

Golovatyuk K. P. Association of gene polymorphisms of interleukin-10 (IL-10) with recurrent miscarriage (RM) after fertilization in vitro (IVF). Journal of Education, Health and Sport. 2017;7(2):489-497. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.399309> <http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4351>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 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: 02.02.2017. Revised 24.02.2017. Accepted: 27.02.2017.

ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISMS OF INTERLEUKIN-10 (IL-10) WITH RECURRENT MISCARRIAGE (RM) AFTER FERTILIZATION IN VITRO (IVF)

K. P. Golovatyuk

Odessa National Medical University, Ukraine

nosenko.olena@gmail.com

Summary

The objective: to study genotype frequencies and allelic variants of gene IL-10^{-1082G>A} (rs1800896), depending on the reproductive status and evaluation association with RM after IVF among the residents of Odessa region of Ukraine. Under supervision there were 240 patients of the main group with the RM after IVF and 100 apparently healthy fertile women in the control group K with a history of at least one term delivery and lack of spontaneous abortion episodes. SNPs typing of the genes for immune response in was used the polymerase chain reaction with the melting reaction products in the presence of "adjacent" oligonucleotides. It has been established that the carriers of AA genotype of the gene IL-10^{-1082G>A}, which have been women-residents of Odessa region of Ukraine, had a high probability of occurrence of RM during pregnancy after IVF (OR 2,56; 95% CI 1,51 - 4,35). Typing of SNPs of the immune response gene IL-10 (rs1800896) can be used as a method of early diagnosis and pregravid prediction of reproductive losses in women with RM after IVF.

Key words: infertility, in vitro fertilization, recurrent miscarriage, cytokines, interleukin-10, gene polymorphism, inheritance.

**АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА ІНТЕРЛЕЙКІНА-10 (IL-10)
ЗІ ЗВИЧНИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ (ЗНВ)
ПІСЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ ІН ВІТРО (ЗІВ)**

К. П. Головатюк

Одеський національний медичний університет

Вступ. ЗІВ міцно увійшло в медичну практику як визнаний метод досягнення ефективності лікування при безплідності навіть в самих безнадійних ситуаціях [1]. Відповідно до світової статистики, сприятливий результат вагітності після ЗІВ має місце в 73 % випадків, у 21 % жінок вагітність переривається в період до 18-20 тижнів [2].

Одним з важливих чинників самовільного переривання вагітності є порушення секреції цитокінів та співвідношення їх продукції Th1-, Th2-, Th17- і Threg-клітинами. IL-10 являє собою плейотропний цитокін, що продукується активованими Th2-клітинами, В-клітинами, моноцитами і макрофагами, які відіграють центральну роль в підтримці материнської толерантності до плода [3]. Він пригнічує секрецію прозапальних цитокінів Th1-типу лімфоцитами і активованими макрофагами [4, 5].

Оскільки цитокіни є медіаторами міжклітинних взаємодій, зміна характеру функціонування генів цитокінової мережі тягне за собою зміну в регуляції експресії і функціонування цілого ряду метаболічних каскадів. При зміні концентрацій про- та протизапальних цитокінів можливо значне підвищення кількості апоптичних клітин і порушення функціонування трофобласта в цілому [4]. Зниження виробництва IL-10 пригнічує розвиток кровоносних судин, тим самим блокує ангіогенез і погіршує розвиток судин [6]. Все вищеперераховане в кінцевому рахунку приводить до викидня.

Ген IL-10 розташований на хромосомі 1 в 1q31-32 положенні. Існує декілька функціональних одонуклеотидних поліморфізмів (SNPs), які контролюють секрецію IL-10: SNP промотора -1082 G>A (rs1800896), -819 T>C (rs1800871) і -592 A> C (rs1800872) [3]. Асоціація SNP промотора IL-10 з повторними викиднями повідомлялося в декількох дослідженнях, але з суперечливими і непереконливими результатами [5].

Метою дослідження стало вивчення у мешканок Одеської області України частоти генотипів та алельних варіантів гену IL-10^{-1082G>A} (rs1800896) 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 знаходилося 240 пацієнток основної групи Н з ЗНВ після 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, які проходили лікування безплідності в ТОВ «Медичному центрі репродуктивного здоров'я «Гамета»» м. Одеси і/або Університетській клініці Одеського національного медичного університету «Центр відновної та реконструктивної медицини». Всі жінки були мешканками Одеської області України.

