

Golovatyuk K. P. Role of polymorphisms TNF- α gene in the development of recurrent miscarriage after in vitro fertilization in the residents of Odessa region of Ukraine. Journal of Education, Health and Sport. 2017;7(1):323 - 332. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.265805>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4218>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 754 (09.12.2016).
754 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 02.01.2017. Revised 16.01.2017. Accepted: 24.01.2017.

UDK 618.177-089.888.11:618.39-0796:575.162

ROLE OF POLYMORPHISMS TNF- ALPHA GENE IN THE DEVELOPMENT OF RECURRENT MISCARRIAGE AFTER IN VITRO FERTILIZATION IN THE RESIDENTS OF ODESSA REGION OF UKRAINE

K. P. Golovatyuk

Odessa National medical University, Ukraine;

nosenko.olena@gmail.com; info@gameta.od.ua

Summary

The frequency of genotypes and allelic variants of the TNF- α gene (-238 G > A, -308 G > A, -1031 T > C), depending on the reproductive status and evaluation of its association with recurrent miscarriage (RM) in cycles in vitro fertilization (IVF) has been studied. The residents of the Odessa region of Ukraine have been under examination. It has been revealed that typing of SNPs of genes of the immune response TNF- α (rs1799964) and TNF- α (rs1800629) may be used as an early diagnostic method and pregravidia prediction of reproductive losses in infertile women with RM after IVF. Genotypes AA^{-308G > A}, (GA + AA)^{-308G > A} and TC^{-1031C}, (TC + CC)^{-1031C} TNF- α gene were statistically significant associated with an increased risk of RM after IVF.

Key words: recurrent miscarriage, in vitro fertilization, tumor necrosis factor- α r, inheritance, polymorphism, genotype, polymerase chain reaction.

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНУ TNF-АЛЬФА В РОЗВИТКУ ЗВИЧНОГО НЕВИНОШУВАННЯ ВАГІТНОСТІ ПІСЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ ІН ВІТРО У МЕШКАНОК ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ УКРАЇНИ

К. П. Головатюк

Одеський національний медичний університет, Україна

Значна частина випадків звичного невиношування вагітності (ЗНВ) може бути пов'язаною з дизрегуляцією імунологічних чинників [1], серед яких цитокіни відіграють важливу роль [9].

Система цитокінів є єдиною і цілісною мережею, порушення в якій можуть вести до зриву саморегуляції, змін спрямованості імунної відповіді, що набуває особливої значимості на ранніх етапах розвитку ембріону. Тому надзвичайно важливо, щоб всі параметри цитокінів були в межах норми напередодні настання вагітності. Нормальний перебіг вагітності багато в чому визначається співвідношеннями імуномодулюючих та імуносупресивних ефектів в ендометрії, трофобласті, а в подальшому й в плаценті, в регуляції яких беруть безпосередню участь компоненти цитокінової системи [19, 81].

Фактор некрозу пухлин- α (TNF- α) є сильнодіючим цитокином, який продукується моноклеарними фагоцитами, природними кілерними (NK) клітинами, а також антиген-стимульованими Т-клітинами [10]. Циркуючі рівні TNF- α вище як у тварин, так і у жінок з викиднями в анамнезі в порівнянні з пацієнтками з успішними вагітностями, тому припускається, що цей цитокін пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку несприятливих репродуктивних подій [13]. Прозапальні, проапоптотичні і прокоагулянтні властивості TNF-альфа, ймовірно, вносять свій внесок в широке визнання абортивного профілю цього цитокіну [79].

Продукція цитокінів може керуватися за допомогою генетичних поліморфізмів, особливо в промоторній області. Тому останні роки зусилля дослідників зосереджені на олігонуклеотидних поліморфізмах (SNPs) генів цитокінів, які відіграють важливу роль в імплантації та гестації [14]. TNF- α знаходиться в межах лейкоцитарного класу людського III в області хромосоми 6p21.3 і має кілька функціональних ділянок поліморфізмів. Варіанти в області промотора TNF- α були раніше залучені в патогенез ЗНВ, отже, багато досліджень були спрямовані на відносини між ЗНВ в промоторній

області TNF- α при -1031T>C, -863C>A, -857C>T, -376G>A, -308G>A, -238G>A, +488G>A і ЗНВ [17]. Хоча багато досліджень пов'язують ЗНВ і поліморфізми гена TNF- α , їх роль в репродуктивній функції ще недостатньо вивчена і обговорюється.

