

АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК 618.39:575.174.015.3:616.151.511

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ В УЗБЕКИСТАНЕ

Капралова Ю.А.¹, Абдурахимов А.А.^{1,2}, Миракбарова З.М.^{1,2}, Назирова М.Б.², Нишанова С.Ш.², Эсонова Г.У.¹, Абдунабиев А.М.¹, Мейликов Х.Ю.², Рахматуллаев А.И.¹, Нишанова Ф.П.³, Абдуллаев А.А.¹, Далимова Д.А.¹

¹ Центр передовых технологий,

² Институт биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана,

³ Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр Акушерства и Гинекологии МЗ РУз

XULOSA

Maqsad - takroriy homilador yo'qotish (THY) va MTHFR-rs1801133, MTHFR-rs1801131, MTR rs1805087, MTRR rs1801394 polimorfizmlari o'rtasidagi bog'liqlikni o'rganish edi.

Tadqiqot usullari. THY bilan kasallangan 96 bemor va 210 nafar nazorat guruhining DNKsi Global Screening Array texnologiyasi (Illumina, AQSh) yordamida genotiplangan.

Natijalar shuni ko'rsatdiki, MTR genining rs1805087 takroriy abort qilish xavfi bilan sezilarli darajada bog'liq ($p=0,002$). Boshqa polimorfizmlar uchun muhim assotsiatsiya kuzatilmadi.

Xulosa. MTR genining rs1805087 polimorfizmining GG genotipi O'zbekistonda THY bilan bog'langan. THY bilan og'rigan bemorlar va nazorat guruhi o'rtasida MTHFR va MTRR gen polimorfizmlarida sezilarli farqlar yo'q edi.

Kalit so'zlar: polimorfizm, folat sikli genlari, folatlar, MTHFR, MTR, MTRR, takroriy abort, takroriy homiladorlikni yo'qotish.

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – репродуктивное расстройство, определяемое как две или более последовательные и спонтанные потери беременности (до 20 недель беременности), которым страдают примерно 1-2% пар [4]. В настоящее время причины ПНБ в значительном числе случаев остаются неизвестными, что приводит к осложнениям в лечении и высокому уровню стресса в парах. Потеря беременности в первом триместре затрагивает до 15% клинически диагностированных беременностей. В то время как у большинства пар последующие беременности проходят успешно, 2-4% страдают от повторяющихся потерь, часто без определенной причины [7]. В клинической практике,

SUMMARY

Objective. The objective was to investigate the association between recurrent pregnancy loss (RPL) and MTHFR-rs1801133, MTHFR-rs1801131, MTR rs1805087, MTRR rs1801394 polymorphisms.

Methods. DNA from 96 patients with RPL and 210 controls were genotyped by Global Screening Array technology (Illumina, USA).

Results. The results indicated that the rs1805087 of MTR gene was significantly associated with a risk of recurrent miscarriage ($p=0,002$). No significant association was observed for the other polymorphisms.

Conclusions. The GG genotype of rs1805087 polymorphism of MTR gene is associated with RPL in Uzbekistan. There were no significant differences in MTHFR and MTRR gene polymorphisms between patients with RPL and the control group.

Keywords: polymorphism, folate cycle genes, folates, MTHFR, MTR, MTRR, recurrent miscarriage, recurrent pregnancy loss.

до 40-50% пациенток, страдающих привычным невынашиванием беременности, не имеют идентифицируемой причины потери беременности. Определение, диагностическое обследование и соответствующие вмешательства среди пациентов с ПНБ до сих пор являются актуальными вопросами современного акушерства. ПНБ является высокогетерогенным заболеванием. Изучаются множество генетических aberrаций, которые могут влиять на развитие и прогресс невынашивания беременности, изменяя важные биологические пути. В последние годы исследования факторов, влияющих на ПНБ, сосредоточены на нарушении метаболизма фолата и метионина, особенно на

полиморфизмах генов ключевых ферментов этого цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), метионинсинтазы (MTR) и метионинсинтазоредуктазы (MTRR) [5].

Фолиевая кислота необходима для многих биологических реакций, включая синтез ДНК, рост клеток и их деление, особенно при развитии плода во время беременности. Из-за снижения уровня фолиевой кислоты синтез ДНК и белков у плода может уменьшиться, что может привести к самопроизвольному аборту [9].

