

10.18522/2308-9709-2024-50-8

Генетическая изменчивость толл-подобных рецепторов при невынашивании беременности

Суходолова Т.А., Свиридова А.В., Машкина Е.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, tatyana_sukhodolova@mail.ru

Аннотация

Невынашивание беременности представляет собой значимую медицинскую проблему, затрагивающую от 10 до 25% всех зарегистрированных беременностей у женщин репродуктивного возраста. Толл-подобные рецепторы (TLR) играют ключевую роль в иммунной толерантности и защите организма от инфекций во время беременности. Целью данного исследования было изучение взаимосвязи аллелей генов *TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile)* и *TLR6 (Ser249Pro)* с изменением риска невынашивания беременности в I триместре у женщин Ростовской области. Было исследовано 94 образца ДНК, выделенных из крови женщин с нормальным течением беременности (контроль – 48 образцов) и невынашиванием беременности (23 - самопроизвольный аборт, 23 - неразвивающаяся беременность). По результатам исследования полиморфизм *Asp299Gly* и *Thr399Ile* гена *TLR4*, а также

Ser249Pro гена *TLR6* не показали значимой ассоциации с изменением риска невынашивания беременности.

Ключевые слова: невынашивание беременности, иммунная система, самопроизвольный аборт, полиморфизм гена, *TLR4*, *TLR6*

Genetic variability of immune system factors in miscarriage

Sukhodolova T.A., Sviridova A.V., Mashkina E.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia; tatyana_sukhodolova@mail.ru

Abstract

Miscarriage is a significant medical problem affecting 10 to 25% of all registered pregnancies in women of reproductive age. Toll-like receptors (TLRs) play a key role in immune tolerance and protecting the body from infections during pregnancy. The aim of this study was to investigate the relationship of *TLR4* gene alleles (*Asp299Gly*, *Thr399Ile*) and *TLR6* gene alleles (*Ser249Pro*) with the altered risk of miscarriage in the first trimester in women from the Rostov region. 94 DNA samples were examined, isolated from the blood of women with normal pregnancy (control - 48 samples) and miscarriage (23 - spontaneous abortion, 23 - non-developing pregnancy). According to the study, the *Asp299Gly* and *Thr399Ile* polymorphisms of the *TLR4* gene, as well as the *Ser249Pro* polymorphism of the *TLR6* gene, showed no significant association with the altered risk of miscarriage.

Keywords: miscarriage, immune system, spontaneous abortion, gene polymorphism, *TLR4*, *TLR6*

Частота невынашивания беременности (НБ) составляет от 10 до 25 % от общего числа зарегистрированных беременностей у женщин репродуктивного возраста, при этом от 10 до 15 % первых беременностей заканчиваются неудачно. В России эта частота среди молодых беременных достаточно высока и составляет от 15 до 23 % всех зарегистрированных случаев беременности (Gabrielyan et al., 2023). От 40 до 80 % случаев невынашивания беременности происходят в I триместре. В клинической практике у 45–50% женщин не удается выявить точную причину самопроизвольного прерывания беременности (URL: <https://www.medison.ru/si/art225.htm>).

Невынашивание беременности рассматривается как мультифакториальное заболевание, возникающее вследствие взаимодействия множества генетических локусов и большого числа внешних и внутренних факторов. В настоящее время наибольший интерес вызывают генетические, тромбофилические и иммунные факторы, так как они остаются наименее изученными.

В последние годы особое внимание уделяется взаимодействию между плодом и матерью и вкладу данных процессов в характер течения беременности. С иммунологической точки зрения, решающее значение имеет взаимодействие различных эмбриональных и материнских клеток, необходимое для успешной имплантации. Полуаллогенный плод должен восприниматься иммунной системой матери как собственный, чтобы избежать отторжения. Эти важные процессы на молекулярном уровне должны быть тщательно скоординированы (Warning et al., 2011).

Толл-подобные рецепторы (TLR) выполняют критически важную функцию в иммунной системе, обеспечивая первую линию защиты организма от инфекций. Они распознают консервативные структуры микроорганизмов, таких как бактерии, вирусы и грибы, и активируют клеточный иммунный ответ (Medzhitov, 2001;

Pasare, Medzhitov, 2005). Например, TLR4 специфически связывается с липополисахаридом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, инициируя воспалительные реакции.