Метою дослідження стало вивчення у мешканок Одеської області України частоти генотипів та алельних варіантів гену TNF- α (-238G>A, -308G>A, -1031T>C) в залежності від репродуктивного статусу і оцінка асоціативного зв'язку зі звичним невиношуванням вагітності, що настала в циклах запліднення ін вітро.

Матеріал та методи

Під спостереженням перебувало 240 пацієток основної групи Н з ЗНВ в циклах ЗІВ і 100 умовно здорових фертильних жінок контрольної групи К з наявністю в анамнезі хоча б одних термінових пологів і відсутністю епізодів самовільного переривання вагітності. Всі жінки були мешканками Одеської області.

ДНК для генотипування виділяли з ядер лімфоцитів периферичної крові. Для типування SNPs генів імунної відповіді використовували полімеразну ланцюгову реакцію з плавленням продуктів реакції в присутності «примикаючих» олігонуклеотидів. Для генотипування поліморфізмів гена TNF- α використовували послідовності внутрішніх та зовнішніх, прямих і зворотних праймерів для генів -238 G> A (rs361525), - 308 G > A (rs1800629) і -1031 T> C (rs1799964). TNF- α SNPs були обрані з використанням SNP бази даних геному людини (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Ампліфікацію проводили з використанням детектувального ампліфікатора ДТ-96 «DTprime» (Росія).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою електронної програми Microsoft Office 2007 for Windows XP Professional, STATISTICA 6.0 (Stat. Soft. Inc. США). Частоти алелів і генотипів поліморфних локусів, а також відповідність розподілу спостережуваних частот досліджуваних генів, які теоретично очікували за рівновагою Харді-Вейнберга, перевіряли за критерієм χ^2 . Обчислення проводили за допомогою он-лайн калькулятора для розрахунку статистики в дослідженнях «випадок-контроль» (http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php). Для оцінки сили асоціацій розраховували відношення шансів (OR). Асоціацію враховували негативною, якщо OR було менше за 1; відсутньою, при OR рівному 1; позитивною, якщо OR було більше 1. Для OR розраховували довірчий інтервал (CI) при 95% рівні значимості.

Результати та їх обговорення

Середній вік обстежених жінок основної групи Н становив $29,80 \pm 0,30$ років, а в групі К - $30,09 \pm 0,31$ ($p > 0,05$). Індекс маси тіла відповідно був $22,12 \pm 0,28$ і $22,65 \pm 0,32$ ($p > 0,05$). Переривання вагітності в групі Н в першому триместрі мали 51,25% пацієнок, у другому – 34,17%, в третьому – 14,58%. Середня кількість мимовільних викиднів після ЗІВ була $3,24 \pm 0,11$, середній термін переривання вагітності – $8,15 \pm 0,65$ тижнів.

При аналізі частоти досліджуваних алелів та генотипів виявлено, що у жінок групи Н з геном TNF- α -1031 T>C алель С зустрічалася в 2,28 і генотип ТС в 1,84 рази частіше, ніж аналогічні в контрольній групі (табл.1).

Таблиця 1

Частота алелей та генотипів генів TNF- α -238 G>A, - 308 G>A, -1031 T>C у жінок Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ, n (%)

