

# Методология исследования молекулярных маркеров индивидуального генетического риска развития осложнений урогенитальной хламидийной инфекции

К.И. Плахова, И.А. Волков, Р.Ф. Хайруллин, С.В. Ротанов, Д.В. Попов, М.Р. Рахматулина, Н.В. Фриго

Research methods for molecular markers of the individual genetic risk for development of complications of the urogenital chlamydia infection

K.I. PLAKHOVA, I.A. VOLKOV, R.F. KHAIRULIN, S.V. ROTANOV, D.V. POPOV, M.R. RAKHMATULLINA, N.V. FRIGO

об авторах: ►

К.И. Плахова — к.м.н., старший научный сотрудник отдела ИППП ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Р.Ф. Хайруллин — к.х.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

И.А. Волков — к.б.н., научный сотрудник, отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

М.Р. Рахматулина — д.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. отделом ИППП ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

Представлены результаты первых четырех этапов научно-исследовательской работы, выполняемой в рамках Государственного контракта № 02.740.11.0774 «Разработка технологии молекулярной диагностики индивидуального генетического риска развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека».

Ключевые слова: **урогенитальная хламидийная инфекция, цитокины, гены TNF- $\alpha$ , IL10, TGF- $\beta$ , MBL2, IFN- $\gamma$ , IL-6, полиморфизмы, праймеры.**

The authors present the results of the first four stages of research conducted under Government Contract No. 02.740.11.0774: Development of a Technology for Molecular Diagnostics of the Individual Genetic Risk of Development of Reproductive Function Disorders Associated with Human Urogenital Chlamydial Infection.

Key words: **urogenital chlamydial infection, cytokines, TNF- $\alpha$ , IL10, TGF- $\beta$ , MBL2, IFN- $\gamma$ , IL-6, polymorphisms, primers.**

■ Оценка распространенности бесплодия среди населения земного шара в настоящее время неточна. Считается, что от 8 до 15% супружеских пар в течение репродуктивного периода сталкиваются с данной проблемой; при расчете на общую популяцию это означа-

ет, что в мире насчитывается более 100 млн таких супружеских пар. Под бесплодием понимают отсутствие беременности у женщин из супружеских пар при регулярной половой жизни половых партнеров в течение 12 мес. [1].

Одной из ведущих причин бесплодного брака являются воспалительные заболевания половых органов, которые составляют основную патологию гениталий у женщин (38,2%) и мужчин (43,3%) с бесплодием и в 2/3 случаев диагностируются у обоих супругов [2]. В структуре бесплодного брака 50—60% составляет женское бесплодие [1].

У женщин воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) представляют собой различные комбинации нозологических форм, характеризующих поражения верхних отделов репродуктивной системы женщин. ВЗОМТ широко распространены во всем мире и наносят обществу значительный экономический и демографический урон. По разным данным, до 60% случаев ВЗОМТ вызваны возбудителями инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) [3, 4]. Основное значение в иницировании ВЗОМТ имеют хламидийная и гонококковая инфекции, возбудители которых поражают слизистую оболочку цервикального канала, что приводит к снижению ее барьерной функции и возникновению восходящего процесса верхних отделов половой системы. Осложнения в результате инфицирования *C. trachomatis* могут наблюдаться в 30—50% случаев как у мужчин, так и у женщин [5].

Распространенность урогенитальной хламидийной инфекции среди населения разных стран мира остается высокой. По оценке ВОЗ, заболеваемость урогенитальным хламидиозом занимает второе место после трихомонадной инфекции среди ИППП. В мире ежегодно наблюдается более 90 млн новых случаев инфицирования *C. trachomatis*, из них 4 млн приходится на США и около 5,5 млн — на Европу [6].

Расходы национальных систем здравоохранения на лечение последствий, вызываемых урогенитальной хламидийной инфекцией, весьма существенны. Экономический ущерб составляет десятки миллионов долларов. Исследования экономической эффективности мероприятий по обследованию и лечению больных урогенитальной хламидийной инфекцией в развитых странах показали, что наилучшей стратегией в данном случае являются ранняя диагностика и лечение неосложненной инфекции [7].

