

Изучение роли полиморфизма генов свёртывающей системы в возникновении преждевременных родов у женщин узбекской популяции

Любчик Н.И.¹, Бобоев К.Т.²

¹ — Республиканский специализированный научно-практический медицинский Центр акушерства и гинекологии

Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, 100124, г.Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 132а. E-mail: lyubchich@mail.ru

² — Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, 100059, г.Ташкент, ул. Усмана Насыра, 138

Проведён анализ частоты встречаемости мутантного аллеля «1691A» гена *FVLeiden* и C677T гена *MTHFR* среди женщин узбекской популяции с преждевременными родами (ПР). Носительниц мутантного аллеля «1691A» в гетеро- либо гомозиготном состоянии среди женщин с ПР оказалось 8,5%, в контрольной группе — 2,0% (OR = 4,64; 95%CI 0,98—22,02). Различия в частоте встречаемости гетерозиготного варианта полиморфизма C677T гена *MTHFR* в группе женщин с ПР и у пациенток контрольной группы статистически не достоверны. Частота носительства гомозиготного генотипа в группе с ПР была выше, чем в контрольной группе (7,5% и 1,96% соответственно), что свидетельствует о вовлечённости данного маркера в развитие ПР.

Ключевые слова: преждевременные роды, тромбофилия, полиморфизм генов, беременные

Введение

Сегодня ПР и репродуктивное здоровье женщины рассматриваются как важная общемедицинская и социальная проблема, к которой приковано внимание специалистов ведущих научных центров мира [1, 2, 3]. На основании многочисленных исследований установлен целый ряд факторов, повышающих риск ПР у женщин. Среди них особая роль отводится врождённой тромбофилии — нарушению гемостаза, приводящему к тромбообразованию в маточно-плацентарном русле [6, 8, 9].

Важным направлением в исследовании тромбофилии считается изучение тромбофилических состояний у беременных женщин, анализ влияния нарушений системы гемостаза на риск развития тромбозов и тромбоэмболий во время беременности и родов, а также определение степени участия тех или иных генетических маркеров тромбофилии в развитии акушерских и гинекологических осложнений [9, 10, 12]. Внезапность и скоротечность развития тромбоза в сосудах плаценты являются, пожалуй, основными причинами, не позволяющими в большинстве случаев своевременно предотвращать тяжёлые последствия тромбофилических осложнений у беременных женщин. На сегодняшний день определён достаточно широкий спектр генетических маркеров тромбофилии, среди которых доминирующими считаются гены системы гемостаза и обмена гомоцистеина, а именно полиморфизмы G1691A в гене *FV* свёртывания крови и C677T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) [3, 5, 7].

Принимая во внимание приоритетность генетических факторов в генезе тромбофилического состояния

у женщин, целью нашей работы стало изучение частоты встречаемости генных полиморфизмов *FV* (G1691A-Лейден) и *MTHFR* (C677T) у женщин с имеющимися и отсутствующими акушерскими осложнениями, а также оценка их вклада в генез ПР.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели нами исследована ДНК 208 женщин, из них 121 с преждевременными родами в анамнезе и 114 соматически здоровых женщин с физиологическим течением беременности (контрольная группа), в возрасте от 21 года до 35 лет.

Для постановки клинического диагноза применяли общеклинические, гемостазиологические и функциональные методы.

Выделение молекулы ДНК проводили по стандартной методике [13] с некоторыми модификациями. Амплификацию полиморфного локуса осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции на программируемом термоциклере фирмы «Applied Biosystems» (США).

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ OpenEpi 2009, Version 2.3.

Частоту вариантов аллелей и генотипов (f) вычисляли по формулам:

$$f = n/2N \text{ и } f = n/N, \quad (1)$$

где:

n — встречаемость варианта (аллеля или генотипа);

N — объем выборки.

Степень ассоциаций оценивали в значениях показателей соотношения шансов odds ratio, OR, по формуле:

$$OR = (a \times d) / (b \times c), \quad (2)$$

где:

a — частота аллеля (генотипа) в выборке больных;
b — частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке;
c — сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных;
d — сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке [11].

