

MOLECULAR GENETICS

Marakhovskaya T.A., Mashkina E.V.

THE STUDY OF THE ASSOCIATION OF POLYMORPHIC CYTOKINES AND GROWTH FACTORS GENE VARIANTS IN INFERTILE COUPLES

Marakhovskaya T.A., Russian Federation, Southern
Federal University, Academy of Biology and Biotechnology,
post-graduate student

Mashkina E.V., Russian Federation, Southern Federal
University, Academy of Biology and Biotechnology, PhD

Abstract

The importance of interaction genotype polymorphisms of genes *IL-1b (C-31T)*, *VEGFA (G-634C)* was established for the risk of infertility for women in infertile couples. It was found that the interaction of genotype alleles *IL-1b (C-31T)*, *IL-10 (C-592A)*, *VEGFA (G-634C)*, *TGFb1 (G915C)* associated with a reduced risk of infertility of men in infertile couples. It was revealed that a combination of polymorphisms of genes *IL-1b (C-31T)* and *IL-10 (C-592A)* in both marital genotypes is associated with the development of infertility.

Keywords: Gene polymorphism, recurrent pregnancy loss, immunological infertility, cytokines

Введение

Иммунологическое бесплодие является одной из обсуждаемых в специальной литературе причин бесплодия у людей. В России ориентировочно зарегистрировано около 5 млн. бесплодных пар, что превышает 15% от всех супружеских пар [6]. Частота инфертильных брачных союзов во всем мире составляет 10 - 20% супружеских пар репродуктивного возраста [3, 4]. В настоящее время этот показатель не имеет тенденции к снижению. Причиной бесплодия может быть как женский, так и

2d the International Conference «Research, Innovation and Education» 2015

мужской фактор, так и сочетание мужского и женского факторов.

Цитокины играют важную роль во многих процессах: образовании мужских и женских половых клеток, оплодотворении и имплантации, формировании плаценты, роста и развития эмбриона [8]. В процессе развития беременности между организмом матери и плода возникают и формируются сложные иммунологические взаимоотношения, основанные на принципе прямой и обратной связи. Эти взаимоотношения обеспечивают правильное, гармоничное развитие плода и препятствуют его отторжению как генетически «полусовместимого трансплантата» по отношению к организму матери [5]. Нарушение баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов следует рассматривать как важное патогенетическое звено в развитии бесплодия.

Исследования генов, контролирующих межклеточные взаимодействия и иммунные реакции немногочисленны и противоречивы [1, 2, 7, 9].

В связи с этим, целью данной работы было исследование частоты регистрации полиморфных вариантов - 31С-Т гена *IL-1b*, -174G-С гена *IL-6*, -592С-А и -819С-Т гена *IL-10*, -308G-А гена *TNF*, -634G-С гена *VEGFA*, G915С гена *TGFb1* среди мужчин и женщин из бесплодных супружеских пар для выявления значимых межгенных взаимодействий.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК мужчин и женщин из бесплодных супружеских пар (всего 69 образцов, из них 28 парных образцов). Пары с первичным бесплодием, в браке состоят не менее 5-6 лет. Лица, включенные в обследуемые группы, не имели анатомических отклонений, хронических инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, а также гормональных расстройств.

Контрольную группу составили 108 образцов ДНК фертильных мужчин и женщин, из них 32 парных образца.

Взятие крови и буккального эпителия проводили с соблюдением норм биоэтики с обязательным информированным согласием участников.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов ДНК-экспресс-кровь (Литех, Россия) и «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Россия). Полиморфизмы генов исследовали с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия). Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3 %

2d the International Conference «Research, Innovation and Education» 2015

агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе GelDoc (BioRad).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета MSExcel. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга, оценку различий в распределении полиморфных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 при помощи программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль"». Анализ межгенных взаимодействий проводили при помощи алгоритма снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR).

Результаты и обсуждение

Был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов отдельно по каждому полиморфизму исследуемых генов цитокинов для женщин из бесплодных супружеских пар и женщин из группы контроля, для мужчин из бесплодных супружеских пар и мужчин из контрольной группы. Статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей по каждому исследуемому полиморфизму генов цитокинов среди исследуемых групп не выявлено.

Учитывая сложный каскад взаимодействий цитокинов, который запускается при презентации антигена иммунокомпетентным клеткам, огромную роль играет изменение работы сразу нескольких элементов цитокиновой сети. Поэтому был проведен анализ межгенных взаимодействий для мужчин и женщин из бесплодных супружеских пар с помощью алгоритма снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Модель межгенных взаимодействий считали валидированной, если ее согласованность (воспроизводимость) (Cross Validation Consistency) была не меньше 9/10.