| Алелі та генотипи | | Група Н, n=240 | Група К, n=100 | p< | Усього |
|---|----|-------------------|-------------------|--------|-------------|
| TNF-α -1031 T>C (rs1799964) | | | | | |
| Алель | T | 387 (80,63) | 183 (91,50) | 0,0005 | 570 (83,82) |
| | C | 93 (19,38) | 17 (8,50) | 0,0005 | 110 (16,18) |
| Генотип | TT | 156 (65,00) | 83 (83,00) | 0,001 | 239 (70,29) |
| | TC | 75 (31,25) | 17 (17,00) | 0,007 | 92 (27,06) |
| | CC | 9 (3,75) | 0 (0,00) | 0,05 | 9 (2,65) |
| TNF-α - 308 G>A (rs1800629) | | | | | |
| Алель | G | 319 (66,46) | 176 (88,00) | 0,0001 | 495 (72,79) |
| | A | 161 (33,54) | 24 (12,00) | 0,0001 | 185 (27,21) |
| Генотип | GG | 123 (51,25) | 76 (76,00) | 0,0001 | 199 (58,53) |
| | GA | 73 (30,42) | 24 (24,00) | 0,23 | 97 (28,53) |
| | AA | 44 (18,33) | 0 (0,00) | 0,0001 | 44 (12,94) |
| TNF-α -238 G>A (rs361525) | | | | | |
| Алель | G | 395 (82,29) | 180 (90,00) | 0,01 | 575 (84,56) |
| | A | 85 (17,71) | 20 (10,00) | 0,01 | 105 (15,44) |
| Генотип | GG | 169 (70,42) | 81 (81,00) | 0,05 | 250 (73,53) |
| | GA | 57 (23,75) | 18 (18,00) | 0,24 | 75 (22,06) |
| | AA | 14 (5,83) | 1 (1,00) | 0,05 | 15 (4,41) |

У осіб з геном TNF- α - 308 G>A в групі Н алель А реєструвалася в 2,80, частіше, ніж такі в групі К, і генотип AA в реєструвався у 18,33 % випадків, тоді як у жінок з

фізіологічним перебігом вагітності він не реєструвався. Розподіл частот алелей та генотипів гена TNF- α -238 G>A з урахуванням поправки Бонфероні не мав статистично значущої різниці.

У той же час у осіб з ЗНВ частота генотипів гена TNF- α -1031 TC (OR 1,94, 95%CI 1,10-3,42; p<0,02), -1031 TC+CC (OR 2,30, 95%CI 1,30-4,04; p<0,01) вірогідно переважала таку в контрольній групі відповідно в 1,64 і 1,84 раза відповідно загальній та доміантній моделям успадкування. Частота генотипів TNF- α - 308 GA (OR 0,35, 95%CI 0,12 – 0,98), - 308 GA+AA (OR 0,42, 95%CI 0,18-0,96; p<0,03), -1031TT (OR 0,44; 95%CI 0,25 – 0,77; p<0,01) зустрічалася у пацієток із ЗНВ в 2,74, 2,21 і в 1,25 рідше відповідно загальній та рецесивній моделям успадкування. Не виявлено асоціації генотипів TNF- α -238 G>A (табл. 1) з ЗНВ в циклах ЗІВ, розподіл частоти алелей і генотипів поліморфізму TNF- α -238 G>A у жінок з ЗНВ був однорідний з таким в групі контролю.

Аналіз мультиплікативної моделі успадкування підтвердив асоціацію алелі С гена TNF- α (rs1799964), алелі А генів TNF- α (rs1800629) і TNF- α - (rs361525) з ЗНВ після ЗІВ, в групі Н вони реєструвалися значимо частіше, ніж у осіб групи К (відповідно OR 2,59 (95% CI 1,50 – 4,47); OR 3,70 (95% CI 2,32-5,50); OR 1,94 (95% CI 1,15-3,25)) (табл. 2).

Таблиця 2

Мультиплікативна модель успадкування алелей генотипів генів TNF- α -238 G>A, - 308 G>A, -1031 T>C у жінок Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ

| Алель | Група Н, n=240 | Група К, n=100 | χ^2 | p | OR | |
|---|-------------------|-------------------|----------|--------|----------|-------------|
| | | | | | значення | 95% CI |
| TNF-α -1031 T>C (rs1799964) | | | | | | |
| T | 0,806 | 0,915 | 12,31 | 0,0005 | 0,39 | 0,22 – 0,67 |
| C | 0,194 | 0,085 | | | 2,59 | 1,50 – 4,47 |
| TNF-α - 308 G>A (rs1800629) | | | | | | |
| G | 0,665 | 0,880 | 33,08 | 9,0E-9 | 0,27 | 0,17-0,43 |
| A | 0,335 | 0,120 | | | 3,70 | 2,32-5,50 |
| TNF-α -238 G>A (rs361525) | | | | | | |
| G | 0,823 | 0,900 | 6,42 | 0,01 | 0,52 | 0,31-0,87 |
| A | 0,177 | 0,100 | | | 1,94 | 1,15-3,25 |

Вивчення асоціацій материнських генотипів генів TNF- α (rs1799964), TNF- α (rs1800629) і TNF- α (rs361525) із ЗНВ після ЗІВ за допомогою загальної моделі успадкування також показало, що генотип TC TNF- α (rs1799964) і генотип AA гена

TNF- α (rs1800629) значимо частіше зустрічався у жінок групи Н на відміну від пацієнок контрольної групи (табл. 3). Носії цих генотипів мали високу ймовірність розвитку ЗНВ при настанні вагітності після ЗІВ. Значення OR для них склали 2,22 (95% CI 1,23 – 4,00) і 45,52 (95% CI 2,77 – 746,85). Не зареєстровано статистично значущих зв'язків успадкування генотипів гену TNF- α (rs361525) із ЗНВ.

Таблиця 3

Загальна модель успадкування генотипів генів TNF- α -238 G > A, - 308 G > A, - 1031 T > C у жінок Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ

| Показник | Група Н, n=240 | Група К, n=100 | χ^2 | p | OR (95% CI) |
|---|-------------------|-------------------|----------|--------|-----------------------|
| TNF-α -1031 T>C (rs1799964) | | | | | |
| Генотип ТТ | 0,650 | 0,830 | 12,30 | 0.002 | 0.38 (0.21 – 0.68) |
| Генотип ТС | 0,313 | 0,170 | | | 2.22 (1.23 – 4.00) |
| Генотип СС | 0,038 | 0,000 | | | 8.25 (0.48 – 143.09) |
| HWE P | 1 | 0,35 | | | |
| TNF-α - 308 G>A (rs1800629) | | | | | |
| Генотип GG | 0,513 | 0,760 | 26,74 | 2.0E-6 | 0.33 (0.20 – 0.56) |
| Генотип GA | 0,304 | 0,240 | | | 1.38 (0.81 – 2.36) |
| Генотип AA | 0,183 | 0,000 | | | 45.52 (2.77 – 746.85) |
| HWE P | 9,0E-7 | 0,17 | | | |
| TNF-α -238 G>A (rs361525) | | | | | |
| Генотип GG | 0,704 | 0,810 | 5,87 | 0.05 | 0.56 (0.32 – 0.99) |
| Генотип GA | 0,238 | 0,180 | | | 1.42 (0.79 – 2.56) |
| Генотип AA | 0,058 | 0,010 | | | 6.13 (0.80 – 47.28) |
| HWE P | 1 | 0,004 | | | |

Примітка. HWE P – рівень статистичної значущості для рівноваги Харді-Вейнберга.

За домінантною моделлю успадкування, статистичну значимість має асоціація між успадкуванням генотипів ТС+СС гену TNF- α (rs1799964) і генотипу GA+AA гену TNF- α (rs1800629) з ЗНВ після ЗІВ (табл. 4). Значення OR для них склали 2,63 (95% CI 1,46 – 4,72) і 3,01 (95% CI 1,78 – 5,09). Статистично значущих зв'язків успадкування генотипів гену TNF- α (rs361525) із ЗНВ після ЗІВ не відмічали.

Таблиця 4

Домінантна модель успадкування генотипів генів TNF- α -238 G>A, - 308 G>A, - 1031 T>C у жінок Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ

| Генотип | Група Н, n=240 | Група К, n=100 | χ^2 | p | OR | |
|---|-------------------|-------------------|----------|--------|----------|-------------|
| | | | | | значення | 95% CI |
| TNF-α -1031 T>C (rs1799964) | | | | | | |
| ТТ | 0,650 | 0,830 | 10,95 | 0,0009 | 0,38 | 0,21 – 0,68 |
| ТC+CC | 0,350 | 0,170 | | | 2,63 | 1,46 – 4,72 |
| TNF-α - 308 G>A (rs1800629) | | | | | | |
| GG | 0,513 | 0,760 | 17,81 | 2,0E-5 | 0,33 | 0,20 – 0,56 |
| GA+AA | 0,488 | 0,24 | | | 3,01 | 1,78 – 5,09 |
| TNF-α -238 G>A (rs361525) | | | | | | |
| GG | 0,704 | 0,810 | 4,06 | 0,04 | 0,56 | 0,32 – 0,99 |
| GA+AA | 0,296 | 0,190 | | | 1,79 | 1,01 – 3,17 |

За рецесивною моделлю успадкування, статистично значимою є лише асоціація між успадкуванням генотипу AA гена TNF- α (rs1800629) з ЗНВ після ЗІВ – OR=45,52 (95% CI 1,78 – 746,85) (табл. 5).

Таблиця 5

Рецесивна модель успадкування генотипів генів TNF- α -238 G>A, - 308 G>A, -1031 T>C у жінок Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ

| Генотип | Група Н, n=240 | Група К, n=100 | χ^2 | p | OR | |
|---|-------------------|-------------------|----------|--------|----------|---------------|
| | | | | | значення | 95% CI |
| TNF-α -1031 T>C (rs1799964) | | | | | | |
| ТТ+ТC | 0,963 | 1,000 | 3,85 | 0,05 | 0,12 | 0,01 – 2,10 |
| CC | 0,038 | 0,000 | | | 8,25 | 0,48 – 143,09 |
| TNF-α - 308 G>A (rs1800629) | | | | | | |
| GG+GA | 0,817 | 1,000 | 21,06 | 5,0E-6 | 0,02 | 0,00 – 0,36 |
| AA | 0,183 | 0,000 | | | 45,52 | 2,77 – 746,85 |
| TNF-α -238 G>A (rs361525) | | | | | | |
| GG+GA | 0,942 | 0,990 | 3,91 | 0,05 | 0,16 | 0,02 – 1,26 |
| AA | 0,058 | 0,010 | | | 6,13 | 0,80 – 47,28 |

TNF- α є багатофункціональним прозапальним цитокином і грає важливу роль в широкому діапазоні різних захворювань. Він існує не тільки в ооцитах і гранульозних клітинах, але й в фолікулярній рідині яєчників людини. Вважається, що він пов'язаний з оваріальним апоптозом, збільшенням яєчниками стероїдної секреції та ановуляцією [80]. TNF- α сприяє апоптотичній загибелі клітин в тканинах фетальних мембран [78] і активізує коагуляцію за допомогою підвищення протромбінази fgl2 [79]. Прозапальні, проапоптотичні і прокоагулянтні властивості TNF- α , ймовірно, вносять свій внесок в широке визнання абортивного профілю цього цитокину.

Однією з вагомих причин підвищеної продукції TNF- α може бути успадкування поліморфізмів генів цитокинів. Деякі дослідження показали, що TNF- α ^{-308 G/A} поліморфізм не пов'язаний з ЗНВ [18, 19], інші дослідження дали суттєві докази про підвищений ризик ЗНВ для носіїв алелей TNF- α ^{-308A} [17, 20]. Розшарування за географічним положенням показало, що поліморфізм TNF- α ^{-308G>A} в значній мірі пов'язаний із ЗНВ для азіатів, а не для неазіатів. Показано, що TNF- α ^{-308G>A} SNP рееструється при ЗНВ у кавказьких та іранських жінок [29-32]. За результатами нашого дослідження, з ЗНВ після ЗІВ у жінок Одеської області України вірогідно асоціюється носійство алелі А, генотипу АА і GA+АА гену TNF- α . Отримані дані підтверджують роботи [24-26], в яких TNF- α ^{-308G>A} і TNF- α ^{-238G>A} поліморфізми пов'язані зі зміненою експресією TNF *in vivo* та *in vitro*.

TNF- α ^{-1031C} SNP збільшує активність промотору TNF і ліпополісахарід-індуковану TNF- α продукцію [27, 28]. За отриманими нами даними, саме TNF- α ^{-1031C} SNP найбільш характерний для асоціативного зв'язку зі ЗНВ після ЗІВ, а саме носійство алелі С, генотипів ТС і ТС+СС.

Висновки

Типування SNPs генів імунної відповіді TNF- α (rs1799964), TNF- α (rs1800629) може бути використано як один з методів ранньої діагностики і передгравідарного прогнозування репродуктивних втрат у безплідних жінок з ЗНВ після ЗІВ. Генотипи АА^{-308G>A}, (GA+АА)^{-308G>A} і ТС^{-1031C}, ТС+СС^{-1031C} гену TNF- α статистично значимо асоціюються зі збільшенням ризику звичного невиношування вагітності після ЗІВ.

