

Ковалев В.В., Потапов Н.Н.

## Молекулярно-генетические факторы неразвивающейся беременности с неустановленной этиологией

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, ГБОУ ВПО УГМУ, г.Екатеринбург

Kovalev V.V., Potapov N.N.

### Molecular-genetic factors of missed abortion with unknown etiology

#### Резюме

В исследование вошли 246 женщин с уточненной регрессирующей беременностью, из них выделено 59 женщин с неясным генезом неразвивающейся беременности, которые составили основную группу исследования. Контрольную группу составили 73 женщины с физиологически протекающей беременностью и благополучными перинатальными исходами. Всем женщинам первой и второй группы проводилось молекулярно-генетическое исследование полиморфизмов генов тромбозии, регуляторов сосудистого тонуса, фолатного цикла. Анализ полученных данных показал, что патологические полиморфизмы генов фолатного цикла и регуляторов сосудистого тонуса встречаются чаще у женщин с неразвивающейся беременностью неясного генеза.

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность, генные полиморфизмы, эндотелиальный оксид азота, гомоцистеин, фолатный цикл

#### Summary

The study included 246 women with missed abortion, including 59 women with unexplained missed abortion, which constitute the study group. The control group - a 73 women with physiological pregnancy and prosperous perinatal outcomes. All women of the first and second group performed the molecular genetic study of gene polymorphisms.

**Keywords:** missed abortion, genetic polymorphisms, endothelial nitric oxide, homocysteine, folate cycle

#### Введение

Охрана репродуктивного потенциала женщины – это одно из приоритетных направлений современного здравоохранения. Отечественная и зарубежная медицина проводит широкомасштабные научные исследования в области невынашивания беременности, поскольку в структуре репродуктивных потерь неразвивающаяся беременность составляет 10-15% от всех желанных беременностей [1].

Наибольшее значение среди причин неразвивающейся беременности имеют следующие факторы: хромосомные аномалии, иммунологические факторы, эндокринные заболевания, аномалии и опухоли матки, тромбофилия, инфекционный фактор, а также экзогенные воздействия на организм женщины и плода [2]. Очень сложно, а иногда даже невозможно установить точный фактор, приведший к данной патологии, поскольку этому мешают организационная сложность проведения соответствующих исследований хорниона и комплексной оценки здоровья пациентки. Даже проведенное обследование не всегда проясняет причину неразвивающейся беременности у данной женщины.

Выделение группы риска подверженных неблагоприятному исходу беременности особенно важно, поэтому необходимо выявление генетической предрасположенности к потерям беременности, что позволит своевременно предпринять профилактические меры.

В мировой литературе накоплено много данных о важной роли микроциркуляторных и тромботических осложнений в патогенезе осложнений беременности. Эндотелиальная выстилка сосудов регулирует местные процессы гемостаза, пролиферации, миграции клеток крови в сосудистую стенку и, наконец, сосудистый тонус. [3]

Вклад полиморфизмов генов, влияющих на дисфункцию эндотелия сосудов достаточно слабо изучен.

Оксид азота (NO) является мощным сосудорасширяющим агентом. Фермент (эндотелиальная NO-синтаза, eNOS), участвующий в синтезе оксида азота и, соответственно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления, притуплении активности может играть существенную роль в патогенезе регрессирующей беременности. NO является протектором в отношении агрегации тромбоцитов, ингибирует адгезию лейкоцитов к эндотелию и угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток [4].

Причиной снижения синтеза и высвобождения оксида азота и дисфункции эндотелия является снижение активности NOS3, к чему приводит наличие патологических аллелей полиморфизмов генов NOS3: T-786C и NOS3: G894T.

Репродуктивные потери, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, выраженная задержка роста плода, раннеерзвитие тяжелойпреэклампсии являются следствием тромбозэмболических состояний и ассоциированы с наследственнойтромбофилией [5]. Примерно 40 % тромбозэмболий и около 30% акушерских осложнений связаны с наследственными тромбозфилиями [6].

Прокоагулянтные и антикоагулянтные механизмы лежат в основе полноценного плацентарного кровообращения, в связи с чем наследственные тромбозфилии могут приводить не только к развитию тромбозов во время беременности и в послеродовом периоде, но и к различным плацентарным сосудистым осложнениям, следствием которых может являться нарушение имплантации или развития эмбриона [7].

