

# Анализ полиморфизма С677Т гена *MTHFR* у женщин с преждевременными родами

Любчик Н.И.<sup>1</sup>, Бобоев К.Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Республиканский специализированный научно-практический медицинский Центр акушерства и гинекологии Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г.Ташкент

<sup>2</sup> — Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г.Ташкент

Проведен анализ частоты встречаемости мутантного аллеля полиморфизма С677Т гена *MTHFR* среди узбекских женщин с преждевременными родами (ПР). Различия в частоте встречаемости гетерозиготного варианта полиморфизма С677Т гена *MTHFR* между группами женщин с ПР и контролем носили статистически недостоверный характер. Однако носительство аллеля Т данного маркера определило более чем 4-кратное увеличение риска очень ранних и ранних ПР в сравнении с контрольной группой (OR = 2,3; 95%CI 1,22–3,32).

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

## Введение

Достижения XX века в области молекулярной медицины, биологии и медицинской генетики позволили с принципиально новых позиций оценить патогенез такого осложнения беременности, как преждевременные роды (ПР), которые остаются актуальной проблемой современного акушерства [2, 3, 5].

Сегодня ПР и репродуктивное здоровье женщины рассматриваются как важнейшая общемедицинская и социальная проблема, находящаяся под пристальным вниманием 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 врожденной тромбофилии — нарушению гемостаза, приводящему к тромбообразованию в маточно-плацентарном русле [6, 8, 9].

Важным направлением в исследовании тромбофилии считаются 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]. При тромбофилии внезапность и скоротечность развития тромбоза в сосудах плаценты становятся, пожалуй, основными причинами, не позволяющими в большинстве случаев предотвратить тяжелые последствия тромбофилических осложнений у беременных женщин. Определён достаточно широкий спектр генетических маркеров тромбофилии, доминирующими из которых считаются гены системы гемостаза и обмена фолатредуктазы (*MTHFR*) [1, 2, 3, 5, 7, 8].

*Целью работы были* изучение частоты встречаемости полиморфизмов в гене *MTHFR* (С677Т) у женщин

с имеющимися и отсутствующими акушерскими осложнениями, а также оценка их вклада в генез ПР.

## Материалы и методы

Работа выполнена на клинической базе Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра акушерства и гинекологии МЗРУз в 2009—2012 гг. Были исследованы ДНК 235 женщин, из них 121 с ПР в анамнезе и 114 соматически здоровых женщин с физиологическим течением беременности, которые составили контрольную группу. Возраст обследованных женщин от 21 года до 35 лет. Для постановки клинического диагноза применяли общеклинические, гемостазиологические и функциональные методы.

Выявление тромбофилии проводили в лаборатории молекулярно-генетических исследований НИИ гематологии и переливания крови под руководством д.м.н. К.Т. Бобоева. ДНК выделяли из периферической крови по стандартной методике [13] с некоторыми модификациями. Амплификацию полиморфных локусов проводили методом 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 формуле:

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

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

На первом этапе провели молекулярно-генетические исследования для выявления частоты тромбофилии и ее структуры у женщин с преждевременными и физиологическими родами. Тромбофилические мутации среди пациенток основной группы с ПР обнаружены у 75 чел. (62%), а среди женщин с физиологическим течением беременности — у 32,4%. Наиболее распространен у женщин с ПР в анамнезе аллель С677Т гена *MTHFR*, который выявлен у 63 чел. (84,0%), из них у 8 чел. (12,7%) — в гомозиготном, у 55 чел. (87,3%) — в гетерозиготном состоянии. Мутация фактора V Leiden обнаружена у 9 чел. (7,4%) с ПР, причем все они оказались носительницами гетерозиготного генотипа. Редкая для азиатской популяции мутация G20210A гена протромбина определена всего у 3 чел. (2,3%) с ПР, все они также имели гетерозиготный генотип. Результаты нашей работы частично совпадают с данными некоторых авторов [4, 6, 9, 10, 13]. Наиболее распространенные в европейских популяциях тромбофилические факторы — полиморфизм гена *MTHFR* (С677Т), лейденская мутация фактора V G1691A, мутация гена протромбина G20210A — с такой же частотой, как в Европе, встречались среди обследованных нами женщин.

Таким образом, высокая частота наследственной тромбофилии у наших пациенток позволила нам рассматривать её в качестве этиопатогенетического фактора развития ПР, что диктует необходимость выбора оптимальной и безопасной терапии, направленной на компенсацию генетических нарушений.

В связи с тем, что среди женщин с ПР с высокой частотой встречался аллель Т полиморфизма С677Т гена *MTHFR*, у них был осуществлен следующий этап исследования. Нас интересовало, влияет ли наличие полиморфизма С677Т гена *MTHFR* на срок наступления преждевременных родов и, если да, то насколько. С этой целью пациентки основной группы были разделены на подгруппы в зависимости от срока гестации при наступлении ПР. Так, 1-ю подгруппу составили 67 женщин с очень ранними (22–27 нед.) и ранними ПР (28–33 нед.), во 2-ю подгруппу вошли 57 женщин с ПР в сроке гестации от 34 до 37 недель.