Сегодня считается общепризнанным наличие взаимосвязи перенесенной урогенитальной хламидийной инфекции и развития нарушений репродуктивной функции у человека, вплоть до наступления бесплодия. В основе развития этих нарушений лежит как прямое повреждающее действие *C. trachomatis* на органы репродуктивной системы, так и опосредованное — через сложные иммунные механизмы, связанные с распознаванием, презентацией антигенов, дифференцировкой Т-лимфоцитов, продукцией белка теплового шока, функционированием системы цитокинов [6].

Большое внимание в последние годы уделяется изучению роли генетических факторов организма человека в развитии предрасположенности к заболева-

ниям и вариантам их клинического течения, а также терапевтического ответа на проводимое лечение. Это в наибольшей степени касается изучения иммунорегуляторных генов, которые кодируют цитокины — медиаторы иммунного ответа и межклеточного взаимодействия. Рядом авторов [7—9] отмечаются наличие взаимосвязи полиморфизма генов, кодирующих цитокины, и развития серьезных осложнений, приводящих к нарушению репродуктивной функции человека вследствие перенесенной урогенитальной хламидийной инфекции. Однако точная роль полиморфизмов этих генов в развитии бесплодия остается до конца невыясненной; до сих пор полностью не определен спектр цитокинов и кодирующих их генов, оказывающих значимое влияние на характер воспаления и/или на возможность развития серьезных осложнений, приводящих к нарушению репродуктивной функции. Таким образом, с позиций молекулярной генетики проблема установления возможной взаимосвязи перенесенной урогенитальной хламидийной инфекции и развития нарушений репродуктивной функции в настоящее время является малоизученной.

В связи с несомненной актуальностью данного научного направления в ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздравсоцразвития России в рамках гранта Министерства науки и образования в настоящее время проводятся исследования по теме НИР «Разработка технологии молекулярной диагностики индивидуального генетического риска развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека» (Государственный контракт № 02.740.11.0774 от 20.04.2010 г.).

**Цель** настоящей работы — разработка метода молекулярной диагностики генетического риска развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека, на основе изучения молекулярных маркеров в биологических образцах, полученных от больных урогенитальной хламидийной инфекцией.

Проведение исследования включает 6 основных этапов:

I этап — проведение аналитической работы по отбору генов, ассоциированных с риском развития нарушений репродуктивной функции, связанных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека (этап включает анализ научной литературы по теме исследований, выполнение патентных исследований, отбор генов-кандидатов, ассоциированных с риском развития нарушений репродуктивной функции, связанных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека, подбор праймеров для проведения молекулярно-генетических исследований).

II этап — формирование групп пациентов для изучения риска нарушений репродуктивной функции человека, связанных с урогенитальной хламидийной

инфекцией; опробование на биологическом материале метода выделения ДНК и белков из биообразцов (этап предусматривает разработку критериев включения и исключения пациентов для исследования, разработку индивидуальной медицинской карты пациентов, паспорта биообразца и протокола исследований, состоящего из клинического и экспериментального разделов).

III этап — подбор и испытание методов экспериментальных исследований (этап включает разработку дизайна исследования полиморфизмов отобранных генов и экспрессии белков, кодируемых отобранными генами, в биологическом материале, полученном от пациентов; разработку структуры информационной базы данных пациентов).

IV этап — отбор и обследование пациентов с нарушениями репродуктивной функции вследствие перенесенной урогенитальной хламидийной инфекции и здоровых лиц и формирование банка биообразцов.

V этап — проведение экспериментальных исследований биообразцов пациентов с целью определения индивидуального генетического риска развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека (этап включает изучение полиморфизмов отобранных генов и экспрессии белков, кодируемых отобранными генами, в биологическом материале, полученном от пациентов; формирование информационной базы данных пациентов, разработку технологии (метода) молекулярной диагностики для определения индивидуального генетического риска нарушения репродуктивной функции человека, ассоциированного с урогенитальной хламидийной инфекцией).

