних процесів, а також для прогнозування розвитку новонародженого.

За результатами нашого дослідження, у тканині плаценти та плодових оболонок жінок із ПРПО та передчасними пологами у 26–34 тижні гестації відзначено виражене підвищення інтенсивності експресії IL1β та IL-17A. Діапазон отриманих значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена IL1β у плаценті становив 1,43–227,93 (mean – 25,08), плодових оболонках – 1,23–139,24 (mean – 23,83). Значення, пограничні з даними контрольної групи (<1,00–1,15), реєстрували в одному зразку тканини плаценти, що становило 3,45 %. Коливання діапазонів значень, що нижчі від середнього (1,42–23,1), які показували помірно виражене зростання порівняно з групою загалом, спостерігали у 23 зразках тканини плаценти – 82,14 % спостережень. Значення рівня експресії вищі, ніж середнє (37,68–227,93), котрі демонстрували найбільші відхилення від контролю, спостерігали в

17,86 % досліджуваних зразків тканини плаценти. У тканині плодових оболонок найбільші відхилення від контролю виявили у 32,14 % зразків (експресія вище, ніж середнє 28,82–139,24). Отже, збільшення відносної нормалізованої експресії (крім пограничних значень) IL1β виявлені у 96,43 % випадків усієї вибірки з переважанням суттєвих відхилень ($p < 0,001$).

Аналізуючи експресію гена IL1β залежно від терміну маніфестації ПРПО, встановили: її мінімальні значення 2,32 (1,42–3,76) спостерігали у плаценті в терміні гестації 26–27 тижнів, максимальне значення – 65,67 (1,86–227,93) у 28–30 тижнів також у плацентарній тканині. У плодових оболонках визначили в 46,41 раза вищу порівняно з групою контролю експресію м-РНК IL1β у 28–30 тижнів вагітності та 22,74 раза у 33–34 тижні відповідно. Така широка амплітуда коливань свідчить, що у вагітних із ПРПО при недоношеній вагітності рівень запальних процесів у тканині варіює в широких межах.

IL-17 продукують як Т-хелпери 17 типу, так і група вроджених ILC3 (3 innate lymphoid cells), обидві популяції яких експресують RORγT (RAR-related orphan receptor gamma), транскрипційний профіль якого буде висвітлено в майбутньому дослідженні. IL-17 активно залучає нейтрофіли у тканину й індукує запалення.

Розмах отриманих значень відносної нормалізованої експресії мРНК гена IL-17A був меншим, ніж IL1β та у плаценті становив 1,15–62,76 (mean – 5,69), плодових оболонках – 1,63–130,67 (mean – 19,31). Значення, пограничні з даними контрольної групи, (<1,00–1,15) зареєстрували у 3 зразках тканини плаценти та в одному зразку плодових оболонок – 6,89 %. Коливання діапазонів значень, які вищі, ніж середнє і показували дуже виражене зростання порівняно з групою загалом, спостерігали в 9 зразках плодових оболонок, що становило 31,03 % спостережень. У тканині плаценти найбільші відхилення від контролю виявили у 13,79 % зразків (експресія вище, ніж середнє 5,73–62,76).

Механізми прозапальної медіації через активацію IL-1β та IL-17A можуть бути причиною розвитку ПРПО у 26–34 тижні гестації; їх розглядають як можливі індуктори прогресування захворювання. Під час аналізу експресії гена IL17A визначили певні особливості, як-от суттєве зростання показника у плодових оболонках порівняно з плацентарною тканиною. У 28–30 тижнів виникнення ПРПО рівень експресії IL17A у плодових оболонках був у 24,55 раза більший, ніж у практично здорових жінок із фізіологічним перебігом вагітності та пологів, у 31–32 тижні – 22,87 раза відповідно.

Результати відносної нормалізованої експресії генів IL-1β та IL-17A виявилися доволі неочікуваними. Очевидно, що така висока їхня активація пов'язана з наявністю потенційних лігандів (мікробних патернів), здатних його активувати. Серед відомих об'єктів із такою здатністю та наявністю в репродуктивних шляхах (як-от ендометрії) жінки можна виділити ряд умовно патогенних та облігатних мікроорганізмів, які містять антигенні конфігурації (ліпопротеїди, пептидоглікан, гліколіпіди, зимозан грибів), що здатні активувати рецептори вродженого імунітету і, як наслідок, рецептори адаптивної імунної відповіді. Однак умовно патогенні

збудники не підлягають обов'язковій медикаментозній елімінації. Не виключено, що власне цей факт за допомогою до кінця не з'ясованих механізмів і підтримує розвиток ПРПО при недоношеній вагітності.

