

УДК 618.3-06

АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У ПАЦИЕНТОК С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Канищева С.Е., Комкова Г.В., Шевцова В.В.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)

305041, Курск, ул. К. Маркса, 3, Российская Федерация

Актуальность. Наиболее распространенным осложнением гестации в наши дни является невынашивание беременности (НБ) на ранних сроках. НБ в 15% случаев сопровождается полиморфизмом генов системы свертывания крови и фолатного цикла.

Цель – провести оценку наличия однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) фолатного цикла у пациенток с привычным невынашиванием беременности.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлась венозная кровь. Выделение ДНК осуществлялось из 50 мкл цельной крови, с помощью набора РеалБест-Генетика ДНК-экспресс (Вектор-Бест). Определение однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Выборка состояла из 2 нозологических групп: женщин с отягощенным семейным анамнезом (ОСА), женщин с отягощенным акушерским анамнезом (ОАА), обратившихся в МГК (медико-генетическая консультация) г. Курска в 2023 году.

Результаты. В ходе работы анализировался однонуклеотидный полиморфизм генов MTR, MTRR, MTHFR. Выявлено, что гомозиготная полиморфная аллель гена MTRR – G/G – более распространена в группе с ОАА, гетерозиготная аллель – A/G – в группе с ОСА. Гомозигота по аномальному полиморфизму в гене MTHFR C677T чаще встречается в группе с ОАА, гетерозигота «аллели риска» – C/T – в группе с ОСА. Выявлено, что гетерозиготное состояние гена MTHFR A1298C – A/C – в нозологических группах одинаково распространено в группах с ОАА и ОСА, гомозиготная «аллель риска» – A/C – преобладает в группе с ОСА.

Заключение. Полиморфизм в структуре генов фолатного цикла определяет нарушение биохимических процессов, предрасполагающих к невынашиванию беременности. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что однонуклеотидный полиморфизм генов фолатного цикла может оказывать синергетический эффект на риск развития тромбозов, невынашивания беременности и ВПР плода.

Ключевые слова: фолатный цикл, однонуклеотидный полиморфизм, невынашивание беременности, ПЦР в реальном времени.

Комкова Галина Викторовна – к.б.н., доцент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0009-0003-2756-4164. E-MAIL: комковаgv@kursksmu.net.

Канищева Софья Евгеньевна – студентка 2 курса лечебного факультета, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0009-0004-8434-3541. E-MAIL: s.kanicsheva@yandex.ru. (автор, ответственный за переписку).

Шевцова Вера Валерьевна – к.б.н., ассистент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, КГМУ, г. Курск. ORCID ID: 0009-0004-7616-1561. E-MAIL: shevtsovavv@kursksmu.net.

ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF FOLATE CYCLE GENES IN PATIENTS WITH MISTARRIAGE OF PREGNANCY MISSIONS

KANISHCHEVA S.E., KOMKOVA G.V., SHEVTSOVA V.V.

KURSK STATE MEDICAL UNIVERSITY (KSMU)

305041, 3, K. MARX STREET, KURSK, RUSSIAN FEDERATION

RELEVANCE. THE MOST COMMON GESTATIONAL COMPLICATION NOWADAYS IS EARLY PREGNANCY FAILURE (EPF). THE DEVELOPMENT OF PREGNANCY FAILURE IN 15% OF CASES IS ACCOMPANIED BY POLYMORPHISM OF GENES OF THE BLOOD COAGULATION SYSTEM AND FOLATE CYCLE.

OBJECTIVE: THE ARTICLE PRESENTS THE RESULTS OF ASSESSING THE PRESENCE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) OF THE FOLATE CYCLE IN PATIENTS WITH RECURRENT MISCARRIAGE.

MATERIALS AND METHODS. THE MATERIAL FOR THE STUDY WAS VENOUS BLOOD. DNA WAS ISOLATED FROM 50 µL OF WHOLE BLOOD USING THE REALBEST-GENETICS DNA-EXPRESS KIT (VECTOR-BEST). DETERMINATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF THE GENES OF THE BLOOD COAGULATION SYSTEM AND THE FOLATE CYCLE WAS CARRIED OUT USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD IN REAL TIME. THE SAMPLE CONSISTED OF 2 NOSOLOGICAL GROUPS: WOMEN WITH A FAMILY HISTORY (FHA), WOMEN WITH A FAMILY HISTORY (OFA), WHO APPLIED TO THE MGK (MEDICAL GENETIC CONSULTATION) IN KURSK IN 2023.

RESULTS. DURING THE WORK, SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE MTR, MTRR, MTHFR GENES WAS ANALYZED. IT WAS REVEALED THAT THE HOMOZYGOUS POLYMORPHIC ALLELE OF THE MTRR-G/G GENE IS MORE COMMON IN THE GROUP WITH OAA, THE HETEROZYGOUS ALLELE – A/G – IN THE GROUP WITH OSA. HOMOZYGOTE FOR ABNORMAL POLYMORPHISM IN THE MTHFR C677T GENE IS MORE COMMON IN THE GROUP WITH OAA, HETEROZYGOTE “RISK ALLELE” – C/T – IN THE GROUP WITH OSA. IT WAS REVEALED THAT THE HETEROZYGOUS STATE OF THE MTHFR A1298C GENE – A/C – IN NOSOLOGICAL GROUPS IS EQUALLY COMMON IN THE GROUPS WITH OAA AND OSA, THE HOMOZYGOUS “RISK ALLELE” – A/C – PREDOMINATES IN THE GROUP WITH OSA.

CONCLUSION. POLYMORPHISM IN THE STRUCTURE OF FOLATE CYCLE GENES DETERMINES THE DISRUPTION OF BIOCHEMICAL PROCESSES THAT PREDISPOSE TO MISCARRIAGE. CONDUCTED STUDIES INDICATE THAT SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF FOLATE CYCLE GENES CAN HAVE A SYNERGISTIC EFFECT ON THE RISK OF DEVELOPING THROMBOSIS, MISCARRIAGE AND CONGENITAL BIRTH DEFECTS.

KEYWORDS: FOLATE CYCLE, SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM, MISCARRIAGE, REAL-TIME PCR.

KOMKOVA GALINA V. – CANDIDATE OF BIOLOGICAL SCIENCES, ASSOCIATE PROFESSOR OF THE DEPARTMENT OF BIOLOGY, MEDICAL GENETICS AND ECOLOGY, KSMU, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0003-2756-4164. E-MAIL: KOMKOVAGV@KURSKSMU.NET.

KANISHCHEVA SOFYA E. – 2 YEAR STUDENT OF THE FACULTY OF MEDICINE, KSMU, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0004-8434-3541. E-MAIL: S.KANICSHEVA@YANDEX.RU. (THE AUTHOR RESPONSIBLE FOR THE CORRESPONDENCE).

SHEVTSOVA VERA V. – CANDIDATE OF BIOLOGICAL SCIENCES, ASSISTANT PROFESSOR OF THE DEPARTMENT OF BIOLOGY, MEDICAL GENETICS AND ECOLOGY, KSMU, KURSK, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0004-7616-1561. E-MAIL: SHEVTSOVAVV@KURSKSMU.NET.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Согласно статистике Министерства здравоохранения Российской Федерации, эмбриональные потери вследствие невынашивания беременности (НБ) отражают состояние репродуктивного здоровья населения. Частота самопроизвольного прерывания гестации варьируется от 15% до 20% всех беременностей [2, 4]. В настоящее время у пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) активно проводится исследование однонуклеотидного полиморфизма генов системы свертывания крови. Полиморфизм данных генов влияет на функцию ферментов и белков, участвующих в процессе свертывания крови. Полиморфизм генов, кодирующих ферменты фолатного цикла, приводит к нарушению усвоения фолатов и к развитию фолатной недостаточности. Нарушение метаболизма фолатов оказывает воздействие на увеличение ошибок хромосомной сегрегации и способствует аномальной генной экспрессии. Данные процессы увеличивают рост гомоцистеина в плазме крови и приводят к гипергомоцистеинемии (ГГЦ), что увеличивает риск осложненного хода беременности [5]. Увеличение активности фермента может быть причиной развития гиперкоагуляции – повышенной свертываемости крови – тромбы могут образовываться в плаценте, нарушая кровоснабжение плода и приводя к выкидышу. В свою очередь, снижение активности фермента оказывает воздействие на развитие гипокоагуляции – сниженной свертываемости крови – что увеличивает риск возникновения кровотечения во время беременности и является опасным для матери и плода [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе медико-генетической консультации города Курска. Материалом для исследования являлась венозная кровь. Выделение ДНК осуществлялось из 50 мкл цельной крови, с помощью набора РеалБест-Генетика ДНК-экспресс (Вектор-Бест). Определение однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного

цикла осуществлялась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с детекцией кривых плавления с помощью набора РеалБест-Генетика Гемостаз.

