

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-18 У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ

Кузнецова Н.Б.<sup>1</sup>, Буштырева И.О.<sup>2</sup>, Гугуева А.В.\*<sup>3</sup>,  
Оксенюк О.С.<sup>4</sup>, Машкина Е.В.<sup>5</sup>, Дмитриева М.П.<sup>3</sup>

DOI: 10.25881/BPNMSC.2020.18.20.014

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Ростовский Государственный медицинский университет Минздрава России, Ростов-на-Дону

<sup>2</sup> «Клиника профессора Буштыревой», Ростов-на-Дону

<sup>3</sup> ГБУ РО Перинатальный центр, Ростов-на-Дону

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО Ростовский Государственный медицинский университет Минздрава России, Ростов-на-Дону

<sup>5</sup> Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

**Резюме.** Цель: изучить влияние полиморфных вариантов *-137G>C* (rs187238), *-607G>T* (rs1946518), *-656A>C* (rs5744228) промотора гена *IL18* в развитии преждевременного разрыва плодных оболочек в сроке гестации 22–27,6 недель.

**Материалы и методы.** В исследование включено 45 беременных женщин, которые находились на обследовании и лечении в ГБУ РО «Перинатальный центр». Было сформировано 2 группы: в 1-ю группу вошла 31 пациентка с преждевременным разрывом плодных оболочек, 2-ю (контрольную) группу составили 14 женщин с клинически нормально протекающей беременностью. Группы были сопоставимы по акушерскому анамнезу. Из исследования были исключены случаи многоплодной беременности, хромосомной патологии, врожденных пороков развития у плода, а также беременность после вспомогательных репродуктивных технологий. Проведено генотипирование по аллельным вариантам гена интерлейкина-18: *IL18 -137G>C*, *-607G>T*, *-656A>C*, а также определение концентрации интерлейкина-18 в периферической крови.

**Результаты.** Было выявлено, что среди пациенток с преждевременным разрывом плодных оболочек повышена частота лиц, имеющих полиморфизм *-656A>C* (rs5744228) гена *IL18*, что ассоциировано с увеличением уровня интерлейкина-18 в сыворотке крови.

**Заключение.** Отмечается вероятная связь полиморфизма *-656A>C* гена *IL18* с развитием ПРПО. Выявление носительства указанного полиморфного варианта гена у женщин в группе риска по развитию ПРПО может служить в качестве предиктивного маркера, что позволит своевременно наметить тактику ведения беременности и разработать профилактические мероприятия.

**Ключевые слова:** преждевременный разрыв плодных оболочек, преждевременные роды, полиморфизм гена, цитокины.

### Актуальность

Сохраняющаяся на высоком уровне частота осложнений беременности, в генезе которых значительная роль принадлежит воспалительному компоненту, диктует необходимость поиска новых технологий в предикции данных состояний. К одному из наиболее грозных осложнений беременности относится преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО) при недоношенной беременности.

Фетоплацентарная система является неотъемлемым звеном в генерировании как физиологически

### POLYMORPHISM OF THE INTERLEUKIN-18 GENE IN PREGNANT WOMEN WITH PRETERM BIRTH

Kuznetsova N.B.<sup>1</sup>, Bushtyreva I.O.<sup>2</sup>, Gugueva A.V.\*<sup>3</sup>, Oksenyuk O.S.<sup>4</sup>,  
Mashkina E.V.<sup>5</sup>, Dmitrieva M.P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Rostov-on-Don State Medical University of the Ministry of health of Russia, Rostov-on-Don

<sup>2</sup> «Clinic of Professor Bustyreva», Rostov-on-Don

<sup>3</sup> Rostov-on-Don State Perinatal Center, Rostov-on-Don

<sup>4</sup> Rostov-on-Don State Medical University of the Ministry of health of Russia, candidate of medical Sciences, Rostov-on-Don

<sup>5</sup> Southern Federal University, doctor of biology Sciences, Rostov-on-Don

**Abstract.** Objective: to study the effect of the polymorphic variants *-137G>C* (rs187238), *-607G>T* (rs1946518), *-656A>C* (rs5744228) of the *IL18* gene promoter in the development of the premature rupture of the fetal membranes at the gestational age of 22–27.6 weeks.