С помощью данного метода при сравнении групп женщин из бесплодных пар и контроля определена значимая модель взаимодействия генов *IL-1b* и *VEGFA*. Данная двухлокусная модель межгенного взаимодействия характеризуется коэффициентом перекрестной проверки 10/10, $\chi^2=5.79$ ($p=0.016$), OR= 2.9 (95% CI=1.20–7.05). Согласно данной модели пониженный риск развития бесплодия характерен для женщин со следующими генотипами: *-31TT IL-1b / -634GG VEGFA*; *-31CT IL-1b / -634GC VEGFA*; *-31TT IL-1b / -634GC VEGFA* (рисунок 1).

Для мужчин из бесплодных супружеских пар была выявлена значимая модель взаимодействия четырех генов - *IL-1b*, *IL-10*, *VEGFA*, *TGFb1*. Воспроизводимость модели составила

**2d the International Conference
«Research, Innovation and Education» 2015**

10/10, $\chi^2=18.15$ ($p<0.0001$), $OR=8.57$ (95% $CI=2.99-24.49$). Для мужчин гомозиготных по аллели 915G гена *TGFb1*, аллели -634G гена *VEGFA*, а так же аллели -592C гена *IL-10* и при наличии аллели -31T гена *IL-1b* характерен повышенный риск развития бесплодия. В то же время понижение риска согласно данной модели межгенного взаимодействия отмечено для мужчин гомозиготных по аллели 915G гена *TGFb1* и при наличии полиморфного варианта генов *VGFA*, *IL-1b* и *IL-10* (рисунок 2).

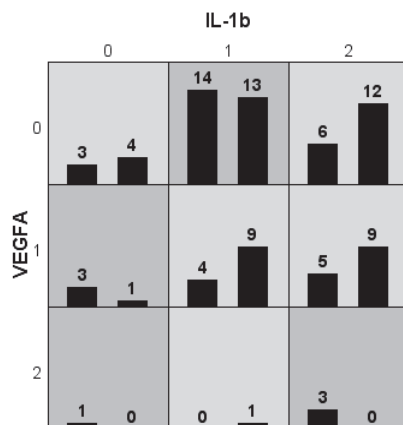


Рисунок 1 - Распределение частот двухлокусных сочетаний генотипов генов *IL-1b* и *VGFA* среди женщин (темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, левые столбики в ячейках – женщины из бесплодных пар, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по нормальной аллели; 1 – гетерозиготы; 2 – гомозиготы по полиморфизму).

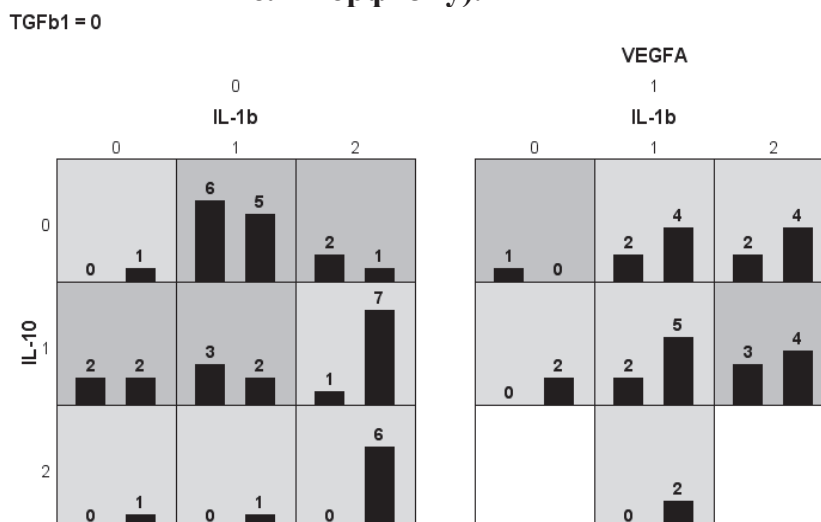


Рисунок 2 - Распределение частот сочетаний генотипов четырех генов *IL-1b*, *IL-10*, *VGFA*, *TGFb1* среди мужчин из бесплодных и фертильных супружеских пар

**2d the International Conference
«Research, Innovation and Education» 2015**

(темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, левые столбики в ячейках – бесплодные мужчины, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по нормальной аллели; 1 – гетерозиготы; 2 – гомозиготы по полиморфизму).

Так как бесплодие наблюдается в паре, нами был проведен сочетанный анализ межгенных взаимодействий в бесплодных супружеских парах.

Для этого каждой паре, исходя из генотипов супругов, был присвоен цифровой код согласно условиям для расчета программы Multifactor Dimensionality Reduction (таблица 1).

Таблица 1 – Определение цифрового кода супружеских пар для расчета межгенных взаимодействий

Генотип первого супруга	Генотип второго супруга	Общий генотип пары	Код, присвоенный паре
NN	NN	NN	0
NN	NP	NP	1
NP	NP	NP	1
NN	PP	NP	1
NP	PP	PP	2
PP	PP	PP	2

Примечания:

NN – гомозигота по нормальной аллели, PP – гомозигота по полиморфизму, NP – гетерозигота.