Однако роль TLR не ограничивается только реакцией на инфекции. Существуют данные, указывающие на их участие в других биологических процессах, не связанных напрямую с патогенами. Например, TLR могут влиять на рост опухоли (Бережная, 2013), апоптоз (Salaun, 2007) и тканевый гомеостаз (Щебляков и др., 2010). В экспериментах на животных было показано, что Толл-подобные рецепторы играют роль в патогенезе самопроизвольных выкидышей посредством регуляции распада простагландинов (Wang, Hirsch, 2003). Таким образом, TLR являются важными компонентами иммунной системы, обеспечивающими защиту от инфекций, а также могут участвовать в более широком спектре биологических процессов, влияющих на здоровье организма. Поэтому изучение влияния группы генов *TLR* на течение беременности является актуальной задачей на сегодняшний день.

Целью данного исследования явилось изучение взаимосвязи аллелей генов *TLR4* (*Asp299Gly*, *Thr399Ile*) и *TLR6* (*Ser249Pro*) с изменением риска невынашивания беременности в I триместре у женщин Ростовской области.

Материал и методы

Материалом для исследования стали образцы ДНК, выделенные из крови женщин с нормальным течением беременности и невынашиванием беременности (94 образца: 48 - контрольная группа, 23 - самопроизвольный аборт, 23 - неразвивающаяся беременность). Из исследования были исключены женщины с диагностированными инфекционными заболеваниями во время беременности.

Выделение ДНК из периферической крови проводили термокоагуляционным методом с использованием коммерческого набора «ДНК-Экспресс» (Литех, Россия). Однонуклеотидные замены исследовали методом аллель-специфичной

Суходолова Т. А., Свиридова А. В., Машкина Е. В., Генетическая изменчивость толл-подобных рецепторов при невынашивании беременности // «Живые и биокосные системы». – 2024. – № 50; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-50/article-8>; DOI: 10.18522/2308-9709-2024-50-8

ПЦР с использованием наборов реагентов «SNP-экспресс» (Литех, Россия). Для визуализации продуктов ПЦР использовали метод горизонтального электрофореза в 2,5 %-ном агарозном геле.

Соответствие распределения частот генотипов равновесию по Харди-Вайнбергу определяли с использованием Hardy-Weinberg equilibrium calculator в программе <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg>. Оценку различий в распределении аллельных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 . Анализ гаплотипов проводили в программе «Haploview» (<https://www.broadinstitute.org/haploview/downloads>). Оценку роли взаимодействий между исследуемыми генетическими локусами проводили с использованием программы Multifactor Dimensionality Reduction (MDR).

Результаты исследования и их обсуждение

По двум исследуемым однонуклеотидным заменам в гене *TLR4* полученное распределение частот генотипов в контрольной группе соответствует равновесию по Харди-Вайнбергу. По полиморфизму *Asp299Gly* (*896A>G*) гена *TLR4* (таблица 1) в обеих исследуемых группах преобладали гомозиготы по аллели *A* (частота данной аллели в контрольной группе – 0,83, в группе НБ – 0,9). Частота этого генотипа в контроле составила 73 %, среди женщин с НБ – 84 %. Доля гетерозигот и гомозигот по аллели *G* значительно меньше (11 % и 2 % соответственно в группе НБ; 21 % и 6 % - в группе контроля). Распределение частот аллелей и генотипов в двух группах женщин одинаково. Полиморфизм *Asp299Gly* не ассоциирован с изменением риска прерывания беременности.

Таблица 1 – Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму 896A>G гена TLR4 в исследуемых группах женщин

Генотип, аллель	Невынашивание беременности n=45	Контрольная группа n=48	χ^2	p
A	0,9	0,833	0,26	1,25

<i>G</i>	0,1	0,167		
<i>A/A</i>	38 (84,4 %)	35 (72,92 %)	1,9	0,39
<i>A/G</i>	5 (11,1 %)	10 (20,83 %)		
<i>G/G</i>	2 (4,4 %)	3 (6,25 %)		

Для полиморфизма *Thr399Ile* (*1196C>T*) гена *TLR4* (таблица 2) были получены аналогичные результаты. В обеих исследуемых группах преобладали гомозиготы *CC*. Частота данного генотипа в контрольной группе – 88 %, а среди женщин с невынашиванием беременности – 86%. Доля гетерозигот в контроле – 12 %, в группе НБ – 11 %. Гомозиготы *TT* в контрольной группе не были обнаружены, а в группе НБ составили 3 %. Распределение частот аллелей и генотипов в обеих группах женщин не отличается.

