

2. Быхалов Л. С. // Сибирский медицинский журнал. — 2013 — № 8. — С. 94—97.

3. Гиллер Д. Б., Папков А. В., Гедымин Л. Е. и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 10. — С. 21—25.

4. Гринберг Л. М. // Фтизиатрия и пульмонология. — Екатеринбург, 2011. — № 1.

5. Ерохин В. В., Лелеха Л. Н., Гедымин Л. Е., Двораковская Л. В. Клеточная биология легких в норме и при патологии / Под ред. В. В. Ерохина, Л. К. Романовой. — М., 2000.

6. Макашева Е. В., Конанчук О. Н., Морозова Е. В. // Журнал инфектологии. — 2009. — № 2/3, Т. 1.

7. Пантелеев А. М. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2010. — № 1, Т. 2. — С. 16—22.

8. Юдин С. А. // Сибирский медицинский журнал. — 2013, № 8. — С. 101—103.

9. Falvo J. V., Ranjbar S., Jasenosky L. D., et al. // Am J Respir Cell Mol Biol. — 2011. — Vol. 45 (6). — P. 1116—1124.

10. Koo M. S., Subbian S., Kaplan G. // Cell Commun Signal. — 2012. — Vol. Jan 26; 10 (1):2.

11. Kouassi B., N'Gom A., Horo K., et al. // Rev Mal Respir. — 2013. — Vol. 30 (7). — P. 549—554.

12. Sued O., Quiroga M. F., Socias M. E., et al. // Viral Immunol. — 2011. — Vol. 24 (4). — P. 347—349.

## Контактная информация

**Быхалов Леонид Сергеевич** — к. м. н., докторант кафедры патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: leonby-vgd@yandex.ru

УДК 616.151.5:618.2+616.151.5:618.39

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ТОЛЛ-РЕЦЕПТОРОВ И СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С СИНДРОМОМ ПОТЕРИ ПЛОДА В АНАМНЕЗЕ

**Л. Н. Питиримова, Б. Ю. Гумилевский, Е. А. Загороднева**

*Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра клинической лабораторной диагностики*

Исследование основано на выявлении сывороточных уровней провоспалительных цитокинов и определении распределения полиморфизмов генов толл-рецепторов среди женщин с физиологическим течением беременности и с синдромом потери плода в анамнезе; проведен сравнительный анализ с данными, полученными в контрольной группе соматически здоровых женщин.

*Ключевые слова:* провоспалительные цитокины, синдром потери плода, полиморфизм генов толл-рецепторов.

## POLYMORPHISM OF GENES OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND SERUM LEVELS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PREGNANT WOMEN WITH FETAL LOSS SYNDROME IN THE PAST MEDICAL HISTORY

**L. N. Pitirimova, B. Y. Gumilevskiy, E. A. Zagorodneva**

The study aimed to identify the serum levels of pro-inflammatory cytokines and determine the distribution of polymorphism of genes of toll-like receptors in women with physiological gestation course and with fetal loss syndrome in the past medical history. We performed a comparative analysis of these findings with the data obtained in the control group of healthy women.

*Key words:* pro-inflammatory cytokines, fetal loss syndrome, polymorphism of genes of toll-like receptors.

Проблема невынашивания беременности является одной из наиболее актуальных в современном акушерстве. Высокая частота ее возникновения обуславливает необходимость поиска путей предотвращения осложнений беременности, приводящих к потере плода [2, 5, 6]. В последние десятилетия внимание исследователей привлекает роль иммунных механизмов в формировании фетоплацентарной единицы и их влияние на течение гестационного процесса. В этом аспекте имеет важное значение изучение роли механизмов врожденного иммунитета, в частности, толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors (TLRs)) [3, 4, 7, 8, 9, 10]. Несмотря на то, что толл-рецепторы были

открыты относительно недавно, изучена и доказана их роль в развитии ряда патологических процессов, в том числе воспаления [9, 10]. TLRs клеток моноцитарно-макрофагального ряда посредством передачи сигнала внутрь клетки приводят к увеличению продукции целого ряда провоспалительных цитокинов и костимуляционных молекул, которые способствуют активации Т-лимфоцитов и стимулируют развитие адаптивного иммунного ответа [7].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Сравнительный анализ особенностей распределения полиморфных локусов генов толл-рецепторов (TLR2,