Известно, что осложненное течение беременности, в том числепотеря беременности, ассоциировано с гипергомоцистеинемией. Причины нарушения обмена гипергомоцистеинемии могут быть генетически детерминированными(дефекты генов и полиморфизмы, которые приводят к неполноценности ферментов, влияющих на метаболизм этой АК)и приобретенными[8].

Цель исследования:изучение роли ряда полиморфных аллелей генов тромбофилии, регуляторов сосудистого тонуса, фолатного цикла в генезе неразвивающейся беременности с неустановленной этиологией.

Задачи исследования:

1. Провести анализ причин неразвивающейся беременности
2. Изучить частоту встречаемости аллельныхвариантов генов системы фолатного цикла, генов системы гемостаза и генов системырегуляции сосудистого тонуса у женщин с неразвивающейся беременностью неустановленной этиологии.
3. Определить их роль в генезе потери беременности.

## Материалы и методы

Набор материала проведен по принципу сравнительного когортногопроспективного исследования. Неразвивающаяся беременность была верифицирована с использованиемтрансвагинального датчика. Обследовалось 246 женщин с уточненной регрессирующей беременностью, всем пациенткам после клиничко-лабораторного обследования проведено прерывание беременности путем мануальной вакуум-аспирации содержимого полости матки под внутривенным наркозом. Ворсинки хориона подвергались цитогенетическому исследованию, элементы плодного яйца гистологическому исследованию.

При анализе причин неразвивающейся беременности у 187 женщин был установлен предполагаемый фактор, вызвавший потерю беременности: 125 (66,8%)

женщин с выявленными хромосомными мутациями в ворсинках хориона, 28 (15%) женщин с экзудативными формами воспаления при гистологическом исследовании (предполагаемый инфекционный фактор), 6 (3,2%) женщин с проявлениями ОРВИ при беременности, 2 (1,1%) женщины с ВПР матки: двурогая матка, 11 (5,9%) женщин с значимыми опухолями матки и /или яичников, 4 (2,1%) женщины с эндокринопатией, влияющей на течение беременности, а также 11 (5,9%) женщин с другими причинами (Рисунок 1).

Таким образом выделено 59 женщин с неясным генезом неразвивающейся беременности – они составили опытную группу для изучения влияния роли полиморфизмов. Вторую группу составили 73 женщины с физиологически протекающей беременностью и благополучными перинатальными исходами без привычного невынашивания в анамнезе. Всем женщинам первой и второй группы проводилось молекулярно-генетическое исследование следующих полиморфизмов генов: генов тромбофилии, регуляторов сосудистого тонуса, фолатного цикла (таблица 1). Материал для молекулярно-генетического исследования получали путем соскоба эпителия слизистой влагалища стерильным одноразовым зондом. Полученный материал подвергался ПЦР-амплификации в режиме реального времени с использованием реагентов и протоколов фирмы НПО «ДНК-Технология» (РФ) на приборе ДТ-96 той же фирмы. Обработка результатов проводилась с учетом контроля взятия материала в полуавтоматическом режиме с помощью лгтатного программного обеспечения прибора ДТ-96.

Статистический анализ результатов проводили с использованием электронных таблиц статистической программы STATISTICA 7.0. Для оценки критерия значимости в двух независимых группах, представленных непараметрическими ранговыми величинами, использовали критерий Х<sup>2</sup> (Хи - квадрат). Для групп, представленных параметрическими величинами, использовали t-тест Стьюдента. Значение P<0,05 считали достоверным.

## Результаты и обсуждение

При анализе клиничко-анамнестических данных достоверных различий по числу беременностей и родов у женщин основной и контрольной групп не отмечено (P>0,05).

Средний возраст обследуемых женщин в основной и контрольной группах достоверно не различался. В основной группе он варьировал от 18 до 41года и составил 29,6± 5,2 года. В контрольной группе он был несколько выше 31,2±6,8 года и колебался от 19 до 42 лет, однако достоверной разницы выявлено не было t= -1,77; p=0,078.