Таблица 2 – Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *1196C>T* гена *TLR4* в исследуемых группах женщин

Генотип, аллель	Невынашивание беременности n=35	Контрольная группа n=43	χ^2	p
<i>C</i>	0,91	0,94	0,13	0,72
<i>T</i>	0,09	0,06		
<i>C/C</i>	30 (85,7 %)	38 (88,4 %)	1,25	0,54
<i>C/T</i>	4 (11,4 %)	5 (11,6 %)		
<i>T/T</i>	1 (2,9 %)	0 (0 %)		

Для однонуклеотидных замен в гене *TLR4* был проведен анализ гаплотипов (рисунок 1). Неравновесие сцепления (linkage disequilibrium (LD)) оценивается путем вычисления значений D' (coefficient of linkage disequilibrium), r^2 (correlation coefficient) и LOD (logarithm of the odds ratio). Параметры имеют высокие значения ($D'=0,735$; $r^2=0,283$; $LOD=5,27$), что говорит о высоком уровне сцепления. Исследуемые однонуклеотидные замены расположены друг от друга на расстоянии всего 300 нуклеотидов. Это снижает вероятность кроссинговера между ними и обуславливает их сцепленное наследование.

Суходолова Т. А., Свиридова А. В., Машкина Е. В., Генетическая изменчивость толл-подобных рецепторов при невынашивании беременности // «Живые и биокосные системы». – 2024. – № 50; URL:

<https://jbks.ru/archive/issue-50/article-8>; DOI: 10.18522/2308-9709-2024-50-8

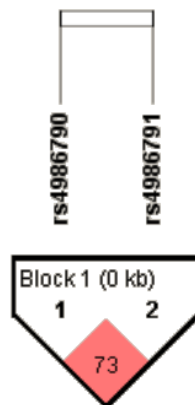


Рисунок 1 – Структура гаплотипа исследуемых замен rs4986790 (*Asp299Gly*) и rs4986791 (*Thr399Ile*) гена *TLR4* (в ромбе на пересечении двух SNP указано значение D' , умноженное на 100. Красный цвет ромба соответствует высокому уровню сцепления ($D' < 1$ и $LOD > 2$))

В таблице 3 представлены результаты оценки частот гаплотипов гена *TLR4* в двух группах женщин. Наиболее часто в обеих группах женщин встречается гаплотип *299Asp-399Thr* (83,2 % и более). Частота гаплотипа *299Asp-399Ile* среди женщин с невынашиванием беременности в 35 выше по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Однако из-за небольшого размера выборки эти различия статистически не значимы. Ни один из представленных вариантов гаплотипов не ассоциирован с изменением риска невынашивания беременности.

Таблица 3 – Ассоциация гаплотипов гена *TLR4* с изменением риска невынашивания беременности

Гаплотип		Частота (НБ), %	Частота (контроль), %	χ^2	p
<i>Asp299Gly</i>	<i>Thr399Ile</i>				
<i>Asp</i>	<i>Thr</i>	86,2	83,2	0,34	0,56
<i>Asp</i>	<i>Ile</i>	3,5	0,1	3,03	0,082
<i>Gly</i>	<i>Thr</i>	5,8	9,5	0,9	0,34
<i>Gly</i>	<i>Ile</i>	4,5	7,2	0,61	0,44

Для полиморфизма *Ser249Pro* ($745C > T$) гена *TLR6* (табл. 4) так же не было установлено ассоциации с изменением риска НБ. В группах преобладали

Суходолова Т. А., Свиридова А. В., Машкина Е. В., Генетическая изменчивость толл-подобных рецепторов при невынашивании беременности // «Живые и биокосные системы». – 2024. – № 50; URL:

<https://jbks.ru/archive/issue-50/article-8>; DOI: 10.18522/2308-9709-2024-50-8

гетерозиготы и гомозиготы по аллели *T* (частота данной аллели в контрольной группе – 0,63, в группе НБ – 0,58). Частота этих генотипов в контроле составила 29 % и 49 % соответственно, а среди женщин с НБ – 39 % для обоих генотипов. Доля гомозигот по аллели *C* меньше (23% в контрольной группе и 22 % в группе НБ). Распределение частот аллелей и генотипов в двух группах женщин одинаково ($p > 0,05$).

