

Третьякова Т.Б., Башмакова Н.В., Демченко Н.С.

Ассоциация полиморфных маркеров генов метаболизма фолатов с ранним регрессом беременности

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздравсоцразвития России, г.Екатеринбург

Tret'yakova T.B., Bashmakova N.V., Demchenko N.S.

Association gene's polymorphous markers of folate metabolism with early regression pregnancy

Резюме

Основной целью исследования было изучить частоту встречаемости полиморфных аллелей генов, контролирующих обмен фолатов (MTHFR, MTRR, MTR) в генотипах женщин с регрессирующей беременностью в анамнезе и в генотипах плодного материала, полученного при выскабливании полости матки. Обследовано 120 женщин репродуктивного возраста (23-41 год), 60 из них имели регресс беременности в анамнезе. Группу сравнения составили 60 женщин без невынашивания беременности и спонтанных аборт в анамнезе, имеющих, как минимум, одного здорового ребенка. Проведено молекулярно-генетическое исследование аллельных полиморфизмов трех генов-регуляторов фолатного цикла и кариотипирование женщин и плодного материала. Выявлена высокая частота встречаемости низкофункциональных аллелей в генах MTHFR и MTRR в опытной группе и абортном материале по сравнению с контрольной выборкой. Оценка риска НБ и невынашивания беременности должна включать всесторонний анализ результатов молекулярно-генетического тестирования и факторов среды.

Ключевые слова: беременность, полиморфизм генов фолатного цикла, кариотип абортусов

Summary

The purpose of the research was analysis frequency of the low-functional alleles in genes MTHFR, MTRR, MTR in genotypes of the women, with regression pregnancy in anamnesis, and abortive material. Studying 120 women of reproductive age (23-41 years old), of whom 60 women with regression pregnancy in anamnesis. The comparison group were women without no carrying of pregnancy, spontaneous abortions in anamnesis and have as a minimum one healthy child. Molecular-genetic studies of allelic polymorphisms three genes-regulators of folate cycle, analysis of women's and abortion's karyotype were conducted. It's founded that in the studied group there was statistically significant higher frequency of the low-functional alleles in genes MTHFR, MTRR then in the comparison group. Assessing the risk no carrying of pregnancy require a comprehensive analysis of molecular genetic testing mandatory environment factors.

Key words: regression pregnancy, gene's polymorphism of folate metabolism, abortus' karyotype

Введение

Несмотря на достижения современной медицины, проблема неразвивающейся беременности (НБ) остается весьма актуальной. Одной из ведущих причин НБ ранних сроков являются различные генетические факторы. В настоящее время считается, что НБ может быть обусловлена хромосомными аномалиями и наследственной предрасположенностью в результате полиморфизма различных генов. На сегодняшний день известно около семи различных групп генов, ассоциированных с риском невынашивания беременности. К ним относятся следующие генные сети: гены II фазы детоксикации (GSTM1, GSTT1, GSTP1), гены плазменного гемостаза (Fg, PTM, FVL, XII),

гены иммунной системы (DQA1, DQB2, DQB1, HLA-G, IL1B), гены метаболизма гормонов (PGR, ER), гены факторов роста хориона и плаценты (VEGF, IGF1, TNFA, TGFB) [1]. Особую роль в генезе НБ играют гены, принимающие участие в метаболизме фолиевой кислоты и витамина В12. Основными генами, продукты которых контролируют превращение фолиевой кислоты в метаболически активные формы и регулируют обмен гомоцистеина, являются: MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза), MTRR (метионинсинтазредуктаза) и MTR (метионинредуктаза). Полиморфизм генов фолатного обмена ассоциирован с гипергомоцистеинемией, которая эмбриотоксична и является фактором риска возникнове-

ния у плода дефектов нервной трубки (ДНТ), редукционных пороков конечностей, врожденных пороков развития (ВПР) сердечно-сосудистой и мочеполовой систем, дефектов полости рта и лица [2]. В итоге, тяжелые ВПР и/или хромосомные аномалии ведут к нежизнеспособности плода, регрессу беременности или самопроизвольно-му выкидышу на ранних сроках гестации.

Многочисленные исследования показывают ассоциацию полиморфизмов С677Т и А1298С в гене МТНFR с привычным невынашиванием беременности. Роль других полиморфизмов: А2756G в гене МTR и А66G в гене МTRR пока изучается и их причастность к репродуктивным нарушениям еще до конца не ясна [3]. По данным ряда исследований, большее значение в НБ имеет не столько материнский генотип, сколько генотип плода [4]. В работах, выполненных на абортном материале, показано значительное повышение риска привычного НБ при наличии у эмбриона аллелей 677Т и 1298С гена МТНFR в гомо- или гетерозиготном состоянии. [5].

Цель исследования - проанализировать распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов МТНFR, МTR и МTRR у женщин с неразвивающейся беременностью в анамнезе и в плодном материале с целью установления ассоциации с риском раннего регресса беременности.

