



РОЛЬ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИКИ МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Баратова М.Т., Файзырахманова М.М., Мавлянова Н.Н.

ГУ Республиканский специализированный научно-практический центр акушерства и гинекологии МЗРУз. г.Ташкент.

✓ Резюме

Важная роль в этиологии и патогенезе преэклампсии принадлежит генам-кандидатам фолатного обмена. Проведены молекулярно-генетические исследования периферической крови 44 женщин, течение беременности которых осложнилось преэклампсией. Носительство мутации фолатного обмена ассоциировано с развитием преэклампсии, перинатальными потерями, отягощенным репродуктивным анамнезом. Выявленные генетические маркеры позволят сформировать группы риска по преэклампсии. Необходимо продолжить поиск генетических маркеров и их комбинаций, ассоциированных с преэклампсией.

Ключевые слова: преэклампсия, беременность, гомоцистеин, гены фолатного обмена, метилентетрагидрофолатредуктаза.

PREEKLAMPSIYASI BO'LGAN HOMILADOR AYOLLARDA FOLAT METABOLIZMI GENETIKASINING AHAMIYATI

Baratova M.T., Fayzyrakhmanova M.M., Mavlyanova N.N.

Respublika ixtisoslashtirilgan akusherlik va ginecologia ilmiy-amaliy tibbiot markazi. Davlat mussasi

✓ Resume

Preeklampsi etiologiyasi va patogenezida muhim rol foliy kislotasi metabolizmining nomzod genlariga tegishli. Homiladorligi preeklampsi bilan asoratlangan 44 nafar ayolning periferik qonini molekulyar genetik tadqiqotlar o'tkazildi. Folat metabolizm mutatsiyasiga ega bo'lis honaning reproduktiv tarixi, perinatal yo'qotishlar va preeklampsiya rivojlanishi bilan bog'liq. Aniqlangan genetik belgilar PE uchun xavf guruhlarini shakllantirishga imkon beradi. PE bilan bog'liq bo'lgan genetik belgilar va ularning kombinatsiyalarini qidirishni davom ettirish kerak.

Kalit so'zlar: preeklampsi, homiladorlik, homosistein, folatmetabolizmgenlari, metilentetrahidrofolatreduktaza.

THE ROLE OF STUDYING THE GENETICS OF FOLATE METABOLISM IN PREGNANT WOMEN WITH PREECLAMPSIA

Baratova M.T., Fayzyrakhmanova M.M., Mavlyanova N.N.

Republican specialized scientific practical medical center for obstetrics and gynecology

✓ Resume

An important role in the etiology and pathogenesis of preeclampsia belongs to candidate genes of folate metabolism. Molecular genetic studies of the peripheral blood of 44 women whose pregnancy was complicated by preeclampsia were carried out. Carrying a folate metabolism mutation is associated with a burdened maternal reproductive history, perinatal losses, and the development of preeclampsia. The identified genetic markers will allow the formation of risk groups for PE. It is necessary to continue the search for genetic markers and their combinations associated with PE.

Key words: preeclampsia, pregnancy, homocysteine, folate metabolism genes, methylenetetrahydrofolate reductase



Актуальность

Достижения генетики, молекулярной биологии позволяют сегодня с принципиально новых позиций оценивать причины осложнений беременности. Преэклампсия (ПЭ) является мульти факториальным осложнением беременности, генная сеть которого включает различные гены, ответственные за иммунный статус, кодирующие факторы коагуляции и тромбоцитарные рецепторы, участвующие в фолатном цикле, определяющие физиологию сосудистой стенки, межклеточных взаимодействий и другие. Особенность многих вариантов генов в том, что они могут долгое время никак себя не проявлять. Патологические симптомы возникают только при неблагоприятных условиях или при беременности [1,2]. По данным, представленным за последнее время исследовательскими группами, более 100 полиморфных вариантов генов ассоциированы с ПЭ.

Тромбофилия в практике врача акушера-гинеколога на протяжении последних двух десятилетий завоевала прочные позиции и ассоциируется не только с риском развития тромбоэмболических, но и рядом акушерских осложнений, таких как ранние репродуктивные потери, преэклампсия, задержка роста плода и преждевременные роды [16,17]. Купферминк и др. показали, что до 65% женщин с преэклампсией и мертворождениями, отслойкой плаценты и задержкой роста плода имели ту или иную форму наследственных тромбофилий [14].