VI этап — разработка технологии (метода) молекулярной диагностики для определения индивидуального генетического риска нарушения репродуктивной функции человека, ассоциированного с урогенитальной хламидийной инфекцией (этап включает проведение статистического анализа ассоциаций между полиморфизмами отобранных генов, уровнем экспрессии белков, кодируемых отобранными генами, и нарушениями репродуктивной функции пациентов; проведение дополнительных патентных исследований; разработку метода молекулярной диагностики генетического риска развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека (заявка на патент); разработку новой медицинской технологии «Тактика ведения пациентов с риском развития вторичного бесплодия, обусловленного урогенитальной хламидийной инфекцией» и технического задания на выполнение опытно-конструкторских работ по разработке изделия медицинского назначения для диагностики генетического риска развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией у человека).

К настоящему времени на основании анализа доступной литературы и патентного поиска проведен подбор генов, кодирующих медиаторы иммунной системы — цитокины, полиморфизм которых с наибольшей вероятностью может оказывать влияние на течение урогенитальной хламидийной инфекции.

Всего для проведения исследования отобраны фрагменты 6 генов, кодирующих иммунные белки, которые играют важную роль в патогенезе урогенитальной хламидийной инфекции, развитии воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин и развитии нарушений репродуктивной функции, в том числе бесплодия, в ответ на внедрение инфекционных агентов, в частности *C. trachomatis*: *TNF-α* (позиция 308); *IL-10* (позиции 1082, 819 и 592); *TGF-β*, кодон 25 (позиции 30, 75); *MBL2* (кодон 54), *IFN-γ* (позиция 874) и *IL-6* (позиция 174). Полиморфизмы в данных генах могут ассоциироваться с изменениями функции и уровня экспрессии кодируемых ими белков и предопределять развитие повреждений репродуктивного тракта.

#### **Ген *TNF-α* (Tumor necrosis factor-α, фактор некроза опухолей альфа)**

Белок, кодируемый геном *TNF*, продуцируется главным образом макрофагами; может также продуцироваться рядом других клеток, включая лимфоциты, фибробласты, клетки жировой и нервной тканей.

*TNF* — ключевой провоспалительный цитокин, имеющий широкий спектр биологических функций. Он оказывает иммуномодулирующее действие на многие типы иммунных клеток, служит хемоаттрактантом для нейтрофилов и стимулирует фагоцитоз у макрофагов, а также активирует клетки эндотелия [12].

Полиморфизм в промоторной области гена *TNF A* (позиция -308G > A) ассоциирован с повышенной продукцией *TNF*. Повышенная продукция *TNF* приводит к резко выраженной воспалительной реакции, что может оказывать влияние на течение различных заболеваний. Данный полиморфизм ассоциирован с повышенным риском таких заболеваний, как туберкулез, бронхиальная астма и диабет [13—15].

Поскольку частым следствием хламидийной инфекции является трубная патология, ассоциированная с выраженным воспалением [16], для изучения ассоциации генетических вариантов гена *TNF-α* с риском нарушений репродуктивной функции был выбран полиморфизм в позиции -308G > A.

#### **Ген *IL-10* (Interleukin 10)**

*IL-10* продуцируется главным образом моноцитами, Т-хелперами 2-го типа, тучными клетками, а также регуляторными Т-клетками и некоторыми формами активированных лимфоцитов. Этот цитокин играет важную роль в иммунорегуляции. Он подавляет экспрессию цитокинов Т-хелперов 1-го типа, антигенов МНС II класса, а также костимулирующих молекул на поверхности макрофагов.