Согласно полученным данным, полиморфизм С677Т гена *MTHFR* в основной группе был выявлен у 63 чел. (52,1%), из них 55 чел. (45,4%) имели гетерозиготный и 8 чел. (6,6%) — гомозиготный генотип.

Распределение аллелей С и Т в основной группе соответствовало 70,7 и 29,35% (табл. 2). Частота этих аллелей в контрольной группе составила соответственно

81,6 и 18,4%. Различия по частоте встречаемости аллеля Т в группах больных и контроля были статистически достоверными ( $\chi^2 = 7,66$ ;  $p = 0,003$ ; OR = 1,9; 95% CI 1,19–2,839).

У пациенток основной группы было зафиксировано достоверное снижение функционального нормального генотипа С677С в 1,3 раза по сравнению с контролем ( $\chi^2 = 6,87$ ;  $p = 0,004$ ) (табл. 2). Выявленное нами уменьшение частоты встречаемости генотипа С677С гена *MTHFR* в основной группе позволяет говорить о возможной «устойчивости» лиц с этим генотипом к развитию ПР.

У женщин с ПР частота генотипа Т677Т была в 4 раза выше, чем в контроле (6,6 против 1,7%,  $\chi^2 = 3,4$ ;  $p = 0,03$ ; OR = 4,0; 95% CI 0,82–19,08). Весьма неожиданным оказалось увеличение доли гетерозиготных носительниц мутации С677Т среди пациенток основной группы. Доля носительниц гетерозиготной мутации в группе ПР была в 1,7 раза больше, чем в контроле (43,6 против 33,3%) (OR = 1,7; 95% CI 0,98–2,83,  $\chi^2 = 3,6$ ;  $p = 0,03$ ).

При сравнении частот генотипов и аллелей между подгруппами женщин с ПР и пациентками контрольной группы также были выявлены статистически значимые различия (табл. 3, 4). Частота аллелей 677С и 677Т у пациенток 1-й подгруппы составила соответственно 68,7 и 31,3%, а в контрольной группе — 81,6 и 18,4%.

Преобладание носительниц аллеля 677Т гена *MTHFR* среди женщин с очень ранними и ранними ПР по сравнению с женщинами с нормальным течением беременности оказалось статистически значимым ( $\chi^2 = 7,6$ ;  $p = 0,003$ ; OR = 2,3; 95% CI 1,22–3,32).

Как и ожидалось, частота гомозиготного генотипа Т677Т в подгруппе пациенток с очень ранними ПР была достоверно выше (9,4%), чем в контрольной группе (1,7%). Вычисленный показатель риска развития ПР у носительниц данного генотипа оказался достоверно высоким ( $\chi^2 = 5,55$ ;  $p = 0,01$ ; OR = 5,8; 95% CI 1,134–29,61).

Похожая ситуация была обнаружена и при сравнительном анализе частоты распределения аллелей 677С и 677Т среди обследованных 2-й подгруппы и контрольной группы. Частота носительства мутантного аллеля в подгруппе женщин с ПР была статистически выше, чем в контрольной группе (27,2 против 18,4%,  $\chi^2 = 3,48$ ;  $p = 0,03$ ; OR = 1,6; 95% CI 0,97–2,81).

При проведении исследования получен достаточно неожиданный результат: распределение гомозиготного генотипа в изучаемых выборках достоверно не различалось. Отмечалось некоторое повышение частоты данного генотипа у пациенток 2-й подгруппы (3,5%) по сравнению с контрольной группой (1,7%). Однако такое различие оказалось статистически незначимым ( $\chi^2 = 0,51$ ;  $p = 0,2$ ), что, возможно, связано с низкой частотой данного варианта мутации гена *MTHFR* и с немногочисленностью выборки.

Таблица 1

**Частота аллелей и распределение генотипов полиморфизма С677Т гена *MTGFR* среди женщин с ПР и у пациенток контрольной группы**

Форма АР	n	Частота аллелей		Частота распределения генотипов					
		С	Т	СС		СТ		ТТ	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Основная группа, из них:	121	70,7	29,3	58	48,0	55	45,4	8	6,6
1) очень ранние и ранние ПР	64	68,7	31,3	30	47,0	28	43,6	6	9,4
2) ПР	57	72,8	27,2	28	49,1	27	47,4	2	3,5
Контроль	114	81,6	18,4	74	65,0	38	33,3	2	1,7

Таблица 2

**Различие аллелей и генотипов полиморфного маркера С677Т гена *MTGFR* у пациенток основной и контрольной групп**

Аллель и генотип	Частота аллелей и генотипов в группах		Статистическое различие
	Основная, n = 121	Контроль, n = 114	
Аллель С	70,7	81,6	$\chi^2 = 7,66$ ; p = 0,003; OR = 1,9; 95% CI 1,19-2,839
Аллель Т	29,3	18,4	
Генотип СС	48,0	65,0	$\chi^2 = 6,87$ ; p = 0,004
Генотип СТ	45,4	33,3	$\chi^2 = 3,6$ ; p = 0,03; OR = 1,7; 95% CI 0,98-2,83
Генотип ТТ	6,6	1,7	$\chi^2 = 3,4$ ; p = 0,03; OR = 4,0; 95% CI 0,82-19,08

Таблица 3

**Различие аллелей и генотипов полиморфного маркера С677Т гена *MTGFR* у больных 1-й подгруппы и пациенток контрольной группы**

Аллель и генотип	Частота аллелей и генотипов в группах		Статистическое различие
	Очень ранние и ранние ПР, n = 64	Контроль, n = 114	
Аллель С	68,7	81,6	$\chi^2 = 7,6$ ; P = 0,003; OR = 2,3; 95% CI 1,22-3,32
Аллель Т	31,3	18,4	
Генотип СС	47,0	65,0	$\chi^2 = 5,49$ ; P = 0,01
Генотип СТ	43,6	33,3	$\chi^2 = 1,91$ ; P = 0,08; OR = 1,5; 95% CI 0,83-2,92
Генотип ТТ	9,4	1,7	$\chi^2 = 5,55$ ; P = 0,01; OR = 5,8; 95% CI 1,134-29,61

Таблица 4

**Различие аллелей и генотипов полиморфного маркера С677Т гена *MTGFR* у больных 2-й подгруппы и пациенток контрольной группы**

Аллель и генотипы	Частота аллелей и генотипов в группах		Статистическое различие
	ПР, n = 57	Контроль, n = 114	
Аллель С	72,8	81,6	$\chi^2 = 3,48$ ; P = 0,03; OR = 1,6; 95% CI 0,97-2,81
Аллель Т	27,2	18,4	
Генотип СС	49,1	65,0	$\chi^2 = 3,9$ ; P = 0,02
Генотип СТ	47,4	33,3	$\chi^2 = 3,2$ ; P = 0,04; OR = 1,8; 95% CI 0,94-3,45
Генотип ТТ	3,5	1,7	$\chi^2 = 0,51$ ; P = 0,2; OR = 2,0; 95% CI 0,279-14,84

В заключение необходимо подчеркнуть, что различие в суммарной частоте неблагоприятных генотипов мутации С677Т гена *MTHFR* в изучаемых подгруппах оказалось статистически недостоверным (53,0% против 51,0%,  $\chi^2 = 0,06$ ;  $p = 0,4$ ).

Таким образом, результаты наших исследований позволили сделать следующие выводы: в патогенезе ПР у женщин важнейшее место принадлежит миссенс-мутации С677Т гена *MTHFR*, связанной с заменой цитозина на тимин в положении 677 (особенно гомозиготный генотип Т/Т), ведущей к снижению ферментативной активности белка с накоплением гомоцистеина в плазме. Гипергомоцистеинемия приводит к повреждению эндотелия сосудов, которое сопровождается снижением синтеза окиси азота, активацией маркеров эндотелиального повреждения с повышением воспалительных факторов и снижением противовоспалительного ИЛ-10. В результате этого процесса в организме женщин формируется скрытая тромбофилия, которая под воздействием провоцирующих факторов (беременность, контрацептивы, травма, оперативные вмешательства, курение и т.п.) приводит к развитию различных акушерских осложнений, в том числе и ПР.

#### Список литературы

1. Баранов В.С. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины. — СПб.: Изд-во научной литературы, 2009. — 527 с.
2. Блинецкая С.Л. Основные наследственные тромбофилии и их роль при привычном невынашивании беременности: Автореф. дисс. на соискание ученой 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 С677Т гена *MTHFR* у женщин с невынашиванием беременности // Клиническая диагностика. — 2006. — №9. — С. 45.
4. Макацария А.Д., Пшеничникова Е.Б., Пшеничникова 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.

## Analysis of C667T polymorphism of *MTHFR* gene in women with preterm labor

Lubchich N.I.<sup>1</sup>, Boboev K.T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — Republican specialized scientific-practice medical center of obstetrics and gynecology

<sup>2</sup> — Scientific-research institute of hematology and hemotransfusiology

An analysis of the presence of C677T mutant allele of *MTHFR* gene among the women with preterm labor was performed. The difference in the frequency of heterozygous C677T polymorphism in the *MTHFR* locus between the general groups of women with preterm labor and the controls was statistically unreliable. However, the carrier state of the homozygous mutant allele T in this locus determined increased risk of early and very early preterm labor in comparison with the control group (OR = 2.3; 95%CI 1.22–3.32). This finding indicates that this genetic marker is involved in the progression of venous thrombosis.

**Key words:** preterm birth, thrombophilia, gene polymorphism, pregnant