TLR3, TLR4, TLR6, TLR9) и сывороточных уровней ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  у женщин с физиологической беременностью и с синдромом потери плода в анамнезе.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 203 пациентки, наблюдающихся в МУЗ «Женская консультация № 5» и МУЗ «Женская консультация № 6» Волгограда. Все обследуемые были разделены на 3 группы. Группу контроля (группа 1) составили 100 небеременных соматически здоровых женщин репродуктивного возраста, группу 2 — 39 женщин с физиологическим течением беременности, группу 3 — 64 беременных с синдромом потери плода в анамнезе. Группы были репрезентативны по возрасту ( $29 \pm 4,05$ ) лет и сроку гестации ( $18 \pm 3,2$ ) недель.

Материалом для исследования послужила периферическая кровь пациенток, полученная при плановом посещении. Цитокины определялись с помощью наборов реактивов для иммуноферментного анализа производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург): «ИФА-IL-6», «ИФА-IL-1 $\beta$ », «ИФА-IFN-gamma», «ИФА-TNF-alpha» на фотометре иммуноферментном планшетном «Эфос» 9305 (ОАО «Московский завод Сапфир», Москва). В наборах использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа.

Исследование полиморфизма генов TLRs производили с помощью диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом полимеразной цепной реакции «SNP-экспресс» производства НПФ «Литех»: «Мутация толл-подобного рецептора 2» (ген — TLR2, полиморфизм — Arg753Gln), «Мутация толл-подобного рецептора 3» (ген — TLR3, полиморфизм — Phe412Leu), «Мутация толл-подобного рецептора 4» (ген — TLR4, полиморфизм — Asp299Glu), «Мутация толл-подобного рецептора 6» (ген — TLR6, полиморфизм — Ser249Pro), «Мутация толл-подобного рецептора 9» (ген — TLR9, полиморфизм — T-1237C).

Статистические расчеты производили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 фирмы StatSoft, Inc. (США). Значимость различий при сравне-

нии групп оценивалась непараметрическим U-критерием Манна-Уитни, достоверность различия частот встречаемости оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате обследования выявлено, что среди женщин с синдромом потери плода в анамнезе по сравнению с женщинами, у которых беременность протекала физиологически, значительно выше частота кольпитов (44 %), сочетанных урогенитальных инфекций (19 %), эндометритов (25 %), синдрома поликистозных яичников (25 %). Кроме того, текущая беременность в исследуемой группе в 74 % случаев была осложнена угрозой выкидыша на сроках ( $9 \pm 3,5$ ) и ( $18 \pm 2,27$ ) недель, подтвержденной данными ультразвукового исследования и клиническими методами исследования.

Анализ содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) в сыворотке крови обследуемых групп женщин показал значимое увеличение количества TNF $\alpha$  [ $(18,7 \pm 4,2)$  пг/мл,  $p \leq 0,05$ ] в группе беременных с синдромом потери плода в анамнезе по сравнению с группой женщин с физиологическим течением беременности ( $7,4 \pm 1,0$ ) пг/мл и контрольной группой ( $4,73 \pm 0,51$ ) (табл. 1).

Для нормального развития беременности определенного уровня TNF $\alpha$  необходим, так как он ограничивает процессы синтеза ДНК клетками трофобласта [1]. Однако гиперпродукция TNF $\alpha$  приводит к нарушению микроциркуляции и тканевой гипоксии, в результате происходит снижение маточно-плацентарного кровотока и нарушение метаболической, трофической, гормональной функции плаценты [6].

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg753Gln гена TLR2 обнаружено преобладание частоты аллели Gln в группе женщин с синдромом потери плода в анамнезе (18 %) над частотой того же аллеля в группе женщин с физиологической беременностью (4 %) и контрольной группой (5 %). Кроме того, встречаемость генотипа Arg/Gln (27 %) в группе 3 преобладала над встречаемостью этого гено-