Висновки

1. У популяції Запорізького регіону відсутня вірогідна клінічна асоціація між генами IL1 β (rs1143627) та TNF α (rs1800629) і високим ризиком розвитку передчасного розриву плодових оболонок при недоношеній вагітності.

2. Метод ЗТ-ПЛР-РЧ дав змогу виявити імуноопосередковані ланки розвитку ПРПО на місцевому рівні в терміні гестації 26–34 тижні, а саме транскрипційну індукцію генів прозапальних цитокінів IL1 β та IL17A.

3. Високий транскрипційний профіль прозапальних цитокінів у плодових оболонках ініціював ранній початок пологової діяльності та передчасних пологів, а низький і середній рівень активності названих генів як у плаценті, так і плодових оболонках сприяв пролонгуванню вагітності, вчасній профілактиці синдрому дихальних розладів новонародженого та призначенню превентивної антибактеріальної терапії.

Перспективи подальших досліджень. Плануємо продовжити вивчення імунологічної складової розвитку ПРПО й передчасних пологів, зокрема визначити експресію вроджених та адаптивних компонентів імунітету: кількості матричної РНК TLR2, TLR4, а також транскрипційних факторів, що регулюють диференціювання лімфоцитів у напрямі Th1-, Th17- та Treg у децидуальній плацентарній тканині та плодових оболонках.

Інший напрям досліджень – порівняльне оцінювання залежності між запальними змінами у плаценті та плодових оболонках, тривалим безводним періодом і даними віддаленого катамнезу дітей, які народжені в терміні гестації 26–34 тижні від матерів із ПРПО. Це істотно покращить розуміння ПРПО й передчасних пологів, сприятиме формулюванню обсягу патогенетичних превентивних заходів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Любомирська К. С., PhD аспірант каф. акушерства та гінекології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Любомирская Е. С., PhD аспірант каф. акушерства та гінекології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Liubomyrska K. S., PhD-student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 29.10.2018

Після доопрацювання / Revised: 07.11.2018

Прийнято до друку / Accepted: 13.11.2018

Список літератури

- [1] Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study / B.R. Ramos, N.D. Mendes, A.A. Tanikawa, et al. // *BMC Pregnancy Childbirth*. – 2016. – Vol. 16. – P. 30.
- [2] Antimicrobial properties of amniotic and chorionic membranes: a comparative study of two human fetal sacs / M. Zare-Bidaki, S. Sadrinia, S. Erfani, et al. // *J Reprod Infertil*. – 2017. – Vol. 18. – Issue 2. – P. 218–224.
- [3] Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome / M. Tchirikov, N. Schlalritz-Loutsevitch, J. Maher, et al. // *J. Perinat. Med.* – 2017. – Vol. 46. – Issue 5. – P. 465–488.
- [4] Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabour rupture of membranes / I. Musilova, R. Kutová, L. Pliskova, et al. // *Plos One*. – 2015. – Vol. 10. – Issue 7. – P. 1–18.
- [5] Spontaneous preterm birth and single nucleotide gene polymorphisms: a recent update / A.I. Sneikh, E. Ahmad, M.S. Jamal, et al. // *BMC Genomics*. – 2016. – Vol. 17. – Suppl 9. – P. 759.
- [6] Onset of human preterm and term birth is related to unique inflammatory transcriptome profiles at the maternal fetal interface / R. Bukowski, Y. Sadovsky, H. Goodarzi, et al. // *Peer J*. – 2017. – Vol. 5. – e3685.
- [7] Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth / E. Moura, R. Mattar, E. de Souza, et al. // *J. Reprod Immunol*. – 2009. – Vol. 80. – P. 115–121.
- [8] Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birthweight in Japanese population / F. Sata, S. Toya, H. Yamada, et al. // *Mol Hum Reprod*. – 2009. – Vol. 15. – Issue 2. – P. 121–130.
- [9] Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery / H.M. Jones, C. Holzman, K.H. Friderici, et al. // *J Reprod Immunol*. – 2010. – Vol. 87. – P. 82–89.
- [10] Bitner A. IL1 β , IL6 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 / A. Bitner, J. Kalinka // *Arch Med Sci*. – 2010. – Vol. 6. – Issue 4. – P. 552–557.
- [11] Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta promoters with possible gene regulatory functions increases the risk of preterm birth / M.V. Hollegaard, G. Grove, P. Thorsen, et al. // *Acta Obstet Gynecol Scand*. – 2008. – Vol. 87. – Issue 12. – P. 1285–1290.
- [12] Analysis of relation between tumor necrosis factor alpha gene (G308A polymorphism) with preterm labor / L. Jafarzaden, A. Danesh, M. Sadeghi, et al. // *Int J Prev Med*. – 2013. – Vol. 4. – Issue 8. – P. 896–901.

References

- [1] Ramos, B. R., Mendes, N. D., Tanikawa, A. A., Amador, M. A., dos Santos, N. P., dos Santos, S. E., et al. (2016). Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth*, 16, 30. doi: 10.1186/s12884-016-0823-1.
- [2] Zare-Bidaki, M., Sadrinia, S., Erfani, S., Afkar, E., & Ghanbarzade, N. (2017). Antimicrobial properties of amniotic and chorionic membranes: a comparative study of two human fetal sacs. *J Reprod Infertil*, 18(2), 218–224.
- [3] Schlalritz-Loutsevitch, N., Maher, J., Buchmann, J., Naberezhnev, Y., Winarno, A. S., & Seliger, G. (2017). Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *J. Perinat. Med.*, 46(5), 465–488. doi: 10.1515/jpm-2017-0027.
- [4] Musilova, I., Kutová, R., Pliskova, L., Stepan, M., Menon, R., Jacobsson, B., & Kacerovsky, M. (2015). Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabour rupture of membranes. *Plos One*, 10(7): e0133929. doi: [10.1371/journal.pone.0133929].
- [5] Sheikh, I. A., Ahmad, E., Jamal, M. S., Rehan, M., Assidi, M., Tayubi, I. A., et al. (2016). Spontaneous preterm birth and single nucleotide gene polymorphisms: a recent update. *BMC Genomics*, 17(Suppl 9), 759. doi: 10.1186/s12864-016-3089-0.
- [6] Bukowski, R., Sadovsky, Y., Goodarzi, H., Zhang, H., Biggio, J. R., Varner, M., et al. (2017). Onset of human preterm and term birth is related to unique inflammatory transcriptome profiles at the maternal fetal interface. *Peer J*, 5, e3685. doi: 10.7717/peerj.3685.
- [7] Moura, E., Mattar, R., de Souza, E., Torloni, M. R., Goncalves-Primo, A., & Daher, S. (2009). Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J. Reprod Immunol*, 80(1–2), 115–21. doi: 10.1016/j.jri.2008.11.007.

- [8] Sata, F., Toya, S., Yamada, H., Suzuki, K., Saijo, Y., Yamazaki, A., et al. (2009). Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birthweight in Japanese population. *Mol Hum Reprod.*, 15(2), 121–30. doi: 10.1093/molehr/gan078.
- [9] Jones, H. M., Holzman, C., Friderici, K. H., Jernigan, K., Chung, H., Wirth, J., & Fisher, R. (2010). Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery. *J Reprod Immunol.*, 87(1–2), 82–9. doi: 10.1016/j.jri.2010.06.158.
- [10] Bitner, A., & Kalinka, J. (2010). IL1 β , IL6 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. *Arch Med Sci.*, 6(4), 552–7. doi: 10.5114/aoms.2010.14467.
- [11] Hollegaard, M. V., Grove, G., Thorsen, P., Wang, X., Mandrup, S., Christiansen, M., et al (2008). Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta promoters with possible gene regulatory functions increases the risk of preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 87(12), 1285–90. doi: 10.1080/00016340802468340.
- [12] Jafarzaden, L., Danesh, A., Sadeghi, M., Heybati, F., & Hashemzaden, M. (2013). Analysis of relation between tumor necrosis factor alpha gene (G308A polymorphism) with preterm labor. *Int J Prev Med.*, 4(8), 896–901.