Молекулярно-генетичні дослідження проводилися в молекулярно-генетичній лабораторії ТОВ «Діагностичний центр «Євгеніка»» (зав. лаб. к. біол. н. Е.Т. Макшаєва) м. Одеси. ДНК виділяли з ядер лімфоцитів периферичної крові з використанням набору «Пробо ГС» (ТОВ «НПО ДНК-Технологія», Росія) відповідно інструкціям фірми-виробника. Для типування SNPs генів імунної відповіді використовували полімеразну ланцюгову реакцію з плавленням продуктів реакції в присутності «примикаючих» олігонуклеотидів. Для генотипування поліморфізмів гена IL-10 (rs1800896) використовували послідовності внутрішніх та зовнішніх, прямих і зворотних праймерів для гена -1082 G > A. IL-10 SNPs були обрані з використанням SNPs 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) і 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 $22,65 \pm 0,32$ кг/м² ($p > 0,05$). 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 з ЗНВ після ЗІВ з геном IL-10^{-1082G>A} (rs1800896) алель А зустрічалася статистично значимо частіше в 1,41 і генотип АА в 1,84 раза частіше, ніж аналогічні в контрольній групі (табл.1).

Таблиця 1

Частота алелей та генотипів гена IL-10^{-1082G>A} (rs1800896) у жінок Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ, n (%)

Алелі та генотипи		Група Н, n=240	Група К, n=100	p<	Усього
Алель	G	163 (33,96)	106 (53,00)	3,7E-06	269 (39,56)
	A	317 (66,04)	94 (47,00)	3,7E-06	411 (60,44)
Генотип	GG	27 (11,25)	29 (29,00)	5,8E-05	56 (16,47)
	GA	109 (45,42)	48 (48,00)	0,663	157 (46,18)
	AA	104 (43,33)	23 (23,00)	0,00041	127 (37,35)

Аналіз мультиплікативної моделі успадкування підтвердив асоціацію алелі А гена IL-10 (1800896) з ЗНВ після ЗІВ OR 2,19 (95% CI 1,57-3,07) (табл. 2).

Таблиця 2

Мультиплікативна модель успадкування алелей гена IL-10^{-1082G>A} (rs1800896) 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
G	0,340	0,530	21,41	4,0E-6	0,46	0,33-0,64
A	0,660	0,470			2,19	1,57-3,07

Вивчення асоціацій материнських генотипів гена IL-10 (1800896) із ЗНВ після ЗІВ за допомогою загальної моделі успадкування показало, що генотип АА гена IL-10 (1800896) значимо частіше реєструвався у жінок групи Н на відміну від пацієнток контрольної групи (табл. 3). Носії цього генотипу мали високу ймовірність розвитку

ЗНВ при настанні вагітності після ЗІВ. Значення OR для нього склало 2,56 (95% CI 1,51 – 4,35).

Таблиця 3

**Загальна модель успадкування генотипів гена IL-10^{-1082G>A} (rs1800896) у жінок
Одеської області України з ЗНВ після ЗІВ**

Показник	Група Н, n=240	Група К, n=100	χ^2	p	OR	
					знач.	95% CI
Генотип GG	0,113	0,290	21,42	2,0E-5	0,31	0,17 – 0,56
Генотип GA	0,454	0,480			0,90	0,56 – 1,44
Генотип AA	0,433	0,230			2,56	1,51 – 4,35
HWE P	0,85	0,71				

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

За домінантною моделлю успадкування, статистичну значимість мала асоціація між успадкуванням генотипів GA+AA гена IL-10 (1800896) з ЗНВ після ЗІВ проти генотипа GG (табл. 4). Значення OR склало 3,22 (95% CI 1,79–5,81) (табл. 4).

Таблиця 4

**Домінантна модель успадкування генотипів гена IL-10^{-1082 G>A} (rs1800896) 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
GG	0,113	0,290	16,17	6,0E-5	0,31	0,17-0,56
GA+AA	0,888	0,710			3,22	1,79-5,81

За рецесивною моделлю успадкування, статистично значимою була асоціація між успадкуванням генотипу AA гена IL-10 (1800896) з ЗНВ після ЗІВ проти генотипу GG+GA – OR=2,56 (95% CI 1,51 – 4,35) (табл. 5).

**Рецесивна модель успадкування генотипів гена IL-10^{-1082 G>A} (rs1800896) 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
GG+GA	0,567	0,770	12,47	0,0004	0,39	0,23-0,66
AA	0,433	0,230			2,56	1,51-4,35

IL-10 функціонує як життєво важливий міст, який пов'язує імунітет, плацентарний ангіогенез і гіпоксію в материнсько-плодовому інтерфейсі [2]. Оскільки цитокіни є медіаторами міжклітинних взаємодій, зміна характеру функціонування генів цитокінової мережі тягне за собою зміну в регуляції експресії і функціонування цілого ряду метаболічних каскадів. При зміні концентрацій про- та протизапальних цитокінів можливо значне підвищення кількості апоптичних клітин і порушення функціонування трофобласта в цілому [4].

G / A поліморфізм в положенні -1082 (rs1800896) в промоторній області IL-10 пов'язаний як з підвищувальною регуляцією, так і понижувальною IL-10, що в свою чергу призводить до нормальної вагітності або мимовільного абортів, відповідно. Заміна алелі А замість G алелі в -1082 положенні скорочує виробництво IL-10, таким чином демпінгує материнську імунну відповідь, посилює ушкодження тканин плода і, таким чином, приводить до мимовільного абортів [6].

Жінки зі скороченням виробництва IL-10, може бути чутливим до запальних ефектів, в свою чергу, схильні до підвищеного ризику по відношенню до кількох розладів під час вагітності, в результаті чого настає несприятливий результат вагітності. Іншими словами, зниження виробництва IL-10 сприяє погіршенню плацентарного процесу розвитку з підвищеною частотою самовільних абортів [7].

Розподіл генотипів та алелей поліморфізмів гену IL-10^{-1082 G>A} показав значну зміну в різних популяціях. Дослідження, проведене F. Parveen et al. (2013) показали значну асоціацію алелі А у північних індійських жінок з невиношуванням вагітності [5]. I. Medica et al. (2009), які провели мета-аналіз 635 жінок з викиднями, виявили статистично значущу асоціацію алеля А з викиднями [8]. C.L. Bohiltea, V.E. Radoi (2014) продемонстрували сильну асоціацію для поліморфізмів IL-10^{-1082 G>A} у 69 румунських жінок з ідіопатичним рецидивуючим мимовільним абортів [9]. Навпаки, J.

Karhukorpi et al. (2001) не показали ніяких істотних відмінностей в генотипі і алелях поліморфізмів IL-10^{-1082 G>A} у фінських осіб з самовільним абортom і жінок з фізіологічним перебігом вагітності [10]. A.V. Alkhuriji et al. (2013) вивчили 65 саудівських жінок з ЗНВ і 65 жінок контролю і не виявили ніяких істотних відмінностей в розподілі частот генотипів IL-10^{-1082 G>A} в обох групах [11]. M. Bahadori et al. (2014) зазначили відсутність статистично значущої зв'язку частот поліморфізмів IL-10^{-1082 G>A} серед іранських жінок з викиднями [12]. Ці розбіжності можуть бути пояснені етнічними відмінностями дослідних комісій, а також зміни в піддослідних. Дослідження M. Vidyadhari et al. (2015) показало статистично значуще більш високу частоту генотипу AA та алелі А гену IL-10^{-1082 G>A} у індійських жінок з ЗІВ без успішних вагітностей в порівнянні з жінками з наявністю термінових пологів. Нарешті, отримані результати в нашому дослідженні підтвердили важливість генотипу AA і алелі А гену IL-10^{-1082 G>A} в якості важливого фактора ризику в етіології самовільних абортів після запліднення ін вітро у жінок одеської області України.

Висновки. Типування SNPs гену імунної відповіді IL-10 (rs1800896) може бути використано як один з методів ранньої діагностики і передгравідарного прогнозування репродуктивних втрат у безплідних жінок з ЗНВ після ЗІВ. Генотипи AA^{-1082G>A} гену IL-10 (rs1800896) статистично значимо асоціюються зі збільшенням ризику звичного невиношування вагітності після ЗІВ. Перспективним напрямком подальших досліджень є пошук методів цитокінуправляючої терапії при передгравідарній підготовці та під час ранніх термінів вагітності.

Література

1. Рудакова Е.Б. Оптимизация тактики ведения беременности после ЭКО и ПЭ, осложненной угрозой прерывания [Электронный ресурс] / Е.Б.Рудакова, Т.В.Есипович // Репродуктивная медицина. – 2014. – Режим доступа: <http://repromed.kz/pregnancycontrol/39-optimizaciya-taktiki-vedeniya-beremennosti-posle-eko-i-pe-oslozhnennoy-ugrozoy-preryvaniya.html>. – Заголовок с экрана.
2. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in northeastern Iran / Ghazaey S., Keify F., Mirzaei F. [et al.] // Int. J. Fertil. Steril. – 2015. – Vol. 9, № 1. – P.47-54.
3. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms and changes in IL-10 secretion in women with idiopathic recurrent miscarriage / Qaddourah R.H., Magdoud K., Saldanha F.L. [et al.] // Hum. Reprod. – 2014. – Vol. 29, N 5. – P. 1025-34.

4. Анализ экспрессии гена IL-10 в децидуальной и хорионических тканях при невынашивании беременности [Электронный ресурс] / Машкина Е.В., Коваленко К.А., Миктадова А.В. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5.
5. Parveen F. Cytokine gene polymorphisms in northern Indian women with recurrent miscarriages / Parveen F., Shukla A., Agarwal S. // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 99. – P. 433-440.
6. A functional polymorphism in the promoter region of interleukin-10 gene increases the risk for spontaneous abortions—a triad study / M. Vidyadhari, M. Sujatha, P. Krupa [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2015. – Vol. 32, N 7. – P. 1129–1134.
7. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss / Babbage S.J., Arkwright P.D., Vince G.S. [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2001. – Vol. 1. – P. 21–7.
8. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage—a meta-analysis / Medica I., Ostojic S., Perez N. [et al.] // Reprod. Bio.Med. Online. – 2009. – Vol. 19. – P. 406–14.
9. Bohiltea C.L. Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Romanian population / Bohiltea C.L., Radoi V.E. // Iran. J. Reprod. Med. – 2014. – Vol. 12. – P. 617–622.
10. The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G A) is not a major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions / Karhukorpi J., Leitinen T., Karttunen R., Tiilikainen A.S. // Mol. Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 17. – P.201-203.
11. 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 Med. J. – 2013. – Vol. 34. – P. 484–489.
12. IL-6, IL-10 and IL-17 gene polymorphisms in Iranian women with recurrent miscarriage / Bahadori M., Saeed Zarei S., Zarnani A.H. [et al.] // Iran. J. Immunol. – 2014. – Vol. 11. – P. 97–104.

References

1. Rudakova EB, Esipovich TV. Optimization of the tactics of managing pregnancy after IVF and PE, complicated by the threat of interruption. Reproductive medicine. 2014. Access mode: <http://repromed.kz/pregnancycontrol/39-optimizaciya-taktiki-vedeniya-beremennosti-posle-eko-i-pe-oslozhnennoy-ugrozoy-preryvaniya.html>.

2. Ghazaey S, Keify F, Mirzaei F. et al. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in northeastern Iran. *Int J Fertil Steril*. 2015; 9(1): 47-54.
3. Qaddourah RH, Magdoud K, Saldanha FL et al. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms and changes in IL-10 secretion in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2014; 29(5): 1025-34.
4. Mashkina EV, Kovalenko KA, Miktadova AV et al. Analysis of IL-10 gene expression in decidual and chorionic tissues during miscarriage. *Modern problems of science and education*. 2013; 5.
5. Parveen F, Shukla A, Agarwal S. Cytokine gene polymorphisms in northern Indian women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2013; 99; 433-440.
6. Vidyadhari M, Sujatha M, Krupa P et al. A functional polymorphism in the promoter region of interleukin-10 gene increases the risk for spontaneous abortions – a triad study. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(7): 1129–1134.
7. Babbage SJ, Arkwright PD, Vince GS et al. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2001; 1: 21–7.
8. Medica I, Ostojic S, Pereza N. et al. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage – a meta-analysis. *Reprod Bio Med Online*. 2009; 19: 406–14.
9. Bohiltea CL, Radoi VE. Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Romanian population. *Iran J Reprod Med*. 2014; 12: 617–622.
10. Karhukorpi J, Leitinen T, Karttunen R, Tiilikainen AS. The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G A) is not a major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions. *Mol Hum Reprod*. 2001; 17: 201-203.
11. Alkhuriji AF, Alhimaidi AR, Babay ZA, Wary AS. The relationship between cytokine gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion in Saudi females. *Saudi Med J*. 2013; 34: 484–489.
12. Bahadori M, Saeed Zarei S, Zarnani AH et al. IL-6, IL-10 and IL-17 gene polymorphisms in Iranian women with recurrent miscarriage. *Iran J Immunol*. 2014; 11: 97–104.