Неполная конверсия 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат и дисфункция реметилирования гомоцистеина могут приводить к гипергомоцистеинемии [10]. Кроме того, было показано, что повышенные уровни гомоцистеина вызывают повреждение сосудистых эндотелиальных клеток, нарушение свертываемости крови и фибринолитической системы, а также аномальный липидный обмен. Все эти факторы, наряду с токсичностью гомоцистеина для плаценты и другими механизмами, способствуют возникновению спонтанного аборта [3].

Наиболее изучены полиморфизмы rs180133 и rs180131 гена MTHFR. Но результаты многих исследований неоднозначны. В некоторых популяциях показано, что эти полиморфизмы способствуют риску ПНБ (Al-Achkar W. et al., 2017; Khan R et al., 2019), в то время как другие сообщили, что не было значимой связи между вариантами MTHFR и ПНБ (Hwang K. et al., 2017; Dell'Edera D. et al., 2018).

Метионинсинтаза (MTR) ответственна за реметилирование гомоцистеина в метионин, а метилкобаламин является промежуточным переносчиком метильной группы. Метионинсинтаза-редуктаза (MTRR) – фермент, отвечающий за присоединение метильной группы к кобаламину [4]. Немногие исследования изучали взаимосвязь между полиморфизмами генов MTR и MTRR и привычным выкидышем [11].

Таким образом, целью нашего исследования является анализ частот встречаемости rs1801133 и rs1801131 полиморфизмов гена MTHFR, rs1805087 полиморфизма гена MTR, rs1801394 полиморфизма гена MTRR и оценка их ассоциации с привычным невынашиванием беременности в Узбекистане.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие женщины, проживающие на территории Узбекистана, со схожими условиями образа жизни. В основную группу вошли 96 женщин в возрасте от 20 до 47 лет (средний возраст 29,1±6,1 года) с привычными выкидышами, обследованных в РСНПМЦ Акушерства и Гинекологии Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, у которых было выявлено два или более последовательных выкидыша неизвестной этиологии. Критериями исключения являлись наличие тяжелых сопутствующих соматических заболеваний, хронических инфекций урогенитального тракта, аномалии развития внутренних поло-

вых органов. Были изучены 276 случаев потерей беременности. Контрольную группу составили 210 неродственных здоровых женщин без репродуктивных потерь (18–45 лет, средний возраст 31,1±6,34 лет), имеющие одного и более ребенка. На каждую пациентку была составлена индивидуальная анкета. Изучаемые параметры отражали этническую принадлежность, паспортные, антропометрические данные, сведения об образовании и работе, наличие профессиональных вредностей, акушерский анамнез, перенесенные и наследственные заболевания, сведения о месте рождения (проживания) исследуемой и ее родственников в 3х поколениях.

У всех участников было получено письменное информированное согласие.

ДНК всех участниц исследования были прогенотипированы на следующие полиморфизмы: rs1801133 и rs1801131 гена MTHFR; rs1801394 гена MTRR; rs1805087 гена MTR.

Выделение ДНК. У всех отобранных женщин была собрана периферическая кровь (5 мл). Геномную ДНК выделяли из образцов крови с использованием метода фенолхлороформной экстракции на основе стандартизированного протокола. Чистота и качество выделенной ДНК определялись с помощью NanoPhotometer NP80 (Implen, USA), а точная концентрация определялась с помощью высокочувствительного анализа Qubit dsDNA (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) на флуориметре Qubit 4.0. Средние нормализованные концентрации ДНК составляли 30–60 нг/мкл.

Генотипирование с помощью анализа Infinium HTS. Образцы генотипировались в соответствии с протоколом производителя с использованием Infinium Global Screening Array-24 v3.0 (Illumina, USA).

Из каждого образца брали 200 нг ДНК и амплифицировали в планшете MSA3 при 37 °C в течение 22 часов с использованием набора для анализа Infinium HD Assay Kit WGS-Pre1 HV1 (Illumina, USA). Продукты амплификации разделяли на фрагменты с использованием FMS (Illumina, USA) и очищали с использованием набора для анализа Infinium Assay Kit Single Post 3 HV. На следующем этапе очищенные и фрагментированные образцы ДНК гибридизовали с BeadChips (в течение 20 часов при температуре 48 °C) в гибридизационной печи (VWR International, USA). После гибридизации BeadChips промывали и окрашивали на TE-FLOW Rack Chamber 48 pos (VWR International, USA) с использованием набора для анализа Infinium LCG Assay Kit Post1 MV1. На следующем этапе окрашенные BeadChips подвергались сушке. В дальнейшем высушенные Beadchips сканировали на iScan (Illumina, USA).

Анализ данных. Для проведения предварительного биоинформатического анализа необработанных данных (.idat), полученных при сканировании BeadChips использовалось программное обеспечение Genome Studio v2.0.5 (Illumina, USA). Для по-

иска файлов .dmap каждого BeadChip был применен Decode File Client v3.0.3 (Illumina, USA).

Сравнительный анализ частот и генотипов проводили с использованием метода χ^2 . Для этого использовалась общая модель наследования (тест χ^2 , $df=2$), мультипликативная модель (тест χ^2 , $df=1$), аддитивная модель (тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов χ^2 , $df=1$), доминантная и рецессивная модели тест (χ^2 , $df=1$), позволяющие выявить ассоциацию аллелей с заболеванием. Для описания относительного риска развития заболевания рассчитывали отношение шансов (OR). Для проверки распределения генотипов применяли закон Харди-Вайнберга

(HW). Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие клинические характеристики участников исследования представлены в таблице 1. Группа контроля была старше основной группы, но разница не была статистически значимой ($p=0,82$). Индекс массы тела (ИМТ) у женщин в группе ПНБ был сравним с ИМТ у женщин в контрольной группе (ИМТ, $p=0,81$). Статистически значимой разницы между двумя группами по курению выявлено не было ($p=0,78$), но потребление алкоголя ($p=0,002$) было достоверно выше в контрольной группе.

Таблица 1

Клиническая характеристика исследуемых групп

Параметр	Основная группа n=96	Контрольная группа n=210	p
Возраст	29,1±6,1	31,1±6,34	0,82
Индекс массы тела (кг/м ²)	25,19±5,3	23,5±5,1	0,81
Курение	1 (1,04%)	3 (1,42%)	0,78
Употребление алкоголя	6 (6,25%)	39 (18,5%)	0,002

Для успешной беременности важны такие факторы, как материнский иммунитет, физиологическое здоровье матери, сосудистая сеть плода и гомеостаз [8]. Физиологические изменения, а также недостаточное потребление витаминов и фолиевой кислоты могут влиять на активность основных ферментов, участвующих в единственном пути метаболизма фо-

лата [1]. Следовательно, полиморфизмы генов, кодирующих ферменты фолатного цикла, являются важными биомаркерами для оценки риска ПНБ.

Результаты анализа частот аллелей и генотипов полиморфизмов изучаемых генов у женщин с ПНБ и в контрольной группе представлены в таблице 2.

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов полиморфизмов генов MTHFR, MTRR и MTR у обследованных женщин

Ген (полиморфизм)	Генотип (аллель)	Основная группа n(%)	Контрольная группа n(%)	p
MTHFR (rs1801133)	CC	9 (9)	17 (8)	0,73
	CT	40 (42)	80 (38)	
	TT	47 (49)	113 (54)	
	C	58 (30)	114 (27)	
	T	134 (70)	306 (73)	
MTHFR (rs1801131)	AA	49 (51)	94 (45)	0,37
	AC	33 (34)	90 (43)	
	CC	14 (15)	26 (12)	
	A	131 (68,2)	278 (66,2)	
	C	61 (31,8)	124 (33,8)	
MTRR (rs1801394)	AA	30 (31)	59 (28)	0,54
	AG	41 (43)	104 (49,5)	
	GG	25 (26)	47 (22,5)	
	A	101 (52,6)	222 (52,9)	
	G	91 (47,4)	198 (47,1)	
MTR (rs1805087)	AA	56 (58,3)	125 (59,5)	0,007*
	AG	29 (30,2)	79 (37,6)	
	GG	11 (11,5)	6 (2,9)	
	A	141(73,4)	329 (78,3)	
	G	51 (26,6)	91 (21,7)	

Примечание: * – различия статистически значимы.

Частота генотипа СС полиморфизма rs1801133 гена MTHFR среди случаев и контроля составляла 9% и 8% соответственно. В целом распределение остальных генотипов rs1801133 полиморфизма гена MTHFR существенно не различалось среди пациентов с ПНБ и контрольной группой ($p=0,73$).

Частота генотипа СС rs1801131 полиморфизма гена MTHFR составила 15% и 12% среди женщин с ПНБ и женщин из группы сравнения. Эта разница также не была значимой ($p=0,37$). Другие варианты генотипов были сравнимы друг с другом.

Распределение генотипов полиморфизма rs1801394 гена MTRR было таковым: в группе больных АА – 31%, АG – 43%, GG – 26%, а в контрольной группе: АА – 28%, АG – 49,5%, GG –

22,5% ($p=0,54$). Частота аллеля А составила – 52,6% в группе больных и 52,9% в группе контроля, а аллеля G 47,4% и 47,1% соответственно ($p=0,95$).