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка значимости G1691A полиморфизма гена FV в развитии ПР

Наиболее значимым и часто встречающимся наследственным дефектом, приводящим к тромбофилии, является лейденская мутация (G1691A) гена FV [3, 5]. Такая однонуклеотидная вариация гена приводит к устойчивости активированной формы фактора V к расщепляющему действию активированного белка C (резистентность к активированному протеину C) и к относительной гиперкоагуляции, что существенно повышает риск образования микротромбов в сосудах маточно-плацентарного комплекса у беременных, которые лежат в основе патогенеза развития ряд акушерских осложнений, в том числе и ПР.

При сравнительном анализе частот аллелей полиморфизма G1691A гена FV у женщин основной и контрольной групп были выявлены статистически значимые различия. Частоты встречаемости аллелей G и A гена FV

составили 0,96 (96,0%) и 0,04 (4,0%) в группе больных и 0,99 (99,0%) и 0,01 (1,0%) — в контрольной группе. Таким образом, частота мутантного аллеля 1691A гена FV Leiden у пациенток с ПР достоверно превышает таковую в группе здоровых женщин ($\chi^2 = 4,31$; $p < 0,05$).

Частоты распределения G/G, G/A и A/A генотипов данного маркера в изученных группах составили 91,5, 8,5 и 0,0% в основной и 98,0, 2,0 и 0,0% — в контрольной группе. Как видно из табл. 1, все носители мутантного аллеля имеют гетерозиготный генотип. Гомозиготный по редкому аллелю генотип A/A не был выявлен ни в одной из исследуемых групп. При этом носителями 1691A в гетерозиготном состоянии в основной группе оказались 7/106 пациенток с ПР по сравнению с контрольной группой — 2/102 ($\chi^2 = 4,43$; $p = 0,02$). Полученные результаты свидетельствуют о возможной роли мутации в гене FV Leiden в развитии ПР. Однако оценка доверительных интервалов не позволяет сделать однозначных выводов (OR = 4,64; 95%CI 0,98—22,02). Возможно, это связано с небольшим объемом выборки.

Оценка значимости полиморфизма C677T гена MTHFR в развитии ПР у женщин

К настоящему времени в гене MTHFR выявлено 9 мутаций, среди которых наиболее изученной является мутация C677T. Аллель 677T гена MTHFR обуславливает термолабильность гомоцистеина и ассоциируется с повышенным его уровнем в плазме крови [7]. Повышенный уровень гомоцистеина считается одним из факторов риска развития гиперкоагуляции, которая приводит к образованию микротромбозов в плацентарных сосудах, нарушая трофику и кровообращение в системе мать

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма G1691A гена FV среди женщин с ПР и пациенток контрольной группы

Таблица 1

Группа	n	Частота аллелей		Частота распределения генотипов					
		G	A*	GG		GA**		AA	
		%	%	n	%	n	%	n	%
Основная	106	96,0	4,0	97	91,5	9	8,5	0	0
Контрольная	102	99,0	1,0	100	98,0	2	2,0	0	0
Примечание. * — $\chi^2 = 4,31$; $p < 0,05$; ** — $\chi^2 = 4,43$; $p = 0,02$; OR = 4,64; 95%CI 0,98-22,02									

Частота аллелей и генотипов полиморфизма C677T гена MTHFR среди женщин с ПР и пациенток контрольной группы

Таблица 2

Группа	n	Частота аллелей		Частота распределения генотипов					
		677 C	677 T	CC		CT*		TT**	
		%	%	n	%	n	%	n	%
Общая	106	72,2	27,8	55	51,9	43	40,6	8	7,5
Контрольная	102	80,4	19,6	64	62,7	36	35,3	2	1,96
Примечание. * — $\chi^2 = 1,28$; $p = 0,13$; OR = 1,39; 95%CI 0,79-2,46; ** — $\chi^2 = 3,55$; $p = 0,03$; OR = 4,08; 95%CI 0,85-19,7									

— плацента — плод, что может стать причиной плацентарной недостаточности, и следовательно, прерывания беременности в различных сроках. У носителей варианта 677T во время беременности часто наблюдается дефицит фолиевой кислоты, что также может привести к дефектам развития плода.