К настоящему времени охарактеризовано несколько полиморфизмов в гене *IL-10*, которые ассоциированы с клиническими проявлениями. Полиморфизмы *IL-10* 1082 A/G, 819 C/T и 592 C/A ассоциированы друг с другом и часто встречаются одновременно. Эти три полиморфизма формируют гаплотипы: GCC, ACC и ATA. Гаплотип GCC ассоциирован с низкой продукцией *IL-10* [17]. Гаплотип *IL-10*, ассоциированный с его высокой продукцией, повышает риск осложнений при трахоме [18]. Пониженная экспрессия *IL-10* приводит к смещению баланса между Т-хелперами 1-го и 2-го типов в сторону первых и соответственно к более выраженному Т-клеточному ответу, который может приводить к повреждению ткани при воспалении [19]. В связи с этим полиморфизмы 1082 A/G, 819 C/T и 592 C/A в гене *IL-10* были отобраны для изучения возможных ассоциаций урогенитальной хламидийной инфекции с развитием осложнений и риском нарушений репродуктивной функции.

#### **Ген TGF- $\beta_1$ (transforming growth factor, трансформирующий фактор роста)**

TGF- $\beta$  представляет собой белок, который контролирует клеточную пролиферацию, дифференцировку, а также многие другие функции во многих клеточных типах. TGF- $\beta$  играет роль в иммунитете и связан с такими заболеваниями, как рак, сердечные заболевания, диабет и синдром Марфана. Он действует как антипролиферативный фактор для эпителиальных клеток, а также на ранних стадиях канцерогенеза. Кроме того, известно, что TGF $\beta$  индуцирует апоптоз через сигнальные пути SMAD и DAXX [20].

TGF- $\beta$  представляет собой важный регулятор иммунной системы. Он продуцируется Т-регуляторными клетками и приводит к блокированию активации лимфоцитов и фагоцитарной функции у моноцитов. TGF- $\beta$  также важен для развития Th1-клеток.

Аллель TGF- $\beta_1$ , содержащий аргинин в кодоне 25, ассоциирован с повышенной продукцией TGF- $\beta$ . Этот аллель также связан с повышенным риском развития фиброза при трансплантации органов [21]. Поскольку повышенная продукция TGF- $\beta$  может вследствие своей иммунорегуляторной функции влиять как на особенности течения хламидийной инфекции, так и на поствоспалительные процессы (роль в образовании рубцов, фиброзе), было решено изучить взаимосвязь этого полиморфизма с репродуктивным риском у пациенток с перенесенным хламидиозом.

#### **Ген MBL2**

Представляется перспективным изучение ассоциации полиморфизмов гена *MBL2*, кодирующего белок MBL, и развития бесплодия у женщин, вызванного урогенитальной хламидийной инфекцией. Белок MBL (*mannose binding lectin*; лектин, связывающий маннозу) является важным фактором врожденного иммунитета [11]. Кроме маннозы и ее полимера маннана, белок

MBL способен также связывать некоторые другие углеводы, но с меньшей эффективностью.

Белок MBL принадлежит к классу коллектинов суперсемейства кальций-зависимых (типа C) лектинов, которые являются рецепторами опознавания патогенов в системе врожденного иммунитета. MBL опознает остатки маннозы, включенные в углеводную оболочку на поверхности многих патогенов бактериального, грибкового и вирусного происхождения, а также некоторых простейших. Связывание MBL приводит к индукции лектинового пути активации комплемента. MBL может связывать патогенные дрожжи, такие как *Candida albicans* [22], вирусы, например ВИЧ [23], и вирус гриппа серотипа А, многие бактерии, включая сальмонеллу и стрептококки, некоторых паразитов, таких как лейшмания.

Белок MBL образует олигомеры массой 400—700 кД, состоящие из субъединиц, каждая из которых содержит три идентичных 32 кД полипептидных цепи. Для активации комплемента необходимо связывание с патогеном не менее четырех тримеров [24].

Показано, что полиморфизмы в гене *MBL2* ассоциированы с повышенным риском инфекции. Инфекция, вызываемая *Chlamydia trachomatis*, является основной причиной непроходимости маточных труб. В исследовании *L. Sziller* и соавт. показано, что полиморфизм кодона 54 гена *MBL* может способствовать развитию поврежденных маточных труб, причиной которых является *Chlamydia trachomatis* [12].

#### **Ген IFN- $\gamma$**

Белок, кодируемый геном IFN- $\gamma$ , продуцируется в основном Т-лимфоцитами и является мощным активатором макрофагов. Выработка IFN- $\gamma$  приводит к подавлению роста *C. trachomatis* за счет индукции внутриклеточного фермента, разрушающего триптофан микроорганизма, приводя к нарушению синтеза клеточной стенки. Показано, что полиморфизм гена *IFN- $\gamma$*  в позиции 874 предопределяет низкую выработку цитокина IFN- $\gamma$  в ответ на проникновение инфекции в организм. Дефицит IFN- $\gamma$  приводит к переходу инфекционного процесса в хроническую и/или рецидивирующую формы. Такое течение хламидийной инфекции способно приводить к развитию фиброза в маточных трубах и, как следствие, к бесплодию.

#### **Ген IL-6**

Цитокин, кодируемый геном *IL-6*, синтезируется в основном макрофагами и Т-лимфоцитами. Провоспалительный *IL-6* участвует в подавляющем большинстве воспалительных реакций человека, стимулирует продукцию белков острой фазы воспаления. Полиморфизм гена *IL-6* в позиции 174 предопределяет низкую выработку одного из основных провоспалительных цитокинов, тем самым замедляя и снижая острую фазу воспаления в ответ на проникновение инфекционного агента в организм человека. Показано, что такая

особенность выработки IL-6 характерна для женщин с вторичным бесплодием.

Для изучения полиморфизмов отобранных генов были подобраны праймеры для амплификации и секвенирования функционально значимых участков генов. Последовательности генов были найдены в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Внутри полученных последовательностей генов с помощью программы Vector NTI были подобраны праймеры для амплификации фрагментов генов, содержащих позиции изучаемых полиморфизмов, с определенной температурой плавления (табл. 1).

Осуществлен подбор условий проведения полимеразной цепной реакции с подобранными праймерами в биологическом материале, полученном от пациентов (табл. 2). Амплификация фрагментов всех выбранных генов проводится при одинаковых условиях.

В ходе выполнения работ в рамках НИР разработан протокол выделения ДНК и белков из биобразцов.

Протокол выделения ДНК из образцов цельной крови включает этапы лизиса клеточных элементов

крови, сорбирования ДНК на носителе и экстракции ДНК с помощью элюирующего раствора.

Протокол выделения белков из образцов отделяемого цервикального канала включает этапы экстракции белкового содержимого из офтальмологического тупфера, расчета коэффициента разведения исследуемого биообразца.

Проведено опробование протокола на образцах биологического материала. Показано, что применение разработанной методики позволяет получать достаточное количество ДНК и экстракта белков для проведения дальнейших исследований.

Разработаны критерии включения и исключения пациентов в исследование и в соответствии с ними определены 4 группы обследуемых (всего 80 женщин репродуктивного возраста):

1. Женщины репродуктивного возраста (20—40 лет) с урогенитальной хламидийной инфекцией нижних отделов урогенитального тракта — уретрит, цервицит (20 пациенток).
2. Женщины репродуктивного возраста (20—40 лет) с урогенитальной хламидийной инфекцией

**ТАБЛИЦА 1**

**Праймеры для проведения амплификации фрагментов отобранных генов**

Ген	Полиморфизм	Последовательность праймеров	Температура отжига, °C	Размер амплифицируемого продукта, п. н.
TNF- $\alpha$	-308 ATNF- $\alpha$	TNF-A-Fw:5'- TTCCTGCATCCTGTCTGGAA-3' TNF-A-Rev:5'-TCTCGGTTTCTTCCATCGC-3'	64	253
IL-10	-1082 A/A IL-10 -592 A/C IL-10 -819 T/C IL-10	IL10-Fw:5'- GTGGGCTAAATATCCTCAAAGT -3' IL10-Rev: 5'- AGCAACACTCCTCGCCGCAA-3'	64	683
TGF- $\beta_1$	T869C TGF- $\beta_1$ G915C TGF- $\beta_1$	TGF-Fw: 5'- CCAGCTCCATGTCGATAGTCT-3' TGF-Rev: 5'- CCACACCAGCCCTGTTTCGC-3'	64	163
IFN- $\gamma$	+874 T/A IFN- $\gamma$	IFNG-Fw: 5'- TATGATTCTGGCTAAGGA-3' IFNG-Rev: 5'- CCCCAATGGTACAGGTTTCT-3'	60	318
IL-6	-174 G/C IL-6	IL6-Fw: 5'- TGTCAGACATGCCAAAGTGCT-3' IL6-Rev:5'- GGCTGATTGGAAACCTTATTA-3'	64	180
MBL2	1052G /A MBL2	MBL2-Fw: 5'- CAGTCTCCTCATATCCCAG-3' MBL2-Rev: 5'- CTCCAGGCATCAACGGCTTC-3'	64	143