Важная роль в этиологии и патогенезе преэклампсии принадлежит генам-кандидатам фолатного обмена [4,7,8,9]. Мутации в генах фолатного обмена, обуславливающие снижение активности ферментов метилтетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и метионин-синтазы-редуктазы (MTRR), приводят к избыточному накоплению гомоцистеина в крови и, как следствие, нарушению процессов метилирования в клетках [7,8]. Дефицит фолиевой кислоты обуславливает формирование артериальной гипертензии у беременных, развитие тотальной ангиопатии, микротромбозов, нарастание инсулинорезистентности.

В исследованиях авторов, посвященных взаимосвязи дефицита фолатов с развитием преэклампсии, было показано, что у здоровых женщин, получавших фолиевую кислоту с ранних сроков беременности, дефицит в среднем составляет 15%. В группе пациенток высокого риска реализации преэклампсии - 25%. У беременных с умеренной преэклампсией дефицит фолатов составляет 65%, а с тяжелой ПЭ -78%. В зеркальном отражении у представительниц этих групп растут концентрации ангиотензинпревращающего фермента, ренина, ангиотензина (прямая и достоверная корреляция), участвующих в реализации артериальной гипертензии [6].

В каскаде фолатного цикла важное значение имеют ферменты метилтетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), метионин-синтаза-редуктаза (MTRR) и метионин-синтаза (MTR) [4].

Ген MTHFR кодирует аминокислотную последовательность фермента метаболизма гомоцистеина. Частота встречаемости гомозиготы MTHFR C677T в популяции – 10-12%; частота встречаемости гетерозиготы в популяции – 40%. Гомоцистеин - продукт метаболизма метионина -одной из 8 незаменимых аминокислот организма. Он обладает выраженным токсическим действием на клетку. Циркулируя в крови, гомоцистеин повреждает сосуды, тем самым повышая свёртываемость крови и образование микротромбов в сосудах. Снижение активности метилтетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) - одна из важных причин накопления гомоцистеина в крови. В норме во время беременности уровень гомоцистеина в плазме понижен. Это можно рассматривать, как физиологическую адаптацию организма матери, направленную на поддержание адекватной циркуляции крови в плаценте. Известно около десяти вариантов гена MTHFR, влияющих на функцию фермента. Наиболее изучен полиморфизм 677 С -> Т (A223V). Полиморфизм 677 С -> Т (A223V) связан с заменой в позиции 677 нуклеотида цитозина (С) на тимин (Т). Замена цитозина на тимин в 677 положении приводит к снижению функциональной активности фермента до 35% от среднего значения, в последующем к повышению уровня гомоцистеина в крови, что вызывает эндотелиальную дисфункцию при беременности.

Ген MTRR кодирует цитоплазматический фермент метионин-синтаза-редуктазу (MCP). Частота - 40-50%. Фермент играет важную роль в синтезе белка и участвует в большом количестве биохимических реакций, связанных с переносом метильной группы. Одной из функций MCP является обратное превращение гомоцистеина в метионин. Снижение функциональной активности фермента приводит к гипергомоцистеинемии (ГПЦ), дефектам

развития нервной трубки. Усиливает патологический эффект, ассоциированный с полиморфизмами генов MTHFR и MTR.

Ген MTR кодирует цитоплазматический фермент метионин-синтазу (альтернативное название - 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин S-метилтрансфераза). MTR - B12-зависимая метионин-синтаза. Частота - 20-30%. Катализирует повторное метилированиегомоцистеина с образованием метионина, в качестве кофактора выступает кобаламин (предшественник витамина B12). Снижение функциональной активности фермента влечет рост уровня гомоцистеина в крови, повышение риска развития синдрома Дауна, нарушение развития плода - незаращение нервной трубки.

Мутации генов фолатного обмена клинически проявляются такими осложнениями как преэклампсия, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, задержка внутриутробного развития плода, антенатальная гибель плода; дефект развития нервной трубки плода (spina bifida), анэнцефалия, умственная отсталость ребенка, «заячья губа», «волчья пасть», артериальные и венозные тромбозы. Следует помнить, что данный полиморфизм самостоятельно способен вызывать резистентность 5 фактора к активированному протеину С за счет связывания гомоцистеина с активированным 5 фактором.

Данные зарубежных и отечественных исследований показали наличие связи эпидемиологии и течения ПЭ с этнической и расовой принадлежностью, а также с географическим регионом [3]. Роль генов-кандидатов фолатного обмена в формировании ПЭ активно изучается. При этом полученные результаты о вовлеченности генетических полиморфизмов генов фолатного цикла в формирование ПЭ в разных популяциях неоднозначны [3,9,10,11,12]. Это определило актуальность проведения исследования в нашем регионе.

Цель исследования: данной работы явилось выявление аллельных вариантов и частоты встречаемости полиморфизма генов, кодирующих фолатный обмен у беременных - жительниц Узбекистана с преэклампсией (ПЭ).