Социальный статус, регион проживания, национальная принадлежность женщин в обеих группах были идентичными. По соматическому статусу группы также существенно не различались, поскольку женщины со значимыми экстрагенитальными заболеваниями исключены из исследования.

Наблюдаемое распределение частоты встречаемости генотипов промотора в группе обследованных больных и группе контроля соответствовало равновесию Харди-Вейнберга.

Таблица 1.

Ген	Полиморфизм
<b>Гены гемостаза</b>	
F2-протромбин (фактор II свертывания)	F2: 20210 G>A
F5-Лейдена (фактор V свертывания)	F5: 1691 G>A
ITGA2-α2 интегрин (тромбоцитарный рецептор к коллагену)	ITGA2-α2: 807 C>T
ITGB3-β (тромбоцитарный рецептор фибриногена)	ITGB3-β: 1565 T>C
FGB-фибриноген (фактор I свертывания)	FGB: 455 G>A
Серпин-1 (PAI-1) антагонист тканевого активатора плазминогена	PAI: 675 5G>4G
<b>Гены фолатного цикла</b>	
MTHFR:677 (метилентетрагидрофолатредуктаза)	MTHFR:677C>T
MTHFR:1298 (метилентетрагидрофолатредуктаза)	MTHFR:1298A>C
MTR (MTR:2756) – B12-зависимая метионин-синтаза	MTR:2756A>G
MTRR (MTRR: 66 метионин-синтаза-редуктаза)	MTRR: 66A>G
<b>Гены регуляторов сосудистого тонуса</b>	
eNOS (эндотелиальная NO-синтаза)	NOS3: 786T>C
eNOS (эндотелиальная NO-синтаза)	NOS3: 894G>T

Таблица 2. Гены регуляторов сосудистого тонуса

	1 группа	2 группа		1 группа	2 группа
<b>NOS3: 786T&gt;C эндотелиальная NO-синтаза</b>					
TT	23 (39%)	50(68,5%)	Аллель T,%	60,16	71,91
CT	25(42,4%)	5 (6,8%)	Аллель C,%	39,84	28,09
CC*	11(18,6%)	18 (24,7%)			
<b>NOS3: 894G&gt;T эндотелиальная NO-синтаза</b>					
GG	32(54,2%)	45(61,6%)	Аллель T,%	26,28	27,40
GT*	23 (39%)	16(21,9%)	Аллель G,%	73,72	72,60
TT	4 (6,8%)	12 (16,5%)			

\* - имеет достоверные отличия от данных контрольной группы (P менее 0,05)

Таблица 3. Гены гемостаза

	1 группа	2 группа		1 группа	2 группа
<b>F2-протромбин (фактор II свертывания) F2: 20210 G&gt;A</b>					
GG	59 (100%)	72(98,6%)	Аллель G,%	100,0	99,38
GA	0	1(1,4%)	Аллель A,%	0	0,68
AA	0	0			
<b>F5-Лейдена (фактор V свертывания) F5: 1691 G&gt;A</b>					
GG	58(98,3%)	71(97,3%)	Аллель G,%	99,15	98,63
GA	1(1,7%)	2(2,7%)	Аллель A,%	0,85	1,37
AA	0	0			
<b>ITGA2-α2 интегрин (тромбоцитарный рецептор к коллагену) ITGA2-α2: 807 C&gt;T</b>					
TT	9(15,3%)	10(13,7%)	Аллель T,%	37,29	38,35
CT	26(44,1%)	36(49,3%)	Аллель C,%	62,71	61,65
CC	24(40,6%)	27(37%)			
<b>ITGB3-β (тромбоцитарный рецептор фибриногена) ITGB3-β: 1565 T&gt;C</b>					
TT	37(62,7%)	48(65,8%)	Аллель T,%	77,96	80,13
CT	18(30,5)	21(28,8%)	Аллель C,%	22,04	19,87
CC	4(6,8%)	4 (5,4%)			
<b>FGB-фибриноген (фактор I свертывания) FGB: 455 G&gt;A</b>					
GG	34(57,6%)	41(56,2%)	Аллель G,%	61,01	60,95
GA	4(6,8%)	7(9,6%)	Аллель A,%	38,99	39,05
AA	21(35,6%)	25(34,2%)			
<b>Серпин-1 (PAI-1) антагонист тканевого активатора плазминогена PAI: 675 5G&gt;4G</b>					
5G5G	13(22%)	14(23,3%)	Аллель 5G,%	44,91	43,15
5G4G	27(45,8%)	35(47,9%)	Аллель 4G,%	55,09	56,85
4G4G	19(32,2%)	24(32,8%)			