**Materials and methods.** The study included 45 pregnant women who were examined and treated at the Perinatal Center. Two groups were formed: the 1st group included 31 patients with premature rupture of membranes, the 2nd (control) group consisted of 14 women with clinically normal pregnancy. The groups were comparable by obstetric history. The study excluded cases of multiple pregnancies, chromosomal pathology, congenital malformations in the fetus, as well as pregnancy after assisted reproductive technologies. Genotyping was carried out on allele variants of the interleukin-18 gene: *IL18 -137G>C*, *-607G>T*, *-656A>C*, as well as the determination of the concentration of interleukin-18 in peripheral blood.

**Results.** It was found that among patients with premature rupture of the membranes, the frequency of individuals with *IL18* gene polymorphism-656A>C (rs5744228) was increased, which was associated with an increase in serum interleukin-18 levels.

**Conclusion.** There is a probable Association between *IL18* gene polymorphism-656A>C and the development of premature rupture of membranes. The identification of carriage of the indicated polymorphic variant of the gene among women can serve as a predictive marker of the risk for the development of premature rupture of membranes, which will allow timely identification of pregnancy management tactics and development of preventive measures.

**Keywords:** premature rupture of fetal membranes, premature birth, polymorphism of the gene, cytokines.

протекающих процессов при беременности, так и в развитии гестационных осложнений. Известно, что немаловажная роль в генезе ПРПО принадлежит наследственным факторам. Генный полиморфизм факторов, формирующих фетоплацентарную систему, в ряде случаев определяет особенности функционирования этой системы [1].

В норме при беременности соблюдается оптимальное равновесие провоспалительных (вырабатываемых Th1-клетками) и противовоспалительных (вырабаты-

\* e-mail: anna-gugueva@mail.ru

ваемых Th2-клетками) цитокинов в фетоплацентарном комплексе [2].

Иммунологические нарушения, возникающие при ПРПО, могут быть обусловлены особенностями генотипа, в том числе и по генам цитокинов, которые кодируют молекулы эндогенных медиаторов межклеточных взаимодействий. Дисрегуляция в каскадных механизмах работы цитокинов, обусловленная, в том числе и особенностями генотипа, может приводить к формированию неблагоприятных для развития беременности условий [3].

Уровень экспрессии провоспалительных цитокинов во многом определяется генетически. В связи с этим, изучение полиморфной структуры цитокиновой сети, расшифровка механизмов регуляции функциональной активности клеток иммунной системы и генетического контроля иммунного ответа может приблизить нас к решению проблемы предикции осложнений беременности, ассоциированных с воспалительным фактором.

Для многих генов про- и противовоспалительных цитокинов известны замены одиночных нуклеотидов (SNP, от англ. Single Nucleotide Polymorphism), которые располагаются в регуляторных участках генов и оказывают влияние на транскрипторную активность, соответственно увеличивая или уменьшая уровень цитокина в плазме крови [4; 5; 6].

Интерлейкин-18 (ИЛ-18) является одним из основных иммунорегулирующих цитокинов, участвующих в противовоспалительной защите организма. ИЛ-18 стимулирует продукцию ИФ $\gamma$ , ФНО $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-2, молекул адгезии и факторов апоптоза, увеличивает пролиферативную активность Т-лимфоцитов, повышает литическую активность НК-клеток. Таким образом, ИЛ-18 участвует в формировании клеточного и гуморального, врожденного и приобретенного иммунного ответов [7]. У человека ген *IL18* расположен в хромосоме 11q22.2-g22.3.

**Цель исследования:** изучить влияние полиморфных вариантов  $-137G>C$  (rs187238),  $-607G>T$  (rs1946518),  $-656A>C$  (rs5744228) промотора гена *IL18* в развитии ПРПО в сроке гестации 22–27,6 недель.

#### Материалы и методы

В исследование было включено 45 беременных женщин, которые находились на обследовании и лечении в ГБУ РО «Перинатальный центр».

Все женщины были разделены на 2 группы: в 1-ю группу вошла 31 пациентка с ПРПО в сроки 22–27,6 недель, 2-ю (контрольную) группу составили 14 женщин с клинически нормально протекающей беременностью в аналогичные сроки.

Всем беременным было проведено генотипирование полиморфных локусов гена интерлейкина-18: *IL18*  $-137G>C$ ,  $-607G>T$ ,  $-656A>C$ , а также определение концентрации ИЛ-18 в периферической крови.

Забор крови у пациенток 1-й группы осуществлялся при поступлении в отделение патологии беременных ГБУ РО ПЦ до начала антибактериальной терапии, у пациен-

ток 2-й группы - на амбулаторном этапе в эквивалентные сроки беременности.