Принцип метода основан на амплификации выделенного участка ДНК человека и последующей детекцией кривых плавления продуктов ПЦР и специфических зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК – матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК – матрицы, синтез комплементарной цепи этих праймеров Taq-полимеразой [1, 6]. Последующий этап является сравнение положительного контроля со специфическим геном и выявление результата на монитор в виде двух кривых. Для анализа каждого образца используется 4 стрипированные пробирки с ГРС 1, 2, 3, 4, в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК и детекция кривых плавления трёх генетических полиморфизмов (таб. 1).

Таблица 1. Анализ полиморфизма генов в соответствии с ГРС

Пробирка	Анализ полиморфизма в генах
ГРС1	MTR, MTRR, MTHFR
ГРС2	ITGB3, FGB, PAI-1
ГРС3	F5, MTHFR, F7
ГРС4	ITGA2, F2, F13

Далее выбираются каналы детекции «FAM», «HEX» и «ROX» кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидных полиморфизмов. Программируется положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору и запускается программа, позволяющая провести реакцию амплификации с

дальнейшей регистрацией флуоресцентных сигналов кривых плавления [8]. Говоря об учете результатов, для КО1 в каждой ГРС 1-4 во всех каналах детекции «FAM», «HEX» и «ROX» программа фиксирует наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяет значение температуры плавления. КО1 должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота» по всем 12 полиморфизмам. Для КО2 в каждой ГРС 1-4 во всех каналах детекции «FAM», «HEX» и «ROX» программа фиксирует наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяет значение температуры плавления. КО2 должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота» по всем 12 полиморфизмам. Во время анализа результатов определения полиморфизмов в генах системы свертывания крови и фолатного цикла человека для каждого исследуемого образца в ГРС 1-4 во всех каналах детекции «FAM», «HEX» и «ROX» фиксируется один (если гомозиготное носительство) или два (если гетерозиготное носительство) пика плавления и определяются их температуры [3, 7]. Затем определяется генотип по каждому из 12 полиморфизмов в соответствии с полученными температурами пиков плавления для КО1 и КО2. Соответствие результатов анализа однонуклеотидного полиморфизма представлено в таблице 2.

Далее проводился анализ заключений ПЦР-тестирования и статистическая обра-

-ботка полученных данных – процентного соотношения, сравнение групп по Т-критерию Стьюдента.

В ходе исследования были проанализированы результаты ПЦР-тестирования 70 женщин с привычным невынашиванием, средний возраст которых составил 32±10,5 года, обратившихся в МГК г. Курска за 2023 год.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выборка была разделена на 2 нозологические группы. Первая – включала в себя женщин с отягощенным семейным анамнезом (ОСА), которая составляла 47% от всех исследуемых. В данную группу вошли пациентки, в семье которых прослеживались патологии сердечно-сосудистой системы (такие как, тромбофилия, подострый тромбоз глубоких вен, ишемический инсульт), эндокринной системы (например, сахарный диабет) и пациентки с наследственными генетическими заболеваниями. Вторую группу составили женщины с отягощенным акушерским анамнезом (ОАА). Процентное распределение нозологической группы – 53% от всех исследуемых. В группу с ОАА вошли пациентки, в анамнезе которых присутствовали самопроизвольное прерывание гестации, первичное и вторичное бесплодие, врожденные пороки развития (ВПР) плода.

Оценка фолатного цикла включала оценку однонуклеотидного полиморфизма по

Таблица 2. Результаты анализа ОНП

Пробирка	КАНАЛ ДЕТЕКЦИИ					
	«FAM»		«HEX»		«ROX»	
	Ген	Полимо- рфизм	Ген	Полимо- рфизм	Ген	Полимо- рфизм
ГРС1	MTR	2756 A/G	MTHFR	1298 A/C	MTRR	66 A/G
ГРС2	FGB	-455 G/A	ITGB3	1565 T/C	PAI-1	-675 5G/4G
ГРС3	F5	1691 G/A	MTHFR	677 C/T	F7	10976 G/A
ГРС4	ITGA2	807 C/T	F2	20210 G/A	F13	103 G/T

каждому из 4 генов фолатного цикла. В ходе анализа у каждого из них были выделены 3 аллели – «нейтральная гомозигота», «гетерозиготная аллель риска» и «гомозиготная аллель риска». Как было выявлено, «нейтральная аллель» каждого гена не вызывает изменения активности фермента и не оказывает патологического воздействия на организм. При гетерозиготном носительстве «аллели риска», в большинстве случаев, наблюдается незначительное снижение активности фермента. В свою очередь, гомозиготная «аллель риска» оказывает значительное влияние на функциональную активность, кодирующего данным геном, фермента.