Материалы и методы

Набор материала проводили по принципу продольного когортного проспективного исследования.

Было обследовано 120 женщин. Деление на группы проводилось по принципу «случай-контроль». Основную группу (n=60) составили женщины, имеющие в анамнезе 1 и более случаев регрессирующей беременности. Критериями исключения из основной группы являлись: анатомические аномалии половой системы, острый инфекционный процесс, тяжелые эндокринные нарушения, многоплодная беременность, АФА. Критериями включения в основную группу являлись: регрессирующая беременность 1 триместра, одноплодная беременность, естественное зачатие или ВРТ. Контрольную группу (n=60) составили фертильные женщины без случаев НБ, спонтанных абортов в анамнезе, имеющих как минимум одного здорового ребенка. У женщин основной и контрольной групп и их супругов исключены хромосомные аномалии. Возраст обследованных пациенток составил 23-41 год. Всем женщинам основной и контрольной групп проводилось молекулярно-генетическое типирование. Определялись полиморфизмы: МТНFR: 677С>Т, 1298 А>С; МTRR: 66 А>G; МTR: 2756 А>G. Образцы ДНК получали из буккального эпителия и ворсин хориона, используя набор реагентов и протокол для выделения ДНК фирмы НПО "ДНК-Технология" (Россия). Далее на полученных образцах ДНК проводили ПЦР. Детекция результатов осуществлялась на приборе ДТ-96 производства НПО "ДНК-Технология". На образцах тканей хориона дополнительно проводилось стандартное цитогенетическое исследование. Тяжесть нарушения развития эмбрионов («замерший плод», анэмбриония) диагностировались

при ультразвуковом сканировании. Сроки развития эмбрионов варьировали от 5 до 12 недель.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы Statistica 7.0. Различия между переменными с нормальным распределением устанавливались при помощи t критерия Стьюдента. Переменные с непараметрическим распределением сравнивались с помощью U-критерия Манна-Уитни. Наличие ассоциации между категориальными переменными оценивалось при помощи χ^2 теста. Силу ассоциации оценивали в значениях показателя соотношения шансов (odds ratio, OR) [6]. Значение OR и 95%-ный доверительный интервал (95% CI) вычисляли с помощью программы Calculator for confidence intervals or odds ratio. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Тест на соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга в обеих выборках проводили с использованием программы Hardy-Weinberg equilibrium [7].

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного анализа частоты распределения аллелей и генотипов по исследуемым полиморфным маркерам генов МТНFR, МTRR и МTR представлены в таблице.

У женщин с НБ достоверно чаще регистрировался аллель 1298С гена МТНFR в гомозиготном состоянии ($\chi^2=15,11$, $p=0,0001$, $OR=2,24$, $CI=1,49-3,37$). Совокупность генотипов, содержащих полиморфный аллель 1298С в гомо и гетерозиготном состоянии (А/С +С/С) также встречалась достоверно чаще у женщин основной группы по сравнению с контролем ($\chi^2=8,33$, $p=0,003$, $OR=2,33$, $CI=1,31-4,16$). В абортном материале частота встречаемости генотипа 1298СС также оказалась достаточно высокой (64%).

Обнаружены достоверные отличия в увеличении доли генотипов, содержащих аллель 66G гена МTRR у женщин с регрессирующей беременностью ($\chi^2=5,14$, $p=0,02$, $OR=1,6$, $CI=1,06-2,40$). В абортном материале генотип МTRR: 66GG встречался с частотой 99%. Это согласуется с выявленными другими авторами ассоциациями аллеля 66G с риском развития дефектов невральная трубки, синдромом Дауна и другими трисомиями, как причинами спонтанных выкидышей [9].

Достоверных отличий в частоте встречаемости полиморфных вариантов гена МTR: А2756G у женщин основной и контрольной выборок в проведенном исследовании не выявлено. В плодном материале аллель 2756G гена МTR не встречался.

Не обнаружено статистически значимых отличий и в частоте встречаемости аллеля 677Т в гене МТНFR у женщин с НБ по сравнению с контрольной группой. Частота соответствует общей частоте встречаемости этого аллеля в популяции (20-40%). Соответственно, и частота варианта 677Т в плодном материале оказалась низкой, только в 12 случаях (31 %) имел место генотип 677ТТ гена МТНFR. Наши данные по частоте встречаемости варианта 677ТТ гена МТНFR в абортном материале регрессирующих беременностей отличаются от данных,

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов фолатного обмена в выборках женщин с регрессирующей беременностью в анамнезе и контрольной группой