Образцы крови, забранные в вакуумные пробирки с активатором свертывания, центрифугировали, полученную сыворотку аликвотировали и хранили при  $-70$  °С. После однократного размораживания методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию ИЛ-18 в сыворотке крови коммерческими наборами (АО «Вектор Бест», Россия) с использованием анализатора Wallac 1420 Multilaber Counter (Victor-2) («PerkinElmer», Финляндия).

Выделение геномной ДНК из периферической венозной крови, стабилизированной ЭДТА, проводили с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ГС-ПЛЮС» («ДНК-Технология», Россия). Коммерческими наборами («ДНК-Технология», Россия) определяли однонуклеотидные замены:  $-137G>C$  (rs187238),  $-607G>T$  (rs1946518),  $-656A>C$  (rs5744228) гена *IL18* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с помощью детектирующего амплификатора «ДТлайт» («ДНК-Технология», Россия).

У всех пациентов предварительно было получено информированное согласие на проведение данного исследования.

Средний возраст беременных в 1-й группе составил  $31,0 \pm 4,84$  год, в группе контроля  $29,2 \pm 4,56$  лет (U-критерий Манна-Уитни  $p > 0,05$ ), группы сопоставимы. Беременные обеих клинических групп были сопоставимы по акушерскому анамнезу. Из исследования были исключены случаи многоплодной беременности, хромосомной патологии, врожденных пороков развития у плода, а также беременность после вспомогательных репродуктивных технологий.

## Результаты

В результате исследования установлено, что у беременных с ПРПО (1-я группа) отмечалось статистически значимое повышение уровня ИЛ-18 в сыворотке крови по сравнению с уровнем данного цитокина у беременных 2-й группы ( $271 \pm 63,1$  против  $116 \pm 10,6$ ,  $p = 0,0001$ ) (табл. 1).

Нами был проведен анализ распределения частот аллелей (табл. 2) и генотипов (табл. 3) по SNP гена интерлейкина 18:  $-137G>C$  (rs187238),  $-607G>T$  (rs1946518),  $-656A>C$  (rs5744228) у 31 женщины в основной группе (1-я) и у 14 женщин группы контроля (2-я группа).

Распределение частот генотипов для полиморфных локусов  $-137G>C$  (rs187238) и  $-656A>C$  (rs5744228) гена

**Табл. 1.** Уровень интерлейкина-18 в периферической крови беременных с ПРПО и в контрольной группе

Уровень цитокина в периферической крови	1 группа (n = 31)	2 группа (n = 14)	P-value
ИЛ-18, пг/мл	$271 \pm 63,1$	$116 \pm 10,6$	0,0001

*Примечание:* сравнение в группах осуществлялось с помощью критерия Манна-Уитни.

**Табл. 2.** Частота аллелей по SNP гена интерлейкина-18 (-137G>C (rs187238), -607G>T (rs1946518), -656A>C (rs5744228)) у беременных с ПРПО и в контрольной группе

Ген, SNP, аллель	Группа 1 (n = 31)	Группа 2 (n = 14)	P-value
<b>Полиморфный локус -137G&gt;C (rs187238)</b>			
G	0,18	0,18	0,99
C	0,82	0,82	
<b>Полиморфный локус -656A&gt;C (rs5744228)</b>			
A	0,71	0,96	0,014
C	0,29	0,04	
<b>Полиморфный локус -607G&gt;T (rs1946518)</b>			
G	0,26	0,07	0,08
T	0,74	0,93	

Примечание: сравнение групп по частоте встречаемости аллели осуществлялось с помощью точного теста Фишера.

*IL18* в обеих исследуемых группах женщин соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Для частот генотипов по SNP -607G>T (rs1946518) равновесие Харди-Вайнберга не соблюдается.

Характер распределение частот аллелей полиморфного локуса -137G>C гена *IL18* одинаков в двух группах женщин, включенных в исследование. Однако, выявлено значимое отличие в распределении частот аллелей полиморфизма -656A>C гена *IL18* (табл. 2).

Так, в 1-й группе женщин частота встречаемости аллели -656C гена *IL18* составила 0,29, что статистически значимо выше по сравнению с частотой аллели -656C в группе 2 ( $p = 0,014$ ), (табл. 2). Наличие однонуклеотидной замены в промоторном участке может изменять эффективность транскрипции гена, что приводит к изменению уровня продукции интерлейкина-18.

Как видно из таблицы 3 распределение частот генотипов по исследуемому полиморфизму -656A>C гена *IL18* среди женщин двух групп, включенных в исследование, статистически значимо отличаются.

