

УДК 618.39 - 021.3:575.224.2

© Колектив авторів, 2012.

ПОШУК ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ, ЩО ЗБІЛЬШУЮТЬ РИЗИК САМОВІЛЬНОГО АБОРТУ

Г. В. Макух, Д. В. Заставна, Л. Б. Чорна, Б. І. Третяк, Я. Ю. Заганяч, О. З. Гнатейко
Державна установа «Інститут спадкової патології НАМН України» (директор – професор О. З. Гнатейко), м. Львів.

SEARCH FOR GENETIC MARKERS THAT INCREASE THE SPONTANEOUS ABORTION RISK H. V. Makukh, D. V. Zastavna, L. B. Chorna, B. I. Tretyak, Y. Y. Zahanyach, O. Z. Hnateyko

SUMMARY

The results of molecular genetic studies of mutations FV 1691G→A, FII 20210G→A, alleles of polymorphic loci PAI-1 675 4G/5G, MTHFR 677C→T, MTHFR 1298A→C, MTR 2756→G, MTRR 66A→G, IGF2 820G→A in women with recurrent spontaneous abortion are presented. Totally, mutations FV 1691G→A and FII 20210G→A were detected in 14,28% women with recurrent spontaneous abortion compared to 5,00% persons of the control group, indicating a significant contribution of the mutations to spontaneous abortion risk increasing. It has been established that the presence in women of 4G allele of polymorphic locus PAI-1 675 4G/5G (1,6 fold), MTRR 66G allele (1,8 fold), IGF2820GA genotype (2,5 fold) increase the risk of spontaneous abortion. The presence of genotype MTR 2756GG and 2756G allele has a protective effect and reduces the risk of spontaneous abortion.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, УВЕЛИЧИВАЮЩИХ РИСК САМОПРОИЗВОЛЬНОГО АБОРТА Г. В. Макух, Д. В. Заставна, Л. Б. Чорна, Б. И. Третяк, Я. Ю. Заганяч, О. З. Гнатейко

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты молекулярно-генетического исследования мутаций 1691G→A гена FV, 20210G→A гена FII, аллелей полиморфных локусов 675 4G/5G гена PAI-1, 677C→T и 1298A→C гена MTHFR, 2756A→G гена MTR, 66A→G гена MTRR, 820G→A гена IGF2 у женщин с рецидивирующим самопроизвольным абортom. Мутации FV 1691G→A и FII 20210G→A суммарно обнаружены у 14,28% женщин группы исследования по сравнению с 5,00% лиц контрольной группы, что указывает на вклад данных мутаций в увеличение риска самопроизвольного аборта. Установлено, что достоверно повышает риск самопроизвольного аборта наличие у женщины 4G аллеля полиморфного локуса 675 4G/5G гена PAI-1 (1,6 раза), 66G аллеля гена MTRR (1,8 раза), генотипа 820GA гена IGF2 (2,5 раза). Наличие генотипа MTR 2756GG и аллеля 2756G имеет протекторный эффект и уменьшает риск самопроизвольного аборта.

Ключові слова: ДНК, генетична схильність, гени фолатного обміну, самовільний аборт, спадкова тромбофілія.

Незважаючи на велике число факторів, які можуть спричинити переривання вагітності, дія їх в більшості випадків на кінцевому етапі однотипова і окреслюється терміном самовільний аборт чи викидень [2]. Факт, що жінки з історією втрати вагітності мають у 2-4 рази більший ризик подальшого викидня, вказує, що частина ідіопатичних випадків самовільного аборту має мультифакторну етіологію [1, 3]. Тобто, є присутніми певні алелі генів, які, власне, і зумовлюють у жінки генетичну схильність до виникнення рецидивуючого самовільного аборту РСА [5]. У світі вивчається алельний поліморфізм десятків різних генів, які відносяться до генної сітки невиношування вагітності, і змінені білки, які прямо чи опосередковано можуть спричинитися до порушення розвитку ембріона [6, 7]. Пошук спадкових мутацій, що збільшують ризик викиднів, доцільно проводити у жінок з рецидивуючим самовільним абортom, у яких, найімовірніше, присутні гени схильності до невиношування вагітності. Грунтуючись на даних