**ТАБЛИЦА 2**

**Условия амплификации генов при проведении реакции амплификации**

Рекомендованные условия амплификации	Число циклов амплификации
95 °C — 5 мин.	1
95 °C — 30 с. 64 °C — 20 с. 72 °C — 30 с.	30
72 °C — 10 мин.	1

верхних отделов урогенитального тракта — сальпингит, сальпингоофорит, эндометрит, метроэндометрит, пельвиоперитонит и др. (20 пациенток).

3. Группа сравнения — женщины репродуктивного возраста (20—40 лет) с вторичным бесплодием, ассоциированным с урогенитальной хламидийной инфекцией (20 пациенток).

4. Контрольная группа — 20 клинически здоровых женщин репродуктивного возраста (20—40 лет).

Каждая из групп имеет уникальные, отличительные от других групп характеристики, что позволяет использовать полученный материал с целью дальнейшего сравнительного анализа для решения поставленных задач в рамках проводимого исследования.

Разработана индивидуальная медицинская карта, включающая разделы, касающиеся данных анамнеза жизни и болезни пациенток, описание их гинекологического и сексуального статуса, результатов клинического обследования (включая описание состояния органов репродуктивной системы), сведений о состоянии репродуктивной системы половых партнеров, результаты лабораторных и инструментальных исследований.

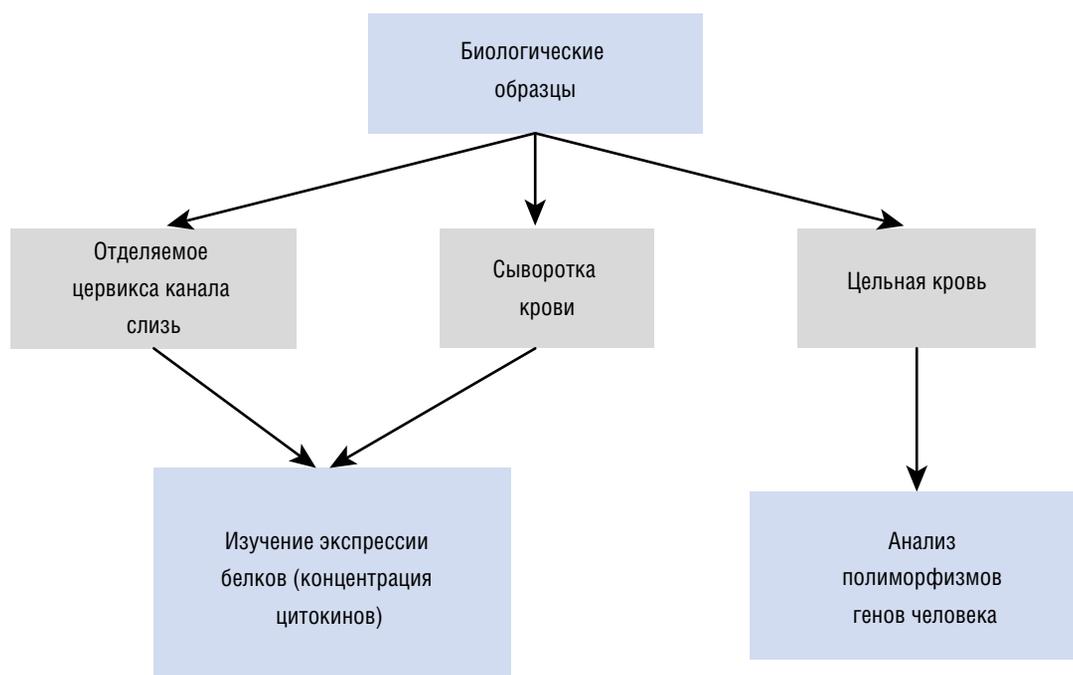
Разработана информационная база данных пациенток, включающая: персональные данные больных, в том числе анамнестические данные, касающиеся перенесенных ИППП и гинекологического анамнеза, данные о виде исследованного биологического материала, объективные данные клинического обследования пациенток, а также результаты экспериментальных исследований (рис. 1).