В группе контроля гомозиготами по аллели -656A гена *IL18* являлись 92,9% женщин. В группе женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек число гомозигот -656AA гена *IL18* составило 51,6%, а доля гетерозигот по полиморфизму -656A>C выше по сравнению со 2-й группой (38,7 % против 7,1%). Для гомозигот -656AA гена *IL18* выявлено снижение риска развития ПРПО [(OR = 0,08 (95% CI 0,01-0,706)].

### Обсуждение полученных результатов

Иммунный ответ имеет индивидуальные особенности у каждого из индивидуумов, при встрече с патологическими агентами может включаться как гуморальный, так и клеточный иммунитет, что имеет большое значение в реализации воспалительного процесса и защите макроорганизма в целом.

Как мы знаем, физиологически протекающая беременность сопровождается реализацией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в фетоплацентарной области.

**Табл. 3.** Частота генотипов по полиморфным вариантам гена интерлейкина-18 (-137G>C (rs187238), -607G>T (rs1946518), -656A>C (rs5744228)) у беременных с ПРПО и в контрольной группе

Ген, SNP, генотип	Группа 1 (n = 31)	Группа 2 (n = 14)	P-value
<b>Полиморфный локус -137G&gt;C (rs187238)</b>			
GG	0 (0%)	0 (0%)	0,99
GC	11 (35,5%)	5 (35,7%)	
CC	20 (64,5%)	9 (64,3%)	
<b>Полиморфный локус -656A&gt;C (rs5744228)</b>			
AA	16 (51,6)	13 (92,9%)	0,027
AC	12 (38,7%)	1 (7,1%)	
CC	3 (9,7%)	0 (0%)	
<b>Полиморфный локус -607G&gt;T (rs1946518)</b>			
GG	5 (16,2%)	1 (7,1%)	0,069
GT	6 (19,3%)	0 (0%)	
TT	20 (64,5%)	13 (92,9%)	

Примечание: сравнение групп по частоте встречаемости генотипа осуществлялось с помощью точного теста Фишера.

Цитокины являются биологически-активными эндогенными медиаторами, обеспечивающими обмен информацией между различными клетками внутри одного органа и формировании связи между органами и системами, как в физиологических условиях, так и при воздействии патогенных факторов [7].

При патологических состояниях уровень цитокинов резко возрастает, тогда как для реализации биологических эффектов при нормально протекающей беременности их выработка происходит в минимальных количествах.

Согласно данным литературы различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут оказывать влияние на уровень продукции цитокинов и, в свою очередь, на развитие и реализацию иммунного ответа.

Анализ на полиморфизм генов цитокинов – это молекулярно-генетическое исследование, которое позволяет обнаружить носительство у пациентки аллельных вариантов генов, при наличии которых возможно изменение уровня цитокинов.

Отдельные аллельные варианты генов цитокинов могут быть ассоциированы с изменением синтеза соответствующего белкового продукта, что также оказывает влияние на характер течения, возникновение определенных осложнений заболевания.

Так, в нашем исследовании при изучении уровня интерлейкина-18 в сыворотке крови пациенток с преждевременным разрывом плодных оболочек отмечалось статистически значимое увеличение концентрации белка по сравнению с пациентками из группы контроля ( $271 \pm 63,1$  против  $116 \pm 10,6$ ,  $p = 0,0001$ ).

Важно отметить, что в функционально-активных участках промотора гена ИЛ-18 обнаружено несколько одиночных нуклеотидных замен, которые могут влиять на продукцию ИЛ-18. Поэтому уровень продукции ИЛ-18 может быть обусловлен генетическими механизмами [8].

Изучив частоту встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов гена интерлейкина-18, нами были выявлены значимые отличия по полиморфизму  $-656A>C$  гена *IL18*. Среди женщин 1-й группы (ПРПО) частота встречаемости мутантной аллели  $-656C$  статистически значимо выше по сравнению с группой 2 (контроль) ( $p = 0,014$ ). Генотип  $-656CC$  полиморфизма гена *IL18* является генотипом высокого риска для развития ПРПО.

Выявленные в нашем исследовании отличия в частотах аллелей и генотипов по гену цитокина ИЛ-18 между группами женщин с ПРПО и нормально протекающей беременностью предполагают изменения в определенных звеньях цитокинового каскада. Можно предположить, что первичным звеном в нарушении нормального баланса цитокинов может выступать нарушение уровня экспрессии белка (а именно ИЛ-18) ввиду носительства мутантного варианта гена.