Гены регуляторов сосудистого тонуса (Табл.2)

Математическая обработка полученных результатов показала, что встречаемость варианта CC промотора в положении 786 у женщин с регрессирующей беременностью неясного генеза была достоверно выше, чем у женщин с физиологически протекающей беременностью - 0,186 и 0,068 соот-

ветственно (P<0,05). При этом гетерозиготный вариант CT выявлялся чаще, а гомозиготный «дикий» вариант TT реже в 1 группе, но различия были недостоверны (табл.1). Распространенность патологического аллеля C у женщин 1 группы достоверно выше, чем у женщин 2 группы - 0,398 и 0,267 соответственно (P<0,05).

Таблица 4. Гены фолатного цикла

	1 группа	2 группа		1 группа	2 группа
<b>МТНFR:677 (метилентетрагидрофолатредуктаза) МТНFR:677 C&gt;T</b>					
ТТ*	17(28,8%)	3(4,1%)	Аллель Т,%*	50,0	20,54
СТ	25(42,4%)	24(32,9%)	Аллель С,%*	50,0	79,46
СС*	17(28,8%)	46(63%)			
<b>МТНFR:1298 (метилентетрагидрофолатредуктаза) МТНFR:1298 A&gt;C</b>					
АА	26(44,1%)	31(42,5%)	Аллель А,%	64,40	63,69
АС	24(40,7%)	33(45,2%)	Аллель С,%	35,60	36,31
СС	9(15,2%)	9(12,3%)			
<b>МTR (MTR:2756) – В12-зависимая метионин-синтаза MTR:2756 A&gt;G</b>					
GG	33(55,9%)	42(57,5%)	Аллель G,%	73,72	73,97
GA	21(35,6%)	24(32,9%)	Аллель А,%	26,28	26,03
AA	5(8,5%)	7(9,6%)			
<b>MTRR (MTRR: 66 метионин-синтаза-редуктаза) MTRR: 66 A&gt;G</b>					
GG*	12(20,3%)	4(5,5%)	Аллель G*,%	40,67	22,60
GA	24(40,7%)	25(34,2%)	Аллель А*,%	59,33	77,40
AA*	23(29%)	44(60,3%)			

\*- имеет достоверные отличия от данных контрольной группы (P менее 0,05)



Встречаемость гомозиготных вариантов GG и ТТ гена NOS3: G894T у пациентов 1 и 2 группы достоверно не отличались, однако отмечена более высокая частота нормальной гомозиготыGG у женщин 2 группы и патологической гомозиготы ТТ у пациентов 1 группы.

Распространенность гетерозиготного генотипа GT достоверно выше у женщин 1 группы- 0,39 против 0,219 во 2 группе (P<0,05).

Аллели G и T представлены примерно одинаково в обеих группах.

Установленные нами закономерности позволяют предположить роль патологических полиморфизмов гена NOS3 в генезе неразвивающейся беременности, что объясняется подавлением и/или снижением активности эндотелиальной NO - синтазы. Это может вести к развитию каскада патологических процессов, нарушающих механизмы децидуальной трансформации эндометрия, а также препятствующих становлению нормальной микроциркуляции в ворсинках хориона, исходом чего является неразвивающаяся беременность.

Гены гемостаза (Табл 3)

Статистически достоверных различий распространенности генов гемостаза в исследуемых группах не получено.

Возможно вклад тромбофилии в генез потерь беременности имеет место в более поздние сроки гестации с формированием активной васкуляризации хориона и плаценты.

Гены фолатного цикла (Табл 4)

Распространенность патологических аллелей полиморфизмов МТНFR:677 C>T и MTRR: 66 A>G у женщин 1 группы достоверно выше, чем у женщин 2 группы (P<0,05).

Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов генов МТНFR:1298A>C и MTR:2756 A>G в исследуемых группах достоверно не отличалась.

Полученные результаты свидетельствуют о важном вкладе генов фолатного цикла в этиологию и риск развития неразвивающейся беременности. Известно, что ги-

пергомощистеинемия является фактором риска развития нарушений нормального развития беременности. При этом в метаболизме гомоцистеина важную роль играют ферменты фолатного обмена (MTHFR677, MTRR). В связи с этим представляет интерес исследование у пациентов с НБ зависимости содержания уровня гомоцистеина (ГЦ) во взаимосвязи с различными полиморфными вариантами генов фолатного обмена.

Исследование уровня ГЦ в сыворотке крови у пациентов с НБ в анамнезе показало достоверное повышение его уровня в I триместре беременности по сравнению с контрольной группой (соответственно  $16,07 \pm 1,91$  и  $8,3 \pm 1,22$  мкмоль/л,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, наши исследования показывают, что наличие полиморфизмов в генах фолатного обмена приводят к усугублению гипергомощистеинемии, что, несомненно, является одним из звеньев патогенеза неразвивающейся беременности I триместра.

## Заключение

При неуточненном генезе неразвивающейся беременности целесообразно углубленное обследование полиморфизмов генов фолатного цикла и регуляторов сосудистого тонуса, а также уровня гомоцистеина.

Результаты обследования позволят грамотно выстроить тактику прегравидарной подготовки конкретной пациентки. ■

*Ковалев В.В., д.м.н., профессор, Потанов Н.Н., акушер-гинеколог ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, ГБОУ ВПО УГМУ, г.Екатеринбург. Автор, ответственный за переписку - Потанов Николай Николаевич, 620109, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1, e-mail: poniknik@gmail.com, тел. +7-905-807-5111*

## Литература:

1. Серова О.Ф., Милованов А.П. Основные патоморфологические причины неразвивающейся беременности и обоснование прегравидарной терапии женщин. *Акушерство и гинекология* 2001; 3: 19–23.
2. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патоморфологическая диагностика ранних самопроизвольных выкидышей. СПб., 1999:96.
3. Amoroso G., van-Veldhuisen D.J., Tio R., Mariani M. Pathophysiology of vascular endothelium and circulating platelets: implications for coronary revascularisation and treatment. *Int.J.Cardiol.* 2001. Vol. 79(2-3): 265–275
4. Кравченко Н.А., Ярмыш Н.В. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы регуляции синтеза оксида азота эндотелиальной NO-синтазой в норме и при сердечно-сосудистой патологии. *Укр. терапевт. журн.* 2007. № 1: 82–89.
5. Coppens, M. *Inherited thrombophilias text.* / M. Coppens, S.P. Kaandorp, S. Middeldorp // *ObstetGynecolClin North Am.* -2006.-Vol.33(3).-P.357-374
6. Lin, J. *Genetic thrombophilias and preeclampsia. A meta-analysis, text.* / J. Lin, P. August // *Obstet Gynecol.* -2005,- Vol.105.-P.182-192.
7. Nelen W.L.D.M., Bloom H.J., Steegers E.A.P., den Heijer M., Eskes T.K.A.B. *Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis.* // *FertilSteril.* -2000. - Vol. 74. - P. 1196-1199
8. Altomare, I. *The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature text.* / I. Altomare, A. Adler, L.M. Aledort. // *Thrombosis Journal.* - 2007. P.5-17
9. Rossi G.P., Taddei S., Viridis A. et al. *The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients.* *J. Amer. Coll. Cardiology.* 2003. Vol. 41: 938-945.
10. Kalina A., Alwazir F., Volf P. [et al.]. *Relationship between diastolic function by TDI and angiotensin convertin enzyme I/D, angiotensin II type 1 receptor A1166C and endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphisms in hypertension* / *J. Hypertension.* 2007. Vol. 25 (suppl 2): 17–77.
11. Laskin, C.A. *Low Molecular Weight Heparin and Aspirin for Recurrent Pregnancy Loss: Results from the Randomized, Controlled HepASA Trial, text.* / C.A. Laskin [et al] // *J. Rheumatol.* - 2009.- № 4.