Первым был проанализирован ген MTRR A66G, кодирующий фермент метионин-синтаза-редуктаза, который участвует в биохимических реакциях, связанных с переносом метильной группы, обеспечивающих превращение гомоцистеина в метионин. Кофактором фермента является кобаламин (предшественник витамина B12). Полиморфизм в гомозиготном состоянии проявляется в виде снижения активности фермента в 4 раза по сравнению с нормой. Данный процесс приводит к повышению уровня гомоцистеина и увеличению риска развития дефектов нервной трубки [9, 10].

В ходе исследования было установлено, частота распространения нейтральной аллели гена MTRR A66G в группах с ОСА и ОАА равна 12% и 14% соответственно. Аллель A/G, вызванная заменой аденина на гуанин, в первой нозологической группе составила 58%, а во второй – 51%. В показателях распространения гомозиготной аллели риска установлено наибольшее значение в группе с ОАА, чем в группе – с ОСА, процентное распределение – 35% и 30% соответственно.

Вторым был проанализирован ген MTHFR C677T, который кодирует внутриклеточный фермент метилентетрагидрофолатредуктаза, обеспечивающий превращение фолиевой кислоты и фолата в его активную форму L-метилфолат, необходимого для метилирования витамина B12 и дальнейшего переноса метильной группы на гомоцистеин. Полиморфизм в гомозиготном состоянии снижает активность фермента на 30-70% [9]. Данный процесс обуславливает в увеличении уровня гомо-

-цистеина в крови, что является фактором риска развития тромбозов и атеросклерозов; отслойке плаценты; возможно самопроизвольное прерывание беременности или развитие внутриутробной гипоксии плода. Также повышается риск развития опухоли молочной железы и яичников [2, 6]. В процессе исследования распространения полиморфизма гена MTHFR C677T, установили, что гомозиготная нейтральная аллель (C/C) является одинаково распространенной в двух нозологических группах – 45% (группа с ОСА) и 46% (группа с ОАА). Процентное распределение гетерозиготной аллели (C/T) в первой нозологической группе составило 43%, в то время как во второй – 32%. Гомозиготная аллель риска в группе пациенток с ОСА менее распространена, в отличие от группы с ОАА, составили 12% и 22% соответственно.

Исследование третьего гена фолатного цикла MTHFR A1298C показало, что его полиморфизмом проявляется в замене аденина на цитозин и приводит к незначительному снижению активности фермента метилтетрагидрофолатредуктазы. Данный процесс повышает концентрацию гомоцистеина в крови и уменьшает уровень фолата [7, 8, 10].

Анализируя частоту распространения полиморфизма данного гена фолатного цикла, установили, что гомозиготная аллель гена MTHFR A1298C встречается реже в двух нозологических группах, по сравнению с двумя другими аллелями. Наиболее распространена аллель C/C в первой нозологической группе – 9%, во второй составила 5%. Гетерозиготная аллель риска одинаково распространена в двух нозологических группах – 55% (в группе с ОСА) и 54% (в группе с ОАА). Процентное распределение нейтральной аллели в первой группе составило 36%, во второй – 41%.

Ген MTR A2756G кодирует цитоплазматический фермент метионинсинтаза, катализирующий процесс превращения гомоцистеина в метионин, используя тетрагидрофолат. Полиморфизм заключается в замене аденина на гуанин в последовательности ДНК гена MTR. ОНП приводит к торможению превращения гомоцистеина в метионин, уменьшению концентрации метионина и накоплению гомоцистеина в кровотоке, что оказывает повреждающее действие на стенки сосудов и приводит к

разрыву эндотелия. Также повышается риск недоразвития нервной трубки, органов мочеполовой системы, сердца у плода, риск рождения детей с синдромом Дауна, расщелиной верхней губы и неба. Повышается вероятность развития атеросклероза и тромбоза [1, 3].