Полиморфизм	Генотип	Основная группа	Контрольная группа	OR (95% CI)	χ^2 , p
MTHFR 677C>T	CC	0,470	0,530		
	CT	0,430	0,390		
	TT	0,100	0,080		
	CC	0,470	0,470		$\chi^2=0,8$
	CT+TT	0,530	0,530		p=0,53
	C	0,685	0,725		$\chi^2=0,77$
	T	0,315	0,275		p=0,38
MTHFR 1298 A>C	AA	0,300	0,500		
	AC	0,420	0,400		
	CC	0,280	0,100		
	AA	0,300	0,500	0,43 (0,76-0,24)	$\chi^2=8,33$
	AC+CC	0,700	0,500	2,33 (1,31-4,16)	p=0,003
	A	0,510	0,700	0,45 (0,67-0,30)	$\chi^2=15,11$
	C	0,490	0,300	2,24 (1,49-3,37)	p=0,0001
MTR 2756 A>G	AA	0,470	0,450		
	AG	0,500	0,550		
	GG	0,030	0,000		
	AA	0,470	0,450		$\chi^2=0,8$
	AG+GG	0,530	0,550		p=0,7
	A	0,720	0,725		$\chi^2=0,01$
	G	0,280	0,275		p=0,9
MTRR 66 A>G	AA	0,120	0,200		
	AG	0,630	0,250		
	GG	0,250	0,550		
	AA	0,120	0,200		$\chi^2=2,38$
	AG+GG	0,880	0,800		p=0,12
	A	0,325	0,435	0,63 (0,94-0,42)	$\chi^2=5,14$
	G	0,675	0,565	1,60 (1,06-2,40)	p=0,02

полученных другими авторами при исследовании материала после самопроизвольных прерываний беременности. В ряде работ показана достоверно высокая частота варианта 677TT в генотипах погибших плодов. Авторы отводят этому полиморфизму ключевое влияние на выживаемость эмбриона [5,8].

Проведенное нами цитогенетическое исследование плодного материала, полученного в результате выскабливания полости матки у женщин с НБ, показало, что в 55% случаев имеет место aberrантный кариотип плода: преимущественно гетероплоидия в виде одинарных и двойных трисомий (82% случаев), в 12% - триплоидия и в 6% случаев - моносомия по X хромосоме. При этом у 99% «замерших» плодов в генотипе определялся аллель 66G гена MTRR в гомо и гетерозиготном состоянии, а также аллель 1298C гена MTHFR, преимущественно в гомозиготном состоянии (в 64% случаев).

Генетические нарушения могут являться как безусловным фактором гибели плода (абerrантный кариотип), так и выполнять роль триггерных факторов (мутации в генах фолатного цикла) регресса беременности в сочетании с другими факторами риска. На современном этапе актуальным остается вопрос взаимодействия наследственности и среды в возникновении НБ и ПНБ, что требует проведения дальнейших научных исследований с

учетом интеграции медицинских наук (гинекология, педиатрия, генетика, перинатология, гигиена, эпидемиология и др.).

Выводы

1. Частота низкофункциональных аллелей по полиморфным вариантам генов MTHFR:1298C и MTRR:66G у женщин с НБ в анамнезе и в генотипах плодного материала спонтанных выкидышей достоверно выше, чем в контрольной выборке.

2. В 55% случаев при регрессе беременности имеет место aberrантный кариотип плода, что является безусловным фактором его гибели.

3. Мутации в генах фолатного обмена: MTRR: A66G и MTHFR: A1298C в генотипах матери и плода в сочетании с другими факторами риска могут выполнять роль триггерных факторов в регрессе беременности раннего срока. ■

Третьякова Т.Б. - к.м.н., Баишмакова Н.В. - д.м.н., Демченко Н.С., отдел генетических исследований ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Демченко Н.С., г. Екатеринбург, ул. Репина, 17-225, medichkaN@mail.ru

Литература:

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. Под ред. В.С. Баранова. 2009; 230-280.
2. Тромбогенетические осложнения в акушерско-гинекологической практике: Руководство для врачей. Под ред. А.Д. Макацария. 2011; 1: 620-631.
3. Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F., et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am. J. Med. Genet.* 2001; 98: 357-360.
4. Бескороваяная Т.С., Гудзенко С.В., Тверская С.М., Поляков А.В. Ассоциация полиморфных аллелей генов полатного обмена с привычным невынашиванием беременности. *Проблемы репродукции.* 2006; 1:53-60.
5. Isotalo P.A., Wells G.A., Donnelly J.G. Neonatal and fetal methylentetrahydrofolate reductase genetic polymorphism: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 986-990.
6. Hutchon D.J.R. Calculator for confidence intervals or odds ratio unmatched case study; [http:// www.hutchon/ConfidOR.htm](http://www.hutchon/ConfidOR.htm).
7. Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am. J. Epidemiol.* 2009; 169(4): 505-514. [http:// www.oege.org/software/hwe-mr-calc.html](http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.html).
8. Zetterberg H. Methylentetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphism in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod. Biol. Endocr.* 2004; 2: 7.
9. Van der Put N.M., Gabreels F., Stevens E. M., et al. A second common mutation in the methylentetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neuraltube defects? *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 64: 1044-1051.