Таблица 1

### Содержание цитокинов в сыворотке обследованных женщин

Показатель, пг/мл	Группа 1 небеременные соматически здоровые женщины ( $M \pm m$ ) $n = 89$	Группа 2 женщины с физиологическим течением беременности ( $M \pm m$ ) $n = 39$	Группа 3 беременные женщины с синдромом потери плода в анамнезе ( $M \pm m$ ) $n = 64$
ИЛ-1 $\beta$	$7,4 \pm 0,8$	$8,00 \pm 1,04$	$5,90 \pm 0,87$
ИЛ-6	$5,04 \pm 1,54$	$4,3 \pm 1,1$	$6,3 \pm 1,5$
IFN $\gamma$	$2,18 \pm 1,40$	$4,1 \pm 1,4$	$4,2 \pm 1,0$
TNF $\alpha$	$4,73 \pm 0,51$	$7,4 \pm 1,0$	$18,7 \pm 4,2^{* \#}$

\*Статистически значимые отличия от группы 2 ( $p < 0,05$ ; по U-критерию Манна-Уитни);

#статистически значимые отличия от группы 1 ( $p < 0,05$ ; по U-критерию Манна-Уитни).

типа в группе 1 (9 %) и группе 2 (8 %). Количество нормальных гомозигот Arg/Arg оказалось выше в контрольной группе (90 %) и среди женщин с физиологической беременностью (92 %), чем в группе 3 (69 %) (табл. 2).

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера гена TLR3 (Phe412Leu) и TLR6 (Ser249Pro) в исследуемых группах статистически не отличались.

В группе женщин с синдромом потери плода в анамнезе аллель Gly полиморфного маркера гена TLR4 Asp299Gly встречалась чаще (25 %), чем в группе 2 (25 %) и контрольной группе (9 %). Генотип Asp/Gly в группе 3 также встречался чаще (31 %), чем в группе 1 (14 %) и группе 2 (10 %). Нормальные гомозиготы Asp/Asp среди женщин с синдромом потери плода в анамнезе, напротив, встречались реже (67 %), чем среди женщин группы 1 (84 %) и группы 2 (87 %) (табл. 3).

В группе 3 гетерозиготы TC по полиморфному маркеру гена TLR9 (T-1237C) встречались реже (44 %), чем в группе 2 (69 %) и контрольной группе (64 %). Количество мутантных гомозигот CC в группе женщин с синдромом потери плода в анамнезе было статистически выше, чем в группе 2 (9 % против 0 % соответственно) (табл. 4).

Таким образом, в ходе исследования выявлено преобладание гетерозиготного генотипа по полиморфным маркерам генов TLR2 и TLR4 в группе женщин с синдромом потери плода в анамнезе, а также большее количество мутантных гомозигот CC по полиморфному маркеру гена TLR9 в сравнении с группами 1 и 2. Также установлено наличие высокого уровня TNF $\alpha$  среди женщин с синдромом потери плода в анамнезе в сравнении с его уровнем у женщин с физиологической беременностью, что свидетельствует о неустановившемся ко второму триместру иммунном балансе в системе мать-плод-плацента. Боль-

Таблица 2

### Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера гена TLR2 Arg753Gln в исследуемых группах, (%)

Показатель	Группа 1 небеременные соматически здоровые женщины, <i>n</i>	Группа 2 женщины с физиологиче- ским течением беременности, <i>n</i>	Группа 3 беременные женщины с синдромом потери плода в анамнезе, <i>n</i>
Аллели			
Arg	189 (95)	75 (96)	105 (82) <sup>*#</sup>
Gln	11 (5)	3 (4)	23 (18) <sup>*#</sup>
Всего	200	78	128
Генотип			
Arg/Arg	90 (90)	36 (92)	44 (69) <sup>*#</sup>
Arg/Gln	9 (9)	3 (8)	17 (27) <sup>*#</sup>
Gln/Gln	1 (1)	0 (0)	3 (4)
Всего	100	39	64

\*Статистически значимые отличия по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ; по критерию  $\chi^2$ );

#статистически значимые отличия по сравнению с группой 1 ( $p < 0,05$ ; по критерию  $\chi^2$ ).

Таблица 3

### Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера гена TLR4 Asp299Gly в исследуемых группах, (%)

Показатель	Группа 1 небеременные соматически здоровые женщины, <i>n</i>	Группа 2 женщины с физиологическим течением беременности, <i>n</i>	Группа 3 беременные женщины с синдромом потери плода в анамнезе, <i>n</i>
Аллели			
Asp	182 (91)	72 (92)	106 (75) <sup>*#</sup>
Gly	18 (9)	6 (8)	22 (25) <sup>*#</sup>
Всего	200	78	128
Генотип			
Asp/Asp	84 (84)	34 (87)	53 (67) <sup>*#</sup>
Asp/Gly	14 (14)	4 (10)	10 (31) <sup>*#</sup>
Gly/Gly	2 (2)	1 (3)	1 (2)
Всего	100	39	64

\*Статистически значимые отличия по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ; по критерию  $\chi^2$ );

#статистически значимые отличия по сравнению с группой 1 ( $p < 0,05$ ; по критерию  $\chi^2$ ).