Материал и методы

Исследования для молекулярно-генетического анализа явилась периферическая кровь 44 женщин, обратившихся в РСНПМЦАиГМЗРУз в 2021 году, течение беременности которых осложнилось преэклампсией. Всем пациенткам по показаниям проводили молекулярно-генетические исследования. Для проведения молекулярно-генетических исследований из периферической крови была выделена геномная ДНК (набором «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», ООО «НПО ДНК-технология», Россия). Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР – РВ) проводили на программируемом амплификаторе ДТ-прайм (ООО « НПО ДНК-технология », Россия), с использованием тест – системы для выявления однонуклеотидных полиморфизмов MTHFR 677 C>T; MTHFR 1298 A>C; MTR 2756 A>G; MTRR 66 A>G в геномной ДНК человека, выделенной из лейкоцитов цельной крови, методом ПЦР в режиме реального времени (НПФ «Литех», Россия, г. Москва). В основе тестов лежит технология анализа генетических полиморфизмов (singlenucleotidepolymorphisms — SNPs). В случае возникновения замены в нуклеотидной последовательности ДНК возможно обнаружение трех вариантов генотипа: гомозиготы с исходной последовательностью нуклеотидов, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов. Технология ПЦР с анализом кривых плавления дает возможность идентифицировать фрагменты ДНК путем детекции изменений в уровне флуоресценции комплекса фрагмент–проба (меченный флуорофором олигонуклеотидный зонд) на этапе его денатурации и последующего построения графика кривой плавления. Технология включает следующие этапы: амплификация искомой последовательности ДНК; гибридизация ампликонов с олигонуклеотидами (пробами), мечеными флуорофорами; образование комплементарных и частично комплементарных дуплексов; плавление (денатурация) дуплексов; детекция флуоресценции с последующим построением и анализом кривых плавления. Для определения нуклеотидной последовательности, образовавшейся в процессе амплификации, используют метод примыкающих проб (kissingprobes или резонансный перенос энергии). В его основе лежит использование двух типов олигонуклеотидов (проб), гибридизующихся на матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из олигонуклеотидов метят флуоресцентным донором, другой — акцептором (гасителем). Идентификация

нуклеотидной последовательности образца осуществляется в процессе плавления дуплексов (результат гибридизации фрагментов ДНК и олигонуклеотидных зондов), которое происходит при последовательном увеличении температуры реакционной смеси. Преимуществом данного подхода является использование специфических флуорофоров, снижающих риск детектирования неспецифических продуктов амплификации, как при использовании интеркалирующих красителей.

Результат и обсуждение

Средний возраст обследованных первобеременных составил 29 лет, повторно беременных – 34 года, следует отметить самый молодой возраст – 21 год, о чем свидетельствует молодой возраст дебюта преэклампсии, самый старший – 40 лет, что связано с отягощенным репродуктивным анамнезом. При изучении паритета первобеременных было 7 (16%); повторно беременных – 37 (84%), причем развитие преэклампсии наблюдалось у 16 (36,4%) пациенток, которые имели 1-2 беременности – 16 (%), 3-5 беременностей – 20 (45,5%) женщин, 6 и более – 8 (18,1%). Обращает на себя внимание кратность формирования преэклампсии у исследуемых женщин: в 5 наблюдениях зарегистрировано перенесенная дважды тяжелая преэклампсия в анамнезе, трижды – у 4, в остальных случаях – однократно.

По данным литературных источников [5,14] на долю тяжелых форм преэклампсии приходится до 70% мертворождений и выкидышей, а величина перинатальных потерь почти в 5 раз выше, чем при других видах осложнений беременности. В наших исследованиях при анализе исходов предыдущих беременностей установлено, что в анамнезе неразвивающиеся беременности самопроизвольные выкидыши были в 29 (65,9%) случаях при сроках от 4 до 11 недель гестации, антенатальная гибель плодов сроках 23-32 недель у 14 (31,8%), преждевременные роды у 25 (56,8%) пациенток. На фоне тяжелой преэклампсии в 15 случаях (34%) наблюдался СОРП II-III ст. Преждевременная отслойка плаценты произошла у 4 (9%) больных. Превалирующая частота привычного не вынашивания беременности и мертворождений, а также развития СОРП, преждевременных родов у женщин с тяжелой преэклампсией свидетельствует о возможно изначально присутствующих генетических тромбофилиях у матери, препятствующих нормальному процессу имплантации, роста и развития эмбриона (плода).

Анализ соматического статуса показал, что беременность обследованных женщин сопровождалась различными ЭГЗ: железодефицитная анемия (ЖДА) – в 35,4% случаев, хронические заболевания почек – 23%, гиперплