

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПРИ МНОГОПЛОДИИ С ПОМОЩЬЮ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ¹Никитина И. Н. (*nikitina-med@mail.ru*), ²Бойчук А. В. (*boychuk-alla@rambler.ru*)¹Сумский государственный университет, Сумы, Украина²ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины», Тернополь, Украина

Цель: снижение частоты невынашивания беременности путем изучения и прогнозирования влияния генетических предикторов у женщин с многоплодием.

Материал и методы. Изучены особенности распределения полиморфизма генов IL-8 (-781 C/T), MTHFR C677T, FII G20210A, FV(Leiden) G1691A и PAI-1675 5G/4G и их роль у женщин с невынашиванием многоплодной беременности. Проведена оценка прогностической роли выявленных генетических предикторов в развитии невынашивания беременности.

Выводы. При анализе частоты аллелей и генотипов показан риск репродуктивных потерь между обследованными женщинами и контрольной группой, установлены наиболее значимые генетические маркеры и определено взаимодействие по полиморфизмам изученных генов.

Ключевые слова: многоплодная беременность, невынашивание беременности, полиморфизм, мутация генов.

Введение

В настоящее время вопросы невынашивания беременности (НБ) приобрели статус одного из приоритетных направлений в акушерстве в связи с распространенной высокой частотой неблагоприятных исходов для матери и плода. Особо остро эта проблема касается многоплодной беременности [1]. Частота преждевременных родов при многоплодии составляет 54,3% по сравнению с 9,7% при одноплодной беременности. Это связано с полиэтиологичностью самопроизвольного прерывания беременности и преждевременных родов в общей популяции населения, а также с рядом специфических условий, имеющих место у женщин с многоплодной беременностью [2]. Потерянные беременности составляют почти 17% всех желаемых, при этом 75-80% выкидышей случается в ранних сроках (до 12 недель беременности) и, к сожалению, не имеется тенденции к снижению этих показателей.

Невынашивание беременности можно рассматривать как мультифакторное заболевание, возникающее в результате взаимодействия функционально слабых аллелей многих генов на фоне неблагоприятных внешних и внутренних факторов влияния на организм женщины. Поиск генетических маркеров мультифакторной патологии, основанный на изучении полиморфизма отдельных генов, является особо важным, а определение аллелей генов, которые определенным образом влияют на течение беременности, имеет огромное значение для выявления групп риска и предупреждения возникновения невынашивания беременности. Именно сочетание неполноценных, функционально слабых аллелей на фоне провоцирующих факторов внутренней и внешней среды может приводить к патологии беременности и нарушению развития эмбрионов [3].

Эпидемиологические исследования показывают, что наследственные и приобретенные тромбофилии матери могут запускать каскад

патогенетических механизмов при невынашивании беременности [4]. Доля наследственных тромбофилий в структуре причин НБ составляет 30-55%. Основными считаются полиморфизм генов ферментов фолатного цикла (5, 10-метилентетрагидрофолат редуктаза MTHFR C677T); свертывающей системы крови (мутация генов протромбина FII G20210A, фактора V FV(Leiden) G1691A) системы фибринолиза (полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена 1 PAI-1675 5G/4G) [4]. MTHFR – фермент группы флавопротеинов – играет важную роль в синтезе метионина из гомоцистеина. Носительство аллеля 677T приводит к термолабильности фермента, что ведет к замене в молекуле фермента аминокислоты аланина на валин (Ala222Val) в каталитическом домене, в результате отмечается снижение ферментативной активности у гомозигот по полиморфному аллелю на 60%, у гетерозигот – на 30%, что влечет за собой повышение уровня гомоцистеина. Патогенез осложнений при гомоцистеинемии заключается в повреждении эндотелия сосудов с повышением процессов коагуляции, микротромбообразования, приводящего к нарушению инвазии трофобласта, плацентации и фетоплацентарного кровотока [5].

Основным механизмом, предотвращающим тромбообразование, является фибринолиз, его центральное звено – ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), уровень которого в плазме зависит от полиморфизма гуанозина (5G/4G), делеция/вставка в области промотера гена PAI-1. Угнетение фибринолиза, вызванное полиморфизмом этих генов (в основном в гомозиготном состоянии), нарушает процесс имплантации blastocyst и формирование системы «мать-плацента-плод», что может стать как причиной бесплодия и ранних потерь беременности, так и привести к аномалиям плацентации и спровоцировать развитие патогенетических механизмов акушерских осложнений: невынашивание беременности, антенатальная гибель плода [6]. К ряду осложнений беременности, – а именно

невынашиванию, фетоплацентарной дисфункции, гестозу, задержке развития плода – ведет наличие мутации FV(Leiden). В результате мутации G1691A происходит замена остатка аргинина на глицин в участке 506, что приводит к нечувствительности фактора V к активированному белку C, повышается уровень этого фактора в плазме, что обуславливает усиленное образование тромбина и патологии свертывания крови, которая является причиной осложнений гестации. Мутация гена протромбина FII G20210A характеризуется заменой гуанина на аденин в позиции 20210, при этом полиморфизм уровня протромбина в плазме может быть повышен на 30%, что провоцирует появление избыточного количества сгустков, повышая риск венозных тромбозов, и приводит к потерям плода, преимущественно в I триместре. Мутация имеет аутосомно-доминантный тип наследования, что свидетельствует о том, что тромбофилия может возникнуть и у гетерозиготного носителя.

Наряду с влиянием генетических полиморфизмов на развитие осложнений во время беременности, связанных со свертывающей системой крови и гомоцистеинемией, в литературе существуют данные о влиянии полиморфизма генов цитокинов на создание иммунного ответа и течение беременности. Основная функция интерлейкина-8 (IL-8) в создании иммунного ответа – роль хемоаттрактанта для гранулоцитарных лейкоцитов. IL-8, который продуцируют клетки плаценты, активно участвует в развитии трофобласта на ранних сроках беременности, потенцирует иммунную компетентность плацентарных клеток против бактерий, атакующих фетоплацентарный комплекс [7]. Одним из ответственных факторов за процесс успешной инвазии трофобласта является именно IL-8. Этот цитокин влияет на индукцию ангиогенеза в месте прикрепления зародыша. Повышение секреции IL-8 в системе «мать-плацента-плод» свидетельствует о его важной роли в поддержании иммунологической толерантности во время беременности [2].

Целью нашего исследования было снижение частоты невынашивания беременности путем изучения и прогнозирования влияния генетических предикторов у женщин с многоплодием.

Материал и методы

Работа выполнена на базе Сумского областного перинатального центра, исследования проводились в лаборатории молекулярно-генетических исследований Сумского государственного университета. Обследовано 160 пациенток с двойней, у 84 (52,5%) из которых беременность протекала на фоне угрозы самопроизвольного выкидыша или преждевременных родов, они составили основную группу обследованных женщин. Контрольная группа состояла из 47 беременных с физиологическим течением гестации. Все пациентки проходили молекулярно-генетическое тестирование мутации генов IL-8 (-781 C/T), MTHFR C677T, FII G20210A, FV(Leiden) G1691A и PAI-1 675 5G/4G. Для определения

связи полиморфизма с невынашиванием беременности было проведено выделение ДНК из периферической крови беременных обследуемых групп. Венозную кровь у беременных с многоплодием и у здоровых лиц набирали в стерильных условиях в моноветы объемом 2,7 мл с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (11,7 ммоль) в качестве антикоагулянта («Sarstedt», Германия). ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с использованием наборов D1AtomDNAprep 100 («Isogene», Россия). Определение аллельного полиморфизма проводилось с использованием метода аллель-специфической полимеразной цепной реакции с последующим гидролизом ампликонов соответствующей рестриктирующей эндонуклеазой. Геномную ДНК из образцов крови выделяли по стандартной методике с использованием протеиназы K, фенол-хлороформной экстракции и осаждения этанолом. Идентификацию аллельных вариантов проводили по наличию сайта узнавания для соответствующей рестриктирующей эндонуклеазы с помощью электрофореза в агарозном геле. При наличии мутации обнаруживается образование двух низкомолекулярных полос, что появляются под действием фермента. Полное расщепление продукта ПЦР свидетельствовало о наличии в анализируемой ДНК гомозиготной формы мутации, а частичное – гетерозиготной. Анализ распределения изучаемых генотипов проводился с помощью теста χ^2 . Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверено на соответствие равновесию Харди Вайнберга с помощью теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между разными группами использовали критерий Пирсона.

Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа ассоциации аллелей и генотипов исследуемых генов с риском развития акушерских осложнений рассчитано отношение шансов (OR) с 95% доверительными интервалами. Статистический анализ проведен с использованием GENEPOP и OpenEpi статистических пакетов.