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера гена TLR9 (Т-1237С) в исследуемых группах, (%)

Показатель	Группа 1 небеременные соматически здоровые женщины, n)	Группа 2 женщины с физиологическим течением беременности, n	Группа 3 беременные женщины с синдромом потери плода в анамнезе, n
Аллели			
Т	130 (65)	51 (65)	88 (72)
С	70 (35)	27 (35)	40 (28)
Всего	200	78	128
Генотип			
ТТ	33 (33)	12 (31)	30 (47)
ТС	64 (64)	27 (69)	28 (44)**
СС	3 (3)	0 (0)	6 (9)*
Всего	100	39	64

\*Статистически значимые отличия по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ; по критерию  $\chi^2$ );

\*\*статистически значимые отличия по сравнению с группой 1 ( $p < 0,05$ ; по критерию  $\chi^2$ ).

шой процент хронических инфекционных и неинфекционных заболеваний урогенитального тракта среди обследуемых женщин может служить важным патогенетическим фактором в нарушении иммунной реактивности при беременности и формировании угрозы выкидыша.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленный повышенный уровень TNF $\alpha$  в сыворотке крови беременных женщин с синдромом потери плода в анамнезе, свидетельствует о наличии серьезного провоспалительного фактора в механизме развития осложнений второго триместра беременности в виде угрозы выкидыша у большинства женщин с синдромом потери плода в анамнезе. Это может быть обусловлено негативным влиянием системного воспаления на трофобласт. В большинстве случаев, увеличенный уровень TNF $\alpha$  в сыворотке крови женщин с синдромом потери плода в анамнезе был связан с наличием гетерозиготного аллельного варианта генов TLR2 Arg753Gln и TLR4 Asp299Gly. Аддитивный эффект такого сочетания приводит к нарушению формирования адаптивного иммунного ответа при беременности, особенно на фоне хронических воспалительных неинфекционных и инфекционных заболеваний. Это увеличивает вероятность осложнений во время беременности, в том числе приводит к синдрому потери плода.

Следовательно, оценка уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови наряду с типированием аллельных вариантов генов толл-рецепторов, позволяет своевременно предупредить развитие осложнений во время беременности, в том числе во втором триместре. Особенно значимым представляется тщательный сбор акушерско-гинекологического анамнеза и проведение исследования на этапах прегравидарной подго-

товки, что позволит провести своевременную профилактику нарушения течения беременности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абаева И. Ш., Баймурадова С. М., Бицадзе В. О. Роль провоспалительных цитокинов в патогенезе синдрома потери плода // Материалы IV съезда акушеров-гинекологов России. — М., 2008. — С. 3.
2. Баранов В. С., Айламазян Э. К. Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. — СПб.: Н-Л, 2009. — 66 с.
3. Гумилевский Б. Ю., Гумилевская О. П. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2010. — № 3 — С. 62—65.
4. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Ганковская О. А., и др. // ЖМЭИ. — 2008. — № 1. — С. 46—50.
5. Радзинский В. Е., Запертова Е. Ю., Мисник В. В. // Акушерство и гинекология. — 2005. — № 6. — С. 24—29.
6. Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. // Мать и дитя: Материалы 5-го Рос. форума. — М., 2003. — С. 202—203.
7. Симбирцев А. С. // Иммунология. — 2005. — С. 68—77.
8. Abrahams V. M., Mog G. t // Placenta. — 2005. — Vol. 26. — P. 540—547.
9. Fazellil A., Bruce C., Anumba D. O. // Human Reprod. — 2005. — Vol. 20 (5). — P. 1372—1378.
10. Zhang D. Zhang G. Hoyden M. S., et al. // Science. — 2004. — Vol. 303. — P. 1522.

#### Контактная информация

Питиримова Любовь Николаевна — аспирант, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом ФУВ КЛД, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: Gatyzhskaya@mail.ru