В нашей выборке частота мутантного аллеля гена *MTHFR* (677T) оказалась высокой как среди женщин с ПР, так и среди здоровых женщин (табл. 2). У 51 из 106 обследованных было обнаружено носительство гетеро- или гомозиготных вариантов мутации С677Т гена *MTHFR* (48,1%). Из них 40,6% (43/106) имели гетерозиготный, 7,5% (8/106) — гомозиготный генотип. В контрольной группе из 102 обследованных женщин данная мутация выявлена у 38 (37,3%), при этом у 2 пациенток (1,96%) в генотипе был обнаружен гомозиготный вариант данного маркера.

Распространённость мутации *MTHFR* С677Т в различных этнических группах значительно варьирует — от 4 до 65% [11, 15]. Частота гомозигот колеблется от 0 до 47%. Например, частота гомозигот в европейской популяции в среднем составляет 10—12%, гетерозигот — 40%. Среди азиатских популяций известны следующие данные: так, в Японии гомозиготы составили 13,1%, гетерозиготы — 47,5%, в Китае — соответственно 14,0 и 43,8%, среди корейцев — 7,3 и 66,1%.

К настоящему времени опубликован ряд работ, посвящённых поиску ассоциаций аллельных вариантов гена *MTHFR* с ПР. Так, по данным R.L. Vick с соавторами (1998), имеется чёткая связь между гетерозиготной мутацией *MTHFR* и ПР, риск развития которых возрастает в 2 раза, В. Brenner с соавторами [6, 7] наблюдали эту мутацию у 46% женщин с ПР. W.H. Kutteh [3, 8], однако, не обнаружил связи между мутацией *MTHFR* С677Т и привычным невынашиванием. Более поздние исследования S.C. Guba с соавторами (1999), V. Kakkar с соавторами [13] продемонстрировали явную связь между гетерозиготной формой мутации и привычным невынашиванием, риск при этом повышается в 2 раза.

Распределение аллелей 677С и 677Т среди пациенток основной и контрольной групп соответствовало значениям 72,2, 27,8% и 80,4, 19,6%.

Также выявлено некоторое повышение частоты гетерозиготного генотипа С677Т гена *MTHFR* у женщин с ПР (40,6%) по сравнению с контрольной группой (35,3%). Согласно коэффициенту соотношения шансов, риск развития ПР у женщин при наличии генотипа С/Т гена *MTHFR* увеличивался почти в 1,4 раза (OR = 1,39; 95%CI 0,79—2,46). Однако такое различие оказалось статистически незначимым ($\chi^2 = 1,28$; $p = 0,13$; OR = 1,39), создавая впечатление о не очень большой самостоятельной роли данного полиморфизма в развитии ПР у женщин.

Однако при анализе частот только гомозиготного Т677Т генотипа гена *MTHFR* выявлены статистически достоверные отличия, т.е. зарегистрирована прямая

корреляция между Т677Т вариантом данного полиморфизма и развитием ПР. Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов, наличие генотипа Т/Т гена *MTHFR* увеличивало риск развития ПР более чем в 4 раза ($\chi^2 = 3,55$; $p = 0,03$; OR = 4,08; 95%CI 0,85—19,7), однако эта оценка недостоверна.

Как свидетельствуют литературные данные, при гомозиготной форме мутации *MTHFR* риск раннего прерывания беременности беременности возрастает. Гомозиготная форма *MTHFR* обуславливает преждевременное поражение сосудистой стенки, что проявляется ранним развитием атеросклероза, развитием тромбозов в плацентарных сосудах [3, 6, 9, 12], приводя к непрочности плаценты и ишемизацию её ткани, которые лежат в основе угрозы ранних и поздних самопроизвольных выкидышей, угрозы ПР, что исходом могут быть, в большинстве случаев, раннее прерывание беременности.

Анализ ген-генных взаимодействий

FV (G1691A) и *MTHFR* (С677Т)

среди пациенток с ПР и условно здоровых женщин

На сегодняшний день ген-генные взаимодействия остаются наименее изученным звеном, способным связать наследственные факторы с наличием, характером и выраженностью тромбофилии при акушерских заболеваниях. Цель этого анализа — изучение ассоциативных связей между аллельными вариантами изученных нами генов и обнаружение неслучайных генотипических сочетаний.

Для поиска генотипических сочетаний, или «межгенных комбинаций» нами был проведен анализ так называемых «ген-генных взаимодействий» в общей когорте больных и здоровых женщин. Суммарная доля одновременного носительства аллелей «*FV* G1691A + *MTHFR* С677Т» в группе больных с ПР составила 6/106 (5,7%), тогда как в контрольной группе такая комбинация не наблюдалась ни в одном случае. Причем нужно отметить, что у всех пациенток с гетерозиготным носительством мутантного аллеля гена *FV* G1691A одновременно были обнаружены только гетерозиготные аллели гена *MTHFR* С677Т («двойные гетерозиготы»). В группах больных и здоровых женщин другие варианты сочетанного носительства исследованных нами генов не выявлены. Статистический анализ данных ген-генных взаимодействий показал, что при носительстве неблагоприятных генотипов «*FV* G1691A + *MTHFR* С677Т» риск возникновения ПР у пациенток более чем в 6 раз выше, чем у не носительниц данной комбинации ($\chi^2 = 5,95$; $p = 0,007$; OR = 6,12).

Таким образом, наши данные могут свидетельствовать о роли одновременного носительства аллелей наследственной тромбофилии «*FV* G1691A + *MTHFR* С677Т» как одного из ключевых факторов риска развития ПР.

Полученные нами результаты раскрывают некоторые генетические аспекты возникновения преждевременных родов у женщин и свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения полиморфизма других генов, вовлечённых в патогенез ПР. Для подтверждения выявленных тенденций необходимо исследование выборок большего объёма. Изучение вклада врождённой тромбофилии в предрасположенность к ПР окажет неоценимую помощь в создании комплексной программы по индивидуальной первичной профилактике ПР с учётом генетических характеристик. Своевременная патогенетическая обоснованная профилактическая терапия в конечном итоге позволит избежать развития возможных ранних и очень ранних преждевременных родов у беременных.

Выводы

1. Мутация гена *FV G1691A* достоверно ассоциирован с развитием гиперкоагуляционных состояний приводящих к развитию преждевременных родов у беременных женщин ($\chi^2 = 4,43$; $p = 0,02$; $OR = 4,64$; $95\%CI 0,98-22,02$), что позволяет говорить о несомненной клинической значимости этого маркера в развитии ПР.

2. Различия в частоте встречаемости гетерозиготного варианта полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* среди пациенток основной и контрольной групп были незначительными и носили статистически недостоверный характер ($\chi^2 = 1,28$; $p = 0,13$; $OR = 1,39$; $95\%CI 0,79-2,46$).

3. Частота встречаемости гомозиготного *T677T* варианта гена *MTHFR* в основной группе более чем в 4 раза превышала таковую в контрольной группе ($\chi^2 = 3,55$; $p = 0,03$; $OR = 4,08$; $95\%CI 0,85-19,7$), что может свидетельствовать о возможной ассоциации между развитием ПР с данным вариантом генетического маркера.

4. Сочетание аллелей «*FV G1691A + MTHFR C677T*» является самостоятельным фактором риска развития преждевременных родов у беременных женщин. Наличие у пациентов в генотипе комбинации данных мутантных аллелей достоверно повышает риск развития ПР более чем в 6 раз ($\chi^2 = 5,95$; $p = 0,007$; $OR = 6,12$).

Список литературы

1. Баранов В.С. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины. — СПб.: Изд-во научной лит-ры, 2009. — 527 с.
2. Блинецкая С.Л. Основные наследственные тромбофилии и их роль при привычном невынашивании беременности: Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.м.н. — М., 2009. — 21 с.
3. Канева Ф.М., Ахметова В.Г., Фролов А.Л. и др. Анализ мутаций *G20210A* гена *PRT*, *G1691A* гена *FV* и *C677T* гена *MTHFR* у женщин с невынашиванием беременности // Клин. лаб. диагностика. — 2006. — №9. — С. 45.
4. Макацария А.Д., Пшеничникова Е.Б., Пшеничкова Г.Б. и др. Метаболический синдром и тромбофилия в акушерстве и гинекологии. — М.: Мед. информ. агентство, 2006. — №1. — С. 44–46.
5. Репина М.Ф., Сумская Г.Ф., Лапина Е.М. и др. Особенности течения беременности у женщин с наследственными формами тромбофилии // Журн. акуш. и жен. бол. — 2007. — Т. LV1. — Вып. 2. — С. 3–9.
6. Решетняк Т.М. Тромбофилии, тромбозы и беременность // Проблемы гемостазиологии в акушерстве и гинекологии // Человек и лекарство: Тез. докл. 13-го Рос. нац. конгресса. — М., 2006. — С. 4–16.
7. Baglin T., Gray E., Greaves M. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia // Brit. J. Haematol. — 2010. — Vol. 149. — P. 209–220.
8. Botto N., Maffei S., Manfredi S. et al. Prothrombotic mutations, family history and the risk of thrombosis in postmenopausal women: implications for hormone replacement therapy // Climacteric. — 2011. — Vol. 13, №6. — P. 25–30.
9. Folkeringa N., Brouwer J.L., Korteweg F.J. et al. High risk of pregnancy-related venous thromboembolism in women with multiple thrombophilic defects // Brit. J. Haematol. — 2007. — Vol. 138, №1. — P. 110–116.
10. Khan S. Hereditary thrombophilia // Thromb. J. — 2006. — Vol. 4. — P. 234–236.
11. Kovac M., Mitic G., Mikovic Z. et al. Thrombophilia in Women with Pregnancy-Associated Complications: Fetal Loss and Pregnancy-Related Venous Thromboembolism // Gynec. Obstet. Invest. — 2010. — Vol. 69. — P. 233–238.
12. Kosar A., Kasapoglu B., Kalyoncu S. et al. Treatment of adverse perinatal outcome in inherited thrombophilias: a clinical study // Blood Coagulation & Fibrinolysis. — 2011. — Vol. 22. — P. 14–18.
13. Rodger M.A., Paidas M., McLintock C. et al. Inherited thrombophilia and pregnancy complications revisited // Obstet. Gynec. — 2008. — Vol. 112. — P. 320–324.

Study of the role of polymorphism of gene of haemostasis system in occurrence of preterm birth among women of Uzbek population

Lubchich N.I.¹, Boboev K.T.²

¹ — Republican specialized scientific-practice medical center of obstetrics and gynecology, Tashkent, 100124 Mirzo Ulugbek street 132a, E-mail: lyubchich@mail.ru. (8371) 263-78-31

² — Scientific-research institute of hematology and hemotransfusiology, 100059, Usman Nasir street 138, Tashkent

There has been performed analysis of the presence of mutagenic allele «1691A» gene FV Leiden and C677T gene MTGFR among the women with preterm labor. The carriers of mutant allele «1691A» in the hetero- or homozygous state among the women with preterm labors accounted for 8,5% that corresponded to 4,5 fold increase of the risk factor for development of venous thrombosis in comparison with control group (OR = 4.64; 95% CI 0.98–22.02). Differences in the frequency of prevalence of heterozygous variant of polymorphism C677T gene MTGFR between general groups of women with preterm labor and controls had statistic unreliable character. However, the carrying of the homozygous allele of this marker defined more than 4-fold increase in risk of the development of the venous thrombosis in comparison with control group (OR = 4.08: 95%CI 0,05–19,7), that indicated about participation of this marker in the development of venous thrombosis.

Key words: preterm birth, thrombophilia, gene polimorfizm, pregnant