Все исследования проводились в соответствии с принципами экспериментальной и клинической биоэтики.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного молекулярно-генетического тестирования показали, что мутация MTHFR C677T обнаружена у 32 женщин (38,1%), полиморфизм гена PAI-1 675 5G/4G у 16 (19,0%), FII G20210A у 1 (1,2%), FV(Leiden) G1691A у 7 (8,3%) и различные комбинации мутаций у 28 (33,3%). Для выявления возможных ассоциаций полиморфизмов генов с НБ нами проведен сравнительный анализ частот аллелей и генотипов между пациентками с невынашиванием беременности и контрольной группой. Согласно полученным результатам, полиморфизм MTHFR C677T у женщин основной группы встречался в гетерозиготном варианте – 51,2%, в контрольной группе – 13,5%, гомозиготная мутация гена MTHFR C677T составила 15,4%,

что в три раза превысило показатели контрольной группы – 5,4%. Анализ мутации гена PAI-1 675 5G/4G в основной группе показал снижение нормального генотипа 5G/4G (54,8%) по сравнению с контрольной группой (75,7%, $p < 0,05$), при этом доля гетеро- и гомозиготных носителей генотипов была выше по сравнению с контрольной группой (25,0 и 20,2% против 18,9 и 5,4%). Отмечена высокая частота гомо- и гетерозиготного носительства мутации FV(Leiden) G1691A, 12,8%, 2,6% по сравнению с контрольной группой – 2,7%, 0%.

При проведении исследования распределения полиморфизма гена IL-8 в локусе – 781C/T получены результаты в виде фрагментов аллельных генов. Для полиморфизма гена 781C/T IL-8 гомозигота по доминантному типу была обозначена как CC, гетерозигота – CT, гомозигота по рецессивному типу – TT. У женщин с невынашиванием беременности получены следующие результаты: CC – 19,1% случаев, CT – 57,1% случаев, TT – 23,8% случаев. В контрольной группе соответствующие показатели составили 42,5%, 40,4% и 17,1%, результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Распределение полиморфизма гена IL-8 в локусе – 781C/T

Группа обследуемых	Гомозигота CC – по доминантному типу (%)	гетерозигота – CT (%)	Гомозигота TT – по рецессивному типу (%)
Основная группа	19,1	57,1	23,8
Контрольная группа	42,5	40,4	17,1

По сравнению с контрольными показателями у женщин с невынашиванием беременности выявлено значительное уменьшение количества доминантных аллельных генов в соответствующем локусе за счет уменьшения количества гомозигот по доминантному типу. Поскольку для оценки показателей генетических исследований, учитывая их этнические и другие особенности, используются методы статистических моделей, нами проведен соответствующий статистический анализ с определением относительных рисков развития патологии в зависимости от аллельного состава исследуемых генов. В связи с тем, что распределение показателей в выборке генетических исследований у женщин основной и контрольной групп соответствует закону Харди-Вайнберга, возможно применение различных моделей подражания для определения роли аллельного состава гена в формировании успешного течения беременности у женщин украинской популяции. Модели подражания показали, что генотип C/T имел наибольшую среди указанных вероятность развития нарушений беременности, для этого генотипа отношение шансов по качеству течения беременности равнялось 2,01, что свидетельствует о вдвое большей вероятности развития патологических осложнений. Для генотипа T/T такое отношение шансов составило

1,50, что позволяет утверждать, что вероятность развития патологии беременности при наличии данного генотипа в 1,5 раза выше по сравнению с другими. Рассматривая доминантную модель подражания, можно утверждать, что все варианты генотипа, которые содержат в своем составе аллель T, с большей вероятностью будут иметь осложнения в течении беременности, в частности, в виде невынашивания, по сравнению с носителями доминантного аллеля C. При этом показателем отношения шансов указывает на то, что в данной когорте лиц риск развития невынашивания беременности суммарно почти втрое выше показателя для тех, кто имеет в своем генотипе гомозиготный по доминантному типу состав полиморфного гена. Расчеты относительного риска патологии беременности в виде рецессивной модели подражания, выявили повышенный риск патологии беременности у лиц с гомозиготным по рецессивному аллелю составом полиморфного гена IL-8. В данном случае отношение шансов равно достоверно 1,50, то есть относительный риск развития невынашивания выборочно для носителей рецессивного аллельного варианта гена в 1,5 раза выше, чем таковой для лиц, имеющих в составе полиморфного гена доминантную аллель. Полученные результаты показали, что частота аллеля C высокой экспрессии гена IL-8 встречается преимущественно при физиологическом течении беременности по сравнению с таковым у женщин с невынашиванием. В то же время аллель T указанного полиморфизма -781 C/T гена IL-8 оказывается преимущественно у женщин с имеющимися гестационными осложнениями. По результатам подсчетов, при наличии аллеля T гена IL-8 (-781 C/T) отношение шансов для патологического течения беременности равен 1,85, а при наличии аллеля C – 0,54. То есть шанс на осложненное течение беременности в 1,85 раза больше у носителей аллеля T. Таким образом, именно аллель C в гомозиготном состоянии (CC) может считаться генетическим маркером успешной беременности. Проведенные исследования позволяют утверждать, что носители всех вариантов аллеля T (суммарно гомозиготы по рецессивному аллелю и гетерозиготы) имеют в три раза выше шансы развития невынашивания относительно носителей доминантного гена в гомозиготном варианте. А гомозиготы с рецессивным типом имеют в 1,5 раза выше шансы осложнений по сумме всех носителей доминантного гена (гомозигот по доминантным геном и гетерозигот).