В качестве биологического материала для исследования выбраны: цельная кровь (для проведения молекулярно-генетических исследований), сыворотка крови (для изучения уровня экспрессии белков, кодируемых отобранными генами), отделяемое цервикального канала (для изучения уровня экспрессии белков, кодируемых отобранными генами), полученные от каждой пациентки, включенной в исследование. Забор биоматериала осуществляется перед началом лечения (рис. 2).

В процессе выполнения НИР разработан паспорт биообразца, включающий персональные данные пациентки, основные анамнестические данные, в том числе акушерско-гинекологический и сексуальный анамнез, сведения о перенесенных ИППП.



Рис. 1. Информационная база данных пациентов



**Рис. 2. Виды биологического материала для проведения исследования**

От пациенток получен необходимый для пилотных и экспериментальных исследований биологический материал, из которого сформирован банк биообразцов, содержащий сыворотки крови ( $n = 80$ ), образцы цельной крови ( $n = 80$ ), образцы цервикального секрета ( $n = 80$ ).

Разработан протокол исследований, включающий клинический и экспериментальный разделы.

В клиническом разделе протокола подробно описана популяция исследования, критерии включения и исключения пациенток, график и методология клинико-анамнестического обследования пациентки, проведения лабораторных и инструментальных исследований.

Экспериментальный раздел протокола включает рекомендации по забору, транспортировке и хранению взятых биообразцов, а также описание этапов исследования нуклеотидных последовательностей, выбранных для исследования генов. В соответствии с протоколом для выполнения исследования планируется провести:

- изучение нуклеотидных последовательностей генов-кандидатов: *TNF- $\alpha$* , позиция -308; *IL-10* (в позициях -1082, -819 и -592); *TGF- $\beta$* , (в позициях 869 и 915); *MBL2* (позиция 1052); *IFN- $\gamma$*  (позиция 874); *IL-6* (позиция -174) с использованием мультиплексной реакции SNaPshot, включая анализ меченых SNaPshot праймеров на секвенаторе, с целью определения однонуклеотидных полиморфизмов;

- изучение уровня экспрессии белков, кодируемых генами-кандидатами, с использованием иммуноферментного анализа и xMAP технологии.

### Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований:

- разработана методология исследований по прогнозированию индивидуального генетического развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией, включающая 6 этапов проведения аналитических, патентных, клинических и экспериментальных исследований;
- отобраны для изучения фрагменты генов *TNF- $\alpha$* , *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *MBL2*, *IFN- $\gamma$*  и *IL-6*, в наибольшей степени функционально значимые для изучения и разработки метода прогнозирования индивидуального генетического развития нарушений репродуктивной функции, ассоциированных с урогенитальной хламидийной инфекцией;
- для обеспечения проведения исследования разработан протокол, включающий и клинический, и экспериментальный разделы;
- определены виды биологического материала, подлежащего исследованию (цельная кровь, сыворотка крови и цервикальный секрет);
- отобраны для изучения и исследованы с получением биологического материала 4 группы пациенток (80 человек) репродуктивного возраста, имеющих

уникальные характеристики, что позволяет использовать полученный от них биологический материал для дальнейшего сравнительного анализа и решения поставленных задач в рамках проводимого исследования;

