

УДК 618.25:575.174.015.3

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПРИ МНОГОПЛОДИИ С ПОМОЩЬЮ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ**<sup>1</sup>Никитина И. Н. (*nikitina-med@mail.ru*), <sup>2</sup>Бойчук А. В. (*boychuk-alla@rambler.ru*)<sup>1</sup>Сумский государственный университет, Сумы, Украина<sup>2</sup>ГБУЗ «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 рестриктурирующей 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 реструктурирующей 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  $\chi^2$ . 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 показатель 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 reprodukci / 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

<sup>1</sup>Nikitina I. N., <sup>2</sup>Boychuk A. V.

<sup>1</sup>Educational Establishment "Sumy State University", Sumy, Ukraine

<sup>2</sup>State 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