Таблица 4 – Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму 745C>T гена *TLR6* в исследуемых группах женщин

Генотип, аллель	Невынашивание беременности n=44	Контрольная группа n=45	χ^2	p
<i>C</i>	0,42	0,37	0,34	0,56
<i>T</i>	0,58	0,63		
<i>C/C</i>	10 (22,72 %)	10 (22,2 %)	1,16	0,56
<i>CT</i>	17 (38,64 %)	13 (28,9 %)		
<i>T/T</i>	17 (38,64 %)	22 (48,9 %)		

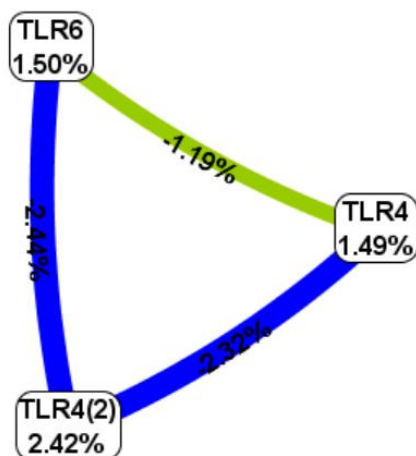
В результате MDR анализа выявлена статистически значимая модель взаимодействия трех исследуемых локусов (табл. 5). Исследуемая модель отличается высокой степенью воспроизводимости, что делает ее важной для понимания механизмов взаимодействия.

Таблица 5 – Статистические показатели модели взаимодействия исследуемых локусов

Комбинация локусов в модели	Тестируемое взаимодействие	Воспроизводимость модели	χ^2 (p)	OR
<i>TLR4 (Asp299Gly)</i> <i>TLR4 (Thr399Ile)</i> <i>TLR6 (Ser249Pro)</i>	0,59	10/10	4,8 (p=0,028)	4,16 (1,08-16,07)

На рисунке 2 представлено графическое изображение результатов MDR-анализа, которое отражает характер взаимодействия локусов. Наибольший вклад в

изменение риска невынашивания беременности вносит полиморфизм *TLR4* (*Thr399Ile*) (2,42 %).



*Рисунок 2 – Графическое представление результатов анализа взаимодействия между исследуемыми локусами генов *TLR4* и *TLR6* (в белых прямоугольниках представлена информация о информационной ценности каждого локуса в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары локусов. Синий и зеленый цвет линий указывают на отсутствие эффекта синергизма между локусами)*

Система врожденного иммунитета умеет различать свои и чужие клетки, а также обеспечивать иммунную толерантность через активацию Толл-подобных рецепторов. Связывание с этими рецепторами вызывает секрецию антимикробных пептидов, провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также активацию натуральных киллеров и лимфоцитов (Iwasaki, Medzhitov, 2015). TLR6 распознает липопептиды грамположительных бактерий и грибов, TLR4 распознает липополисахариды грамотрицательных бактерий (Pandey et al., 2015). Было установлено, что TLR играют значительную роль в защите организма от инфекции во время беременности (Koga et al., 2014; Mor et al., 2017).

Замены *Asp299Gly* и *Thr399Ile* изменяют аминокислотную последовательность белка TLR4 и влияют на внеклеточный домен и область распознавания лиганда рецептора TLR4 (Bergmann et al., 2011). Эти замены связаны с отсутствием адекватного иммунного ответа при активации рецептора (Толстопятова и др., 2009). Для замены *Ser249Pro* TLR6 нет точных данных о влиянии на структуру или функцию белка. Предполагается, что данная замена может приводить к генетически детерминированным конформационным изменениям рецептора или изменениям передачи сигнала в клетку (Крохалева, Страмбовская, 2015).

Тем не менее, ни один из исследованных нами полиморфизмов генов *TLR4* и *TLR6* не ассоциирован с изменением риска невынашивания беременности в I триместре у женщин Ростовской области.

Это может быть связано с тем, что TLR эволюционно консервативны и выполняют критически важные функции в иммунной системе. Даже если полиморфизмы изменяют аминокислотные последовательности рецепторов, это не обязательно приводит к значительным изменениям в их функциональной активности. Например, рецепторы могут сохранять способность распознавать патогенные структуры и активировать иммунный ответ. При этом сама иммунная система обладает механизмами компенсации, которые могут нивелировать влияние отдельных изоформ рецепторов. Например, если один из TLR имеет измененную активность вследствие полиморфизма, другие компоненты иммунной системы, такие как альтернативные TLR или другие рецепторные системы, могут взять на себя его функции. Это обеспечивает стабильность иммунного ответа и защиту организма и может предотвратить значительные изменения в иммунном ответе и, соответственно, не повлиять на изменение риска невынашивания беременности. Кроме того, полиморфизмы могут влиять не только на способность рецепторов активировать иммунный ответ, но и на вторичные сигнальные пути и продукцию

Научное электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы», № 50, 2024 г.
цитокинов. Если эти вторичные пути остаются неизменными или компенсируются другими механизмами, конечный эффект на беременность может не проявиться.

Заключение

В ходе исследования было установлено, что полиморфизмы *Asp299Gly*, *Thr399Ile* гена *TLR4* и *Ser249Pro* гена *TLR6* не ассоциированы с изменением риска невынашивания беременности в I триместре у женщин Ростовской области. Это может быть связано с консервативностью функций TLR и компенсаторными механизмами иммунной системы, которые нивелируют влияние отдельных однонуклеотидных замен.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018.

Список литературы

1. Бережная Н. М. Toll-like рецепторы и онкогенез // Онкология. – 2013. – Т.15, № 2. – С. 76-87.
2. Крохалева Ю. А., Страмбовская Н. Н. Носительство генетического полиморфизма Толл-рецепторов и концентрация IL-1 β , IL-6 в плазме крови у больных мозговым инсультом // Успехи современного естествознания. – 2015. – №. 7. – С. 7-11.
3. Толстопятова М. А., Бушлаева Г. А., Козлов И. Г. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей // Педиатрия – 2009. – Т. 87, № 1. – С. 115–120.
4. Щебляков Д. В., Логунов Д. Ю., Тухватулин А. И., Шмаров М. М., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л. Толл-подобные рецепторы (tlr) и их значение в опухолевой прогрессии // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 28-37

5. Bergmann C., Bachmann H. S., Bankfalvi A., Lotfi R., Pütter C., Wild C. A., Schuler P. J., Greve J., Hoffmann T. K., Lang S., Scherag A., Lehnerdt G. F. Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas // *Journal of translational medicine*. – 2011. – V. 9. – P. 1-9.
6. Gabrielyan A. R., Arsenyan A. S., Magomedova Z. M., Smbatyan S. M. Psychological features of pregnant women with the threat of termination: analysis of the problem. // *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. – 2023. – V. 14. – P. 446-450.
7. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system // *Nature immunology*. – 2015. – V. 16, № 4. – P. 343-353.
8. Koga K., Izumi G., Mor G., Fujii T., Osuga Y. Toll-like Receptors at the MaternalFetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Complications // *American Journal of Reproductive Immunology* – 2014 – V. 72, № 2. – P. 192-205.
9. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity // *Nature Reviews Immunology*. – 2001. – V. 1, №. 2. – P. 135-145.
10. Mor G., Aldo P., Alvero A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy // *Nature Reviews Immunology* – 2017 – V. 17, № 8. – P. 469-482.
11. Pandey S., Kawai T., Akira, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors // *Cold Spring Harbor perspectives in biology* – 2015. – V. 7. – P. 1-18.
12. Pasare C., Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors // *Nature*. – 2005. – V. 438. – P. 364-368.
13. Salaun B., Romero P., Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis // *European journal of immunology*. – 2007. – V. 37, №. 12. – P. 3311-3318.
14. Wang H., Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4 // *Biol. Reprod* – 2003. – V. 69. – P.1957-1963.

15. Warning J. C., McCracken S. A., Morris J. M. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system // *Reproduction* – 2011. – V. 141. – P. 715-724.

Статья поступила в редакцию 14 ноября 2024 г.

Поступила после доработки 17 ноября 2024 г.

Принята к печати 16 декабря 2024 г.

Received 14, November, 2024

Revised 17, November, 2024

Accepted 16, December, 2024