аналізу літератури, ми зосередили наші дослідження на аналізі спектру та частоти алельних варіантів генів гемостазу (FV, FII, PAI-1), фолатного обміну (MTHFR, MTR, MTRR), інсулін-подібного фактору росту – II (IGF2) для ідентифікації алелів, що зумовлюють у жінки підвищений генетичний ризик самовільного аборту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження слугували зразки крові 84 жінок, в анамнезі яких були два і більше випадки самовільного аборту. Контрольну групу склали 120 жінок без ускладненого генетичного та акушерського анамнезу, які народили двох та більше здорових дітей. Зразки біологічного матеріалу осіб, які брали участь в дослідженні, були отримані після одержання інформованої згоди про зберігання ДНК і проведення досліджень. Проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом висолування. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, викори-

стовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використовували олігонуклеотидні праймери, ендонуклеази рестрикції та термостабільну Taq-полімеразу («Fermentas») (Вільнюс, Литва). Генетичне тестування мутацій 1691G→A гена *FV*, 20210G→A гена *FII* та алелів поліморфних локусів 675 4G/5G гена *PAI-1*, 677C→T і 1298A→C гена *MTHFR*, 2756A→G гена *MTR*, 66A→G гена *MTRR*, 820G→A гена *IGF2* проводили методом аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Електрофорез проводили у 2,5% агарозному гелі та сканували на УФ-трансліюмінаторі. Перевірку статистичних гіпотез проводили за допомогою критерію χ^2 на рівні значущості $p < 0,05$ та застосовували точний критерій Фішера. Відносний ризик визначали за величиною співвідношення шансів (OR, 95% довірчий інтервал).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено молекулярно-генетичне дослідження мутацій 1691G→A гена *FV*, 20210G→A гена *FII*, алелів поліморфних локусів 675 4G/5G гена *PAI-1*, 677C→T і 1298A→C гена *MTHFR*, 2756A→G гена *MTR*, 66A→G гена *MTRR*, 820G→A гена *IGF2*. Результати генетичного тестування алельних варіантів генів *FV*, *FII*, *PAI-1*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *IGF2*

у жінок з рецидивуючим самовільним абортom у порівнянні з контролем та результати проведених статистичних підрахунків подані у таблиці 1.

Як свідчать дані, наведені у таблиці 1, лейденську мутацію *FV* 1691G→A втричі частіше виявляли у жінок дослідної групи порівняно з контролем. Частота мутантного 1691A алеля у дослідній групі жінок була вірогідно вищою і становила 0,060, у порівнянні з 0,021 у групі матерів здорових дітей. Обрахунок коефіцієнта відносного ризику виявив, що наявність у жінки мутації *FV* 1691G→A у гетерозиготному стані вірогідно збільшує ризик самовільного аборту у 3 рази. Отримані результати свідчать, що не менше 5,00% випадків самовільного аборту обумовлені, в тому числі, мутацією 1691G→A гена *FV*. Мутацію 20210G→A гена *FII* є рідкіснішою і її виявлено у двох пацієток, в анамнезі яких було по дві завмерлі вагітності I триместру. Частота мутантного 20210A алеля була вищою у дослідній групі жінок (0,012), ніж у контролі (0,004). На відміну від мутацій 1691G→A гена фактора V згортання крові та 20210G→A гена фактора II згортання крові, для яких доведено їх внесок у розвиток тромбофілічних станів, внесок різних алелів гена *PAI-1* є менше досліджений.

Таблиця 1

Розподіл генотипів досліджених алельних варіантів генів у жінок з рецидивуючим самовільним абортom