Анализ однонуклеотидного полиморфизма четвертого гена фолатного цикла – MTR A2756G показал, что в двух нозологических группах нейтральная аллель гена наиболее распространена и составила 73% в группе пациентов с ОСА и 65% в группе с ОАА. Гетерозиготная аллель гена встречается в группе с ОСА и в группе с ОАА в соотношении 24% и 35% соответственно. Гомозиготная аллель риска – G/G – в группе с ОАА отсутствует (0%), а в группе с ОСА составила 3%.

В ходе исследования выявлено, что однонуклеотидный полиморфизм генов (ОНП) фолатного цикла приводит к нарушению фолатного статуса организма и негативно влияет на гисто- и органогенез плода беременной женщины. Выявлено, что гомозиготная полиморфная аллель гена MTRR – G/G – более распространена в группе с ОАА (35%>30%), гетерозиготная аллель – A/G – в группе с ОСА (58%>51%). Гомозигота по аномальному полиморфизму в гене MTHFR C677T чаще встречается в группе с ОАА (22%>12%), гетерозигота «аллели риска» – C/T – в группе с ОСА (43%>32%). Выявлено, что гетерозиготное состояние гена MTHFR A1298C – A/C – в нозологических группах одинаково распространено (ОСА – 55%, ОАА – 54%), гомозиготная «аллель риска» – A/C – преобладает в группе с ОСА (9%>5%).

ВЫВОДЫ

Полиморфизм в структуре генов фолатного цикла определяет нарушение биохимических процессов, предрасполагающих к невынашиванию плода. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что однонуклеотидный полиморфизм генов системы свертывания крови и фолатного цикла может оказывать синергетический эффект на риск развития тромбозов, невынашивания беременности и ВПР плода. Комплексный подход к диагностике и лечению ПНБ с учетом однонуклеотидного

полиморфизма системы свертывания крови и фолатного цикла позволяет значительно повысить шансы на успешную беременность и рождение здорового ребенка.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Канищева Софья Евгеньевна – сбор данных, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи;

Комкова Галина Викторовна – анализ литературы, планирование исследования, сбор и анализ данных, интерпретация данных, подготовка рукописи;

Шевцова Вера Валерьевна – сбор и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бугай В.А. Нарушения фолатного цикла, вызванные мутантными полиморфизмами в генах MTHFR, MTRR, MTR и исследование частоты их возникновения. *FORCIPE*. 2022;5(S3):392-393.
2. Ведищев С.И., Прокопов А.Ю., Жабина У.В., Османова Э.М. Современные представления о причинах невынашивания беременности. *Вестник Тамбовского университета*. 2013;18(4-1):1309-1312.
3. Гусина А.А. Генетические аспекты нарушений фолатного цикла: связь с врожденными пороками развития. *Репродуктивное здоровье. Восточная Европа*. 2021;11(1):79-90.
4. Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. *ПЦР в реальном времени*. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 223 с.
5. Счастливцев И.В., Лобастов К.В., Цаплин С.Н., Мкрытчев Д.С. Современный взгляд на систему гемостаза: клеточная теория. *Медицинский совет*. 2019;16:72-77.

6. DE MARCO P., CALEVO M.G., MORONI A., ARATA, L., MERELLO E., FINNELL R.H., ZHU H., ANDREUSSI L., CAMA A., CAPRA V. STUDY OF MTHFR AND MS POLYMORPHISMS AS RISK FACTORS FOR NTD IN THE ITALIAN POPULATION. *J HUM GENET.* 2002;47(6):319-324.
7. HOBBS C.A., SHERMAN S.L., YI P., HOPKINS S.E., TORFS C.P., HINE R.J., POGRIBNA M., ROZEN R., JAMES S.J. POLYMORPHISMS IN GENES INVOLVED IN FOLATE METABOLISM AS MATERNAL RISK FACTORS FOR DOWN SYNDROME. *J HUM. GENET.* 2000;67(3):623-630.
8. KANAGAL-SHAMANNA R. DIGITAL PCR: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY.* 2016;1392:43-50.
9. NIJHOUT HF, REED MC, BUDU P, ULRICH CM. A MATHEMATICAL MODEL OF THE FOLATE CYCLE: NEW INSIGHTS INTO FOLATE HOMEOSTASIS. *J BIOL CHEM.* 2004;279(53):55008-55016.
10. ZETTERBERG H. NO ASSOCIATION BETWEEN THE MTHFR A1298C AND TRANSCOBALAMIN C776G GENETIC POLYMORPHISMS AND HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN THROMBOTIC DISEASE. *THROMB RES.* 2002;108:127-131.