Выводы

1. В результате проведенного исследования удалось определить наиболее важные предикторы, ассоциирующиеся с риском невынашивания беременности при многоплодии MTHFR C677T, FV(Leiden) G1691A и IL-8 (-781 C/T). Комбинации как гомо-, так и гетерозиготных генотипов этих генов ассоциируются с риском развития репродуктивных потерь.

2. Своевременное выявление генетических предикторов позволит оптимизировать преко-

цепционную подготовку для снижения риска репродуктивных потерь и акушерских осложнений.

3. Наличие генетических маркеров послужит показанием к усиленному контролю гемостаза,

иммунологического статуса, уровня гомоцистеина во время беременности и при необходимости проведение лечебных мероприятий.

Литература

1. Дубоссарская З. М. Основные вопросы иммунологии репродукции / З. М. Дубоссарская, Ю. А. Дубоссарская // Здоровье Украины. – 2010. – № 4 (31). – С. 15-21.
2. Радзинский В. Е. Неразвивающаяся беременность / В. Е. Радзинский, В. И. Дмитрова, И. Ю. Майскова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 200 с.
3. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss / S. Daher [et al.] // J. of Reproductive Immunology. – 2003. – Vol. 58, № 1. – P. 69-77.
4. Bura-Riviere, A. Trombophilia and pregnancy / A. Bura-Riviere // Rev. Prat. – Vol. 62, № 7. – P. 937-942.
5. Murphy, M. M. Homocystein in pregnancy / M. M. Murphy, J. D. Fernandes-Ballart // Adv. Clin. Chem. – Vol. 53. – P. 105-137.
6. Ohtyrskaya, T. Rol' RAI-1 v povtornyh neudachah VRT [Rol' RAI-1 in repeated failures ART] / T. Ohtyrskaya, K. Yavorovskaya, A. Shurshalina // Problemy reprodukci. – № 4. – P. 45-49.
7. Medica, I. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage – a meta-analysis / I. Medica // Reproductive BioMedicine. – 2009. – Vol. 19, № 3. – P. 406-414.

References

1. Dubossarskaja, Z. M. Osnovnye voprosy immunologii reprodukcii / Z. M. Dubossarskaja, Ju. A. Dubossarskaja // Zdorov'e Ukrainy. – 2010. – № 4 (31). – S. 15-21.
2. Radzins'kij, V. E. Nerazvivajushhajasja beremennost' / V. E. Radzins'kij, V. I. Dmitrova, I. Ju. Maskova. – Moscow, 2009. – 200 s.
3. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss / S. Daher [et al.] // J. of Reproductive Immunology. – 2003. – Vol. 58, № 1. – P. 69-77.
4. Bura-Riviere, A. Trombophilia and pregnancy / A. Bura-Riviere // Rev. Prat. – Vol. 62, № 7. – P. 937-942.
5. Murphy, M. M. Homocystein in pregnancy / M. M. Murphy, J. D. Fernandes-Ballart // Adv. Clin. Chem. – Vol. 53. – P. 105-137.
6. Ohtyrskaya, T. Rol' RAI-1 v povtornyh neudachah VRT [Rol' RAI-1 in repeated failures ART] / T. Ohtyrskaya, K. Yavorovskaya, A. Shurshalina // Problemy reprodukci. – № 4. – P. 45-49.
7. Medica, I. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage – a meta-analysis / I. Medica // Reproductive BioMedicine. – 2009. – Vol. 19, № 3. – P. 406-414.

THE ABILITY TO PREDICT MISCARRIAGE IN MULTIPLE PREGNANCY BY EVALUATING GENETIC PREDICTORS

¹Nikitina I. N., ²Boychuk A. V.

¹Educational Establishment "Sumy State University", Sumy, Ukraine

²State Higher Educational Establishment "I.Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine", Ternopil, Ukraine

Objective. Reduction in incidence of miscarriages by studying and predicting the influence of genetic predictors in women with multiple pregnancy.

Material and methods. The peculiarities of distribution of polymorphisms in IL-8 (-781 C/T), MTHFR C677T, FII G20210A, FV(Leiden) G1691A and PAI-1675 5G/4G genes and their role in women with multiple pregnancy miscarriage were studied. Prognostic role of identified genetic predictors in the development of miscarriage was evaluated.

Conclusions. The analysis of allele and genotype frequency showed the risk of reproductive losses in examined women as compared to the control group; the most significant genetic markers were discovered and their interaction was determined by polymorphisms in the studied genes.

Keywords: multiple pregnancy, miscarriage, polymorphism, genes mutation.

Поступила: 22.11.2016

Отрецензирована: 02.12.2016