Если полиморфный вариант гена отсутствует в генотипе, то генотипу присваивается 0. Если присутствует хотя бы 1 полиморфная аллель, или соотношение N и P равны, то генотипу присваивается 1. Если количество мутантных аллелей в паре больше нормальных, то генотипу присваивается значение 2.

Для супружеских пар показана значимость взаимодействия генов *IL-1b* и *IL-10*. Воспроизводимость данной двухлокусной модели составила 9/10, $\chi^2=6.06$ ($p=0.014$), OR=7 (95% CI=1.32–37.15). Согласно данной модели повышенный риск развития бесплодия характерен для пар, в которых хотя бы у одного из супругов в генотипе присутствует полиморфизм либо *IL-1b*, либо *IL-10*. Одновременное присутствие обоих полиморфизмов данных генов в генотипе супругов также говорит о повышенном риске развития бесплодия (рисунок 3).

2d the International Conference «Research, Innovation and Education» 2015

Повышенный уровень *IL-1b* у лиц, имеющих аллель - *31T* гена *IL-1b* ведет к развитию острой местной воспалительной реакции, которая подавляется в меньшей степени, или не подавляется вовсе, так как для полиморфизма -*592A* гена *IL-10* характерно снижение уровня экспрессии. То есть при сочетании полиморфизмов генов про- и противовоспалительных цитокинов не происходит полноценного переключения иммунной реакции материнского организма в сторону сохранения беременности.

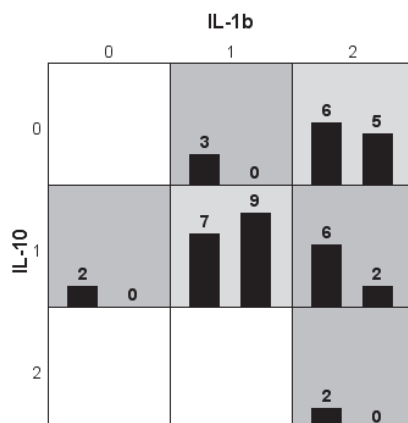


Рисунок 3 - Распределение частот двухлокусных сочетаний генотипов генов *IL-1b* и *IL-10* среди бесплодных и фертильных супружеских пар (темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, левые столбики в ячейках – бесплодные пары, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по нормальной аллели; 1 – гетерозиготы; 2 – гомозиготы по полиморфизму).

Выводы

В работе установлена значимость взаимодействия генотипов по полиморфизмам генов *IL-1b* (*C-31T*), *VEGFA* (*G-634C*) в изменении риска развития бесплодия для женщин. Для мужчин из бесплодных супружеских пар было установлено, что взаимодействие генотипов по аллельным вариантам генов *IL-1b* (*C-31T*), *IL-10* (*C-592A*), *VEGFA* (*G-634C*), *TGFb1* (*G915C*) связано со снижением риска развития бесплодия. Для бесплодных супружеских пар было выявлено, что сочетание полиморфизмов генов *IL-1b* (*C-31T*) и *IL-10* (*C-592A*) в генотипах у обоих супругов связано с развитием бесплодия.

Исследование проводили на базе кафедры генетики и НИИ биологии Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета. Работа проведена на оборудовании Центра коллективного пользования «Высокие технологии» ЮФУ, грант RFMEFI59414002.

**2d the International Conference
«Research, Innovation and Education» 2015**

Работа выполнена при финансовой поддержке
Минобрнауки в рамках проектной части государственного
задания, проект № 6.98.2014/К.

References

1. Avdeeva Zn.I. Tsitokiny i vaksiny. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal. 2009. №3. С. 22-27.
2. Ayatollahi M. Maternal serum levels of Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) in normal and preeclamptic pregnancies. International Journal of Immunology. 2005. V. 2. P. 50-55.
3. Bozhedomov V.A. Bezdetny brak: rol muzhskogo faktora (klinicheskie I organizatsionno-metodicheskie aspekty). Akusherstvo I ginekologiya. 2014. № 1. С. 70-77.
4. Güney A.I. Detection of Y chromosome microdeletions and mitochondrial DNA mutations n male infertility patients. Genet Mol Res. 2012. V. 11. I. 2. P. 1039-1048.
5. Smirnova T.L., Portnova E.V., Sergeeva V.E. Immunitet I beremennost. Vestnik Chuvashskogo universiteta. 2009. С. 79-85.
6. Yarman V.V., Mikhaylichenko V.V., Dolgov G.V., O znachenii medico-biologicheskikh factorov, vliyayushchikh na nastuplenie beremennosti v supruzheskoy pare. Andrologiya I genitalnaya khirurgia. 2013. №4. С. 28-35.
7. Kamali-Sarvestani E. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. J ReprodImmunol. 2005. V. 65. P. 171–178.
8. Medica I. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage – a meta-analysis. Reproductive BioMedicine Online. 2009. V. 19. № 3. P. 406-414.
9. Zammiti W. Association of -592C/A, -819C/T and -1082A/G interleukin-10 promoter polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion. Mol Hum Reprod. 2006. V. 12. P. 771-776.