Частотный анализ rs1805087 полиморфизма гена MTR проводился для каждого генотипа в обеих группах. В группе ПНБ наблюдались генотипы АА (58,3%), АG (30,2%) и GG (11,5%), тогда как в контрольной группе распределение генотипов было следующим: АА (59,5%), АG (37,6%), и GG (2,9%) соответственно. По рецессивной модели наследования было выявлено значительное различие по частоте встречаемости генотипа GG rs1805087 полиморфизма гена MTR, который достоверно чаще ($OR = 4,4$; CI 95%:1,58-12,28; $p = 0,002$) встречался в группе женщин с ПНБ (табл.3).

Таблица 3

Частота аллелей и генотипов rs1805087 полиморфизма гена MTR у обследованных женщин

Генотип	Основная группа n=96(%)	Контрольная группа n=210(%)	χ^2	p	OR, 95%CI
Общая модель					
АА	56 (58,3)	125 (59,5)	0,007*	9,81	0,95 (0,58-1,55)
АG	29 (30,2)	79 (37,6)			
GG	11 (11,5)	6(2,9)			
Рецессивная модель					
АА+АG	85 (88,5)	204 (97,1)	0,002*	9,29	0,23 (0,08-0,63)
GG	11 (11,5)	6(2,9)			
Мультипликативная модель					
Частота аллеля А	0,74	0,79	0,18	1,77	0,76 (0,51-1,14)
Частота аллеля G	0,26	0,21			
Равновесие HW	0,16	0,22			

Примечание: * – различия статистически значимы.

Сведения о роли полиморфизмов гена MTHFR весьма неоднородны и противоречивы. В ряде исследований приводятся свидетельства ассоциаций этих полиморфизмов с осложнениями беременности, в том числе и ПНБ. Так, в исследовании проведенном в сирийской популяции, выявлена достоверная ассоциация с носительством генотипа ТТ и аллеля Т полиморфизма rs1801133 гена MTHFR и ПНБ ($p=0,000003$ и $p=0,000019$ соответственно), и генотип СС и аллель С полиморфизма rs1801131 гена MTHFR также выявлялись с большей частотой в группе женщин с ПНБ ($p=0,014$ и $p=0,064$ соответственно) [2]. В исследовании, проведенном на вьетнамской популяции ($n=90$) было показано, что комбинация генотипов rs1801133 и rs1801131 гена MTHFR приводила к увеличению риска ПНБ в 9,0 раз ($OR 9,0$; CI 95%:2,25–35,99; $p=0,001$) [5]. В популяции женщин Южной Индии была выявлена ассоциация только с носительством генотипа ТТ и аллеля Т rs1801133 полиморфизма гена ($p=0,01$ и $p=0,001$ соответственно), но не с rs1801131 полиморфизмом [15]. В Китае у женщин из провинции Аньхой с привычным выкидышем, ($n=201$) не подтверждена ассоциация с rs1801131 полиморфизмом гена MTHFR. Частота аллеля Т составляла 48,26% в группе ПНБ, что немного выше по

сравнению с контрольной группой (45,55%), но эта разница не была статистически значимой ($p=0,441$) [10]. А в исследовании Zhang (2020), проведенном также в Китае, но на других субпопуляциях ($n=237$) была обнаружена весомая разница в распределении аллелей rs1801133 и rs1801131 гена MTHFR. Частота аллеля Т полиморфизма rs1801133 в контрольной группе была значительно выше, чем в группе ПНБ (28,16% против 22,57%), ($p=0,02$). Частота аллеля С rs1801131 полиморфизма гена MTHFR в здоровой группе (21,6%) была значительно ниже, чем в группе ПНБ (27,6%) ($p=0,008$) [16].

Кроме того, были изучены rs1801394 полиморфизм гена MTRR и rs1805087 полиморфизм гена MTR для оценки их влияния на привычный выкидыш. Мутации в этих генах также приводят к повышению уровня гомоцистеина в плазме, что, в свою очередь, может вызвать потерю плода или его аномалии [6, 11]. Существует ряд исследований, которые демонстрируют сильную корреляцию между MTRR и выкидышем [12, 13]. В нашем исследовании частота аллелей и генотипов rs1801394 полиморфизма гена MTRR в изучаемых группах значимо не различались. Однако в других популяциях связь подтвердилась, так уже в вышеупомянутом исследовании Zhang (2020) носи-

тельство аллеля G повышало риск невынашивания беременности в 1,38 раз ($p=0,006$) [16]. В небольшом исследовании среди женщин Египта было выявлено что аллель G rs1801394 полиморфизма гена MTRR увеличивает риск ПНБ (G/A OR 26,13, CI 95%:7,0–96,8 и G/G OR 57,0 CI 95%:13,0–249,7) [12].