Генотип	Жінки з PCA (n=84)		Контрольна група (n=120)		p	OR (CI – 95%)
	n	%	n	%		
<i>FV</i> 1691G →A (Лейденська мутація)						
GG	74	88,10	115	95,83	0,054*	1,00
AG	10	11,90	5	4,17		3,11 (1,02-9,46)
AA	0	-	0	-		-
<i>FII</i> 20210G →A						
GG	82	97,62	119	99,17	0,560	1,00
AG	2	2,38	1	0,83		2,90 (0,26-2,26)
AA	0	-	0	-		-
<i>PAI-1</i> 4G/5G						
5G/5G	12	14,29	32	26,67	0,034*	1,00
5G/4G	38	45,24	52	43,33	0,787	1,08 (0,62-1,89)
4G/4G	34	40,48	36	30,00	0,120	1,59 (0,88-2,85)
<i>MTR</i> 2756A→G						
A/A	50	59,52	52	43,33	0,007*	1,00
A/G	28	33,34	46	38,33	0,554	0,80 (0,45-1,44)
G/G	6	7,14	22	18,33	0,023*	0,34 (0,13-0,89)
<i>MTRR</i> 66A→G						
AA	8	9,52	34	28,33	0,001*	1,00
AG	42	50,00	50	41,67	0,240	1,40 (0,80-2,45)
GG	34	40,48	36	30,00	0,120	1,60 (0,88-2,85)
<i>MTHFR</i> 677C→T						
C/C	40	47,61	64	53,33	0,420	1,00
C/T	32	38,10	48	40,00	0,780	0,92 (0,52-1,64)
T/T	12	14,29	8	6,67	0,070	2,33 (0,91-5,99)

Продовження таблиці 1

Генотип	Жінки з PCA (n=84)		Контрольна група (n=120)		p	OR (CI – 95%)
	n	%	n	%		
<i>MTHFR</i> 1298A→C						
A/A	38	45,23	52	43,33	0,790	1,00
A/C	32	38,10	54	45,00	0,330	0,75 (0,43-1,33)
C/C	14	16,67	14	11,67	0,310	1,51 (0,68-3,37)
<i>IGF2</i> 820G→A						
G/G	45	53,57	74	61,66	0,055	1,00
G/A	37	44,05	29	24,17	0,004*	2,5 (1,36-4,50)
A/A	2	2,38	17	14,16	0,006*	0,15 (0,03-0,67)

* – статистично вірогідна відмінність.

Аналіз поліморфного локусу 675 5G/4G гена *PAI-1* у групі дослідження показав вірогідне зниження частки нормального генотипу 5G/5G у дослідній групі – 14,29%, у порівнянні з контролем – 26,67% ($p < 0,05$) та зв'язок з підвищенням ризику самовільного абортів для 4G алеля. Отримані результати свідчать про внесок мутацій асоційованих із розвитком тромбофілічних станів в етіології самовільного абортів. Встановлення у жінки генетичної схильності до тромбофілії і проведення відповідних профілактичних заходів є ефективним способом попередження розвитку цілого ряду патологічних станів, таких як порушення плацентациї, затримка розвитку плода, гестоз, фетоплацентарна недостатність [6].

Ферменти, задіяні у фолатному циклі, здійснюють метилювання ДНК, при зміні якого виникають порушення хромосомної сегрегації та експресії генів, що може, як ми припускаємо, бути причиною поліплоїдії або анеуплоїдії хромосомного набору плоду, та, як наслідок, викидня. Дане припущення потребує дослідження шляхом вивчення поширеності низькофункціональних алелів генів фолатного обміну у генотипах жінок із невиношуванням вагітності. При порівнянні частоти носіїв мутації 677C→T гена *MTHFR* у групі жінок з рецидивуючим самовільним абортів та жінок контрольної групи, можна відзначити тенденцію до зростання частки осіб з одонуклеотидною заміною 677C→T серед жінок дослідної групи (табл. 1.). Проте, відмінності у розподілі генотипів та алелів локусу 677C→T гена *MTHFR* у жінок дослідної та контрольних груп статистично вірогідних значень не досягли. Також не виявлено вірогідних відмінностей у розподілі алелів та генотипів поліморфного локусу 1298A→C гена *MTHFR* між дослідною та контрольною групами. У результаті дослідження одонуклеотидної заміни 2756A→G гена *MTR* виявлено, що у групі жінок з рецидивуючим самовільним абортів вірогідно частіше зустрічалися особи з нормальним генотипом 2756AA (табл. 1). При обрахунку коефіцієнта