■ подобраны и опробованы методы экспериментальных исследований по изучению полиморфизмов изучаемых генов и экспрессии в биологических образцах медиаторов клеточного обмена цитокинов. ■

## Литература

1. Рудакова Е.Б., Семенченко С.И., Панова О.Ю. и др., 2004. 1. Руководство по охране репродуктивного здоровья. М: Триада-Х, 2001.
2. Сметник В.П., Тумилович Л.Г. Неоперативная гинекология. Сметник В.П. Руководство для врачей. Книга 2. 1995; 201.
3. Современные подходы к лечению воспалительных заболеваний женских половых органов. Метод. материалы. / Под ред. В.Н. Серова. М, 2003.
4. Raavonen J. Immunopathogenesis of pelvic inflammatory disease and infertility — what do we know and what shall we do? *J Br Fert* 1996; 1: 42—45;
5. Munday P.E. Clinical aspects of pelvic inflammatory disease. *Hum Reprod* 1997; Nov: 12 (11 Suppl): 121—6.
6. Канищева Е.Ю. Воспалительные заболевания органов малого таза у женщин и их связь с инфекциями, передаваемыми половым путем. Диагностика, лечение. *Вестн. дерматол. и венерол.* 2002; 4: 16—23.
7. Moss T.R., Darougar R. (2001): Human genital infections with *C. trachomatis*.
8. Kamwendo F., Forslin L., Bodin L. et al. Decreasing incidences of gonorrhoea- and chlamydia-associated acute pelvic inflammatory disease: a 25-year study from an urban area of central Sweden. *Sex Transm Dis* 1996; 23: 384—91.
9. Öhman H., Triitinen A., Halttunen M., et al. IL-10 polymorphism and cell-mediated immune response to *Chlamydia trachomatis*. *Genes and Immunity* 2006; 7: 243—249.
10. Rasouli M., Kiany S. Association of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms with susceptibility to brucellosis. *Cytokine* 2007; 38: 49—53.
11. Mei B., Luo Q., Du K. et al., Association of MICA gene polymorphisms with *Chlamydia trachomatis* infection and related tubal pathology in infertile woman. *Hum Reprod* 2009 Dec; 24 (12): 3090—5.
12. Sziller I., Babula O., Ujházy A. et al. *Chlamydia trachomatis* infection, Fallopian tube damage and a mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism. *Hum Reprod* 2007; 22 (7): 1861—5.
13. Moore K.W., R de Waal Malefyt R. L. Coffman and A. O'Garra. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683—765.
14. Rotterberg M.E., Gigliotti-Rothfuchs A., Wiggzell H. The role of IFN-gamma in the outcome of chlamydial infection. *Curr Opin Immunol* — 2002; 14: 444—451.
15. Reddy B.S., Rastogi S., Das B. et al. Cytokine expression pattern in the genital tract of *Chlamydia trachomatis* positive infertile women — implication of T-cell responses. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 552—558.
16. Srivastva P., Jha R., Bas S. In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected site release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha upon heat shock protein stimulation than fertile women. *Biology and Endocrinology* 2008; 6: 20.
17. Beutler B., Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. 1986; Apr 17—23; 320 (6063): 584—8.
18. Pacheco A.G., Cardoso C.C., Moraes M.O. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet*. 2008 Jun;123 (5): 477—84.
19. Boraska V., Skrabić V., Culić V.C. et al. Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population. *Biol Res*. 2008; 41 (2): 157—63.
20. Witte J.S., Palmer L.J., O'Connor R.D. et al. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNF- $\alpha$ 308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet*. 2002 Jan; 10 (1): 82—5.
21. Banno T., Gazel A., Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem* 2004; 279: 32633—42.
22. Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1—8.
23. Natividad A., Holland M.J., Rockett K.A. et al. Susceptibility to sequelae of human ocular chlamydial infection associated with allelic variation in IL10 cis-regulation. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 323—9.
24. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180: 5771—7.
25. Bierie B., Moses H.L. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010 Feb; 21 (1): 49—59. Epub 2009 Dec 16.