Література/References:

1. Сидельникова В.М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: метод. пособия и клин. протоколы / В. М. Сидельникова. – 3-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2013. – 224 с. : ил. ISBN 978-5-98322-928-0 [Sidelnikova V. M.

Preparation and prenatal care in the women with recurrent miscarriage: study guide and protocols.- 3rd ed.- Moscow: MEDpress-inform, 2013.- 224 p. (Rus.)].

2. Association of CTLA-4 and TNF- α polymorphism with recurrent miscarriage among North Indian women / Gupta R., Prakash S., Parveen F., Agrawal S. // *Cytokine*. – 2012. – Vol. 60. – P. 456–462.

3. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women / Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Gharesi-Fard B, Sarvari J. // *J. Reprod. Immunol.* – 2005. – Vol. 65, N 2. – P. 171–178.

4. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause / Prigoshin N., Tambutti M., Larriba J. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2004. – Vol. 52, N 1. – P. 36–41.

5. Fortunato S.J. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6 / Fortunato S.J., Menon R. // *Placenta*. – 2003. – Vol. 24, N 10. – P. 922–928.

6. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction / Ozaki K., Ohnishi Y., Iida A. [et al.] // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 32, N 4. – P. 650–654.

7. Hehlgans T. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games / T. Hehlgans, K. Pfeffer // *Immunology*. – 2005. – Vol. 115, N 1–20.

8. HLA and tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Okinawa lung cancer patients: comparative study with mainland Japan lung cancer patients / Hagihara M., Shimura T., Sato K. [et al.] // *Hum. Immunol.* – 1995. – Vol. 43, N 2. – P. 95–100.

9. Kuar A. Recurrent pregnancy loss: TNF- α and IL-10 polymorphisms / A. Kuar // *J. Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 4. – P. 91–94.

10. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production / Messer G., Spengler U., Jung M.C. [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1991. – Vol. 173, N 1. – P. 209–219.

11. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese / Higuchi T., Seki N., Kamizono S. [et al.] // *Tissue Antigens*. – 1998. – Vol. 51, N 6. – P. 605–612.

12. Preterm birth and single nucleotide polymorphisms in cytokine genes / Q. Zhu, J. Sun, Y. Chen // *Transl. Pediatr.* – 2014. – Vol. 3, N 2. – P. 120–134.

13. Recurrent miscarriage and variant alleles of mannose binding lectin, tumour necrosis factor and lymphotoxin-a genes / Baxter N., Sumiya M., Cheng S. [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2001. – Vol. 126, N 3. – P. 529–534.
14. Relationship between expression of COX-2, TNF- α , IL-6 and autoimmune-type recurrent miscarriage / Hua F., Li C.H., Wang H., Xu H.G. // *Asian. Pac. J. Trop. Med.* – 2013. – Vol. 6, N 990–994.
15. Rull K. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions / Rull K., Nagiraja L., Laan M. // *Front. Genet.* – 2012. – N 3. –P. 34.
16. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion / Knackstedt M.K., Zenclussen A.C., Hertwig K. [et al.] // *American Journal of Reproductive Immunology.* – 2003. – Vol. 49, N 4. – P. 210–220.
17. The promoter -1031(T/C) polymorphism in tumor necrosis factor-alpha associated with polycystic ovary syndrome / Yun J.-H., Choi J.-W., Lee K.-J. [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2011. – Vol. 9. – P. 131.
18. The relationship between cytokine gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion in Saudi females / Alkhuriji A.F., Alhimaidi A.R., Babay Z.A., Wary A.S. // *Saudi Medical Journal.* – 2013. – Vol. 34. –P. 484–489.
19. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha)-1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese / Soga Y., Nishimura F., Ohyama H. et al. // *J. Clin. Periodontol.* –2003. – Vol. 30, N 6. – P. 524–531.
20. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage / Finan R.R., Al-Irhayim Z., Mustafa F.E. [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 186–192.
21. Tumor Necrosis Factor- α Gene Polymorphisms in Korean Patients With Recurrent Spontaneous Abortion / Lee B. E., Jeon Y. J., Shin J. E. [et al.] // *Reprod Sci.* – 2013. – Vol. 20, N 4. – P. 408–413.