Согласно Цитокиновой теории заболеваний состояние здоровья и благополучия в организме в целом характеризуется постоянной сбалансированной продукцией цитокинов на низком уровне, что необходимо для поддержания гомеостаза. В свою очередь при сверхпродукции некоторых цитокинов могут возникать различные патологические состояния и заболевания, тяжесть которых варьирует от легкой до фатальной [7; 9; 10].

Таким образом, крайне важно определение наследственной генетической предрасположенности для понимания молекулярных механизмов развития воспалительных реакций в организме.

## Выводы

Данные нашего исследования показали вероятную связь полиморфизма  $-656A>C$  гена *IL18* с развитием ПРПО. Выявление носительства указанного полиморфного варианта гена у женщин в группе риска по развитию ПРПО может служить в качестве предиктивного маркера, что позволит своевременно наметить тактику ведения беременности и разработать профилактические мероприятия.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Александрова Н.В., Донников А.Е. Акушерские осложнения при беременности высокого риска. Возможности прогнозирования // *Вестник РУДН. Серия: Медицина. Акушерство и гинекология*. — 2012. — №5. — С. 104–108. [Aleksandrova NV, Donnikov AE. Akusherskie oslozhneniya pri beremennosti vysokogo riska. Vozmozhnosti prognozirovaniya. *Vestnik RUDN. Seriya: Medicina. Akusherstvo i ginekologiya*. 2012;(5):104–108. (In Russ).]
2. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунные факторы в этиологии и патогенезе осложненной беременности // *Акушерство и гинекология*. — 2012. — №1. — С. 128–136. [Sukhikh GT, Vanko KV. Immune factors in the etiology and pathogenesis of pregnancy complications. *Obstetrics and Gynecology*. 2012;(1):128–136. (In Russ).]

3. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *Am J Reprod Immunol*. 2012;(67):341–347. Doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01123.x.
4. Ризванова Ф.Ф., Пикуза О.И. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов // *Практическая медицина*. — 2010. — №45. — С. 41–42. [Rizvanova FF, Pikuza OI. Genetic diagnosis: polymorphism of cytokine genes. *Prakticheskaya meditsina*. 2010;(45):41–42. (In Russ).]
5. Силков А.Н., Шкаруба Н.С., Горева Е.П., и др. Аллельный полиморфизм и альтернативный сплайсинг в системе цитокинов. В кн.: *Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике*. / Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова. — Новосибирск: НГМУ, 2011. — С. 46–48. [Silkov AN, Shkaruba NS, Goreva EP, et al. Allelic polymorphism and alternative splicing in the cytokine system. In: *Immuno pathogenesis and immunotherapy of major human diseases: from the experiment to the clinic*. Ed by V.A. Kozlov, S.B. Sennikov. Novosibirsk; 2011. p. 46–48. (In Russ).]
6. Цыган В.Н., Иванов А.М., Камилова Т.А., и др. Генный полиморфизм иммуногенетической сигнальной системы // *Журнал инфектологии*. — 2011. — Т.3. — №2. — С. 21–27. [Tzygan VN, Ivanov AM, Kamilova TA. Genetic polymorphism of immunogenic signaling system. *Zhurnal infektologii*. 2011;3(2):21–27. (In Russ).]
7. Сташкевич, Д.С. *Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения*. — Челябинск: Цицеро, 2016. [Stashkevich DS. *Aktual'nye voprosy immunologii: sistema tsitokinov, biologicheskoe znachenie, geneticheskii polimorfizm, metody opredeleniya*. Chelyabinsk: Tsitsero; 2016. (In Russ).]
8. Якушенко В.Е. *Интерлейкин-18. Биологические эффекты и перспективы клинического применения*. Дис. ... д-ра мед. наук. — Новосибирск; 2012. [Yakushenko VE. *Interleukin-18. Biologicheskie efekty i perspektivy klinicheskogo primeneniya*. [dissertation] Novosibirsk; 2012. (In Russ).]
9. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // *Медицинский академический журнал*. — 2013. — Т.1. — №3. — С. 18–41. [Simbirtsev AS. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Medical Academic Journal*. 2013;13(3):18–41. (In Russ).]
10. Tengvall S, Che KF, Lindén A. Interleukin-26: an emerging player in host defense and inflammation. *J Innate Immun*. 2016;8(1):15–22. Doi: 10.1159/000434646.