відношення шансів у дослідній групі жінок показано статистично вірогідне зниження ризику самовільного абортів для жінок з генотипом *MTR* 2756GG (OR=0,34, $p < 0,05$) (табл. 1). Протекторний ефект підтверджений статистичними обрахунками частот алелів поліморфного локусу *MTR* 2756A→G. Алель 2756G асоціюється із вдвічі нижчим ризиком самовільного абортів у порівнянні із алелем *MTR* 2756A. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу поліморфного локусу 66A→G гена *MTRR* у групі жінок із самовільним абортів виявлено статистично вірогідні відмінності у порівнянні із даними, отриманими у групі жінок, які мають двох і більше здорових дітей. Як свідчать результати, наведені у таблиці 1, частота нормального генотипу *MTRR* 66AA у жінок дослідної групи була значно нижчою у порівнянні з контролем ($p = 0,001$). Обрахунок відношення шансів показав, що наявність у жінки *MTRR* 66G алеля вірогідно збільшує ризик PCA у 1,8 рази, що підтвердилося й розрахунками додаткового ризику за домінують моделлю. Виявлено відмінності у співвідношенні жінок з різною кількістю низько функціональних алелів генів фолатного обміну між групою жінок з рецидивуючим самовільним абортів та контрольною групою та встановлено, що наявність у генотипі жінки 5-ти несприятливих алелів досліджуваних генів збільшує ризик самовільного абортів у 10 разів ($p = 0,0004$).

Результати досліджень локусу 820G→A гена інсуліноподібного фактора росту-II вказують на вірогідні відмінності щодо розподілу генотипів у досліджуваних групах із зростанням у дослідній групі частки гетерозиготного генотипу *IGF2* 820GA (табл. 1). Встановлено вірогідна різниця за частотою генотипів AA та GA гена *IGF2*, наявність останнього збільшує ризик самовільного абортів у 2,5 рази. Опубліковані дослідження локусу 820G→A гена інсуліноподібного фактора росту-II виявили зростання ризику самовільного абортів при наявності *IGF2* G алеля та асоціацію між алелями досліджуваного локусу та ризиком розвитку ендометріозу [4, 7].

ВИСНОВКИ

1. Мутації FV 1691G→A та FII 20210G→A сумарно виявлено у 14,28% жінок із рецидивуючим самовільним абортom у порівнянні з 5,00% осіб контрольної групи, що вказує на вагомий внесок цих мутацій у виникненні самовільного абортu.

2. Встановлено зростання генетичного ризику самовільного абортu при наявності у жінки 4G алеля поліморфного локусу 675 4G/5G гена *PAI-1* (1,6 рази), 66G алеля гена *MTRR* (1,8 рази), генотипу 820GA гена *IGF2* (2,5 рази). Наявність генотипу *MTR* 2756GG та алеля 2756G має протекторний ефект і зменшує ризик самовільного абортu.

3. Віддиференціювавши спадкову складову у невиношуванні вагітності від можливої дії зовнішніх чинників, яких можна уникнути, можна розробляти різні підходи для профілактики певної частки репродуктивних втрат.

ЛІТЕРАТУРА

1. Богатирьова Р. В. Генетика репродуктивних втрат / Р. В. Богатирьова, О. Я. Гречаніна. – К., 2003. – 206 с.
2. Клінічний протокол з акушерської допомоги

«Невиношування вагітності» // Здоров'я України. – 2009. – № 4/1. – С. 29–32.

3. An analysis of the pattern of pregnancy loss in women with recurrent miscarriage / T. C. Li, T. Iqbal, B. Anstie [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2002. – № 78. – P. 1100–1106.

4. Association between endometriosis and polymorphisms in insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-I receptor genes in Korean women / H. Kim, J. H. Park, S. Y. Ku [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2011. – Vol. 156, № 1. – P. 87–90.

5. Choi Y. K. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review / Y. K. Choi, J. Kwak-Kim // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – Vol. 60, № 2. – P. 101–110.

6. Effects of inherited thrombophilia in women with recurrent pregnancy loss / Z. Habibovic, B. Zeybek, C. Sanhal [et al.] // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2011. – Vol. 38, № 4. – P. 347–350.

7. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes / S. Ostojic, N. Perez, M. Volk [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – № 60. – P. 111–117.