В нашем исследовании rs1805087 полиморфизма гена MTR выявлено преобладание генотипа GG в группе с ПНБ (11,5%) по сравнению с контрольной группой (2,9%) ($p=0,002$). Тогда как в исследовании Talwar et al., проведенном среди североиндийских женщин, не было обнаружено ассоциации, и частота генотипа GG составила 1% в группе с ПНБ и 1,55% в контрольной группе ($p=0,986$) [15]. В исследовании Третьяковой (2018) на русской популяции носительство генотипа GG не было обнаружено прямой связи между привычными выкидышами и носительством генотипа GG [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что генотип GG rs1805087 полиморфизма гена MTR является фактором риска привычного невынашивания беременности в Узбекистане.

Мы не наблюдали существенных различий в распределении генотипов rs1801133 и rs1801131 полиморфизмов гена MTHFR и rs1801394 полиморфизмом гена MTRR между пациентами с ПНБ и контрольной группой.

Благодарность. Данная работа была выполнена при поддержке грантов №№ Ф-ОТ-2021-158 от Министерства инновационного развития Узбекистана и REP-03032022_192 Фонда финансирования Всемирного банка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлович Щ. А. [и др.]. Особенности прегравидарной подготовки и профилактики репродуктивных потерь при нарушениях фолатного метаболизма // *Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения*. 2018. № 4 (22). С. 59–64.
2. Al-Achkar W. [и др.]. Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Gene Polymorphisms With Recurrent Pregnancy Loss in Syrian Women // *Reproductive Sciences*. 2017. № 9 (24). С. 1275–1279.
3. Aubard Y., Darodes N., Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy – review of our present understanding and therapeutic implications // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2000. № 2 (93). С. 157–165.
4. Bender Atik R. [и др.]. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022† // *Human Reproduction Open*. 2023. № 1 (2023). С. hoad002.
5. Cao Y. [и др.]. The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes // *Genes & Nutrition*. 2014. № 3 (9). С. 402.
6. Coppedè F. [и др.]. The MTR 2756A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome: a case-control study and a meta-analysis // *Molecular Biology Reports*. 2013. № 12 (40). С. 6913–6925.
7. Dimitriadis E. [и др.]. Recurrent pregnancy loss // *Nature Reviews. Disease Primers*. 2020. № 1 (6). С. 98.
8. Ewington L. J., Tewary S., Brosens J. J. New insights into the mechanisms underlying recurrent pregnancy loss // *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019. № 2 (45). С. 258–265.
9. Greenberg J. A. [и др.]. Folic Acid Supplementation and Pregnancy: More Than Just Neural Tube Defect Prevention // *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2011. № 2 (4). С. 52–59.
10. Khan R. Association of MTHFR C677T with Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss in Anhui Province of China // *International Journal of Human Genetics*. 2019. № 04 (19).
11. Kim J. H. [и др.]. Association of methionine synthase and thymidylate synthase genetic polymorphisms with idiopathic recurrent pregnancy loss // *Fertility and Sterility*. 2013. № 6 (99). С. 1674-1680. e3.
12. Rasha Sayed, M.D.* M. E. A. M. D. *,, Hend Tamim, M.D.* M. D. M. D. **, Bishai, M.D.* I. Thrombophilic Gene Mutation and Correlation to Recurrent Miscarriage: An Egyptian Study // *The Medical Journal of Cairo University*. 2022. № 12 (90). С. 2325–2332.
13. Shi X. [и др.]. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis // *Clinical Genetics*. 2017. № 2 (91). С. 265–284.
14. Tretyakova T. B., Demchenko N. S. Association between polymorphic genes of folate metabolism and early pregnancy losses // *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2018. № 1 (12). С. 42–52.
15. Veerabathiran R. [и др.]. Association of MTHFR gene polymorphism in preeclampsia and recurrent pregnancy loss: A case-control study from South India // *Human Gene*. 2023. (37). С. 201199.
16. Zhang Y. [и др.]. Variants c.677 C>T, c.1298A>C in MTHFR, and c.66A>G in MTRR Affect the Occurrence of Recurrent Pregnancy Loss in Chinese Women // *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2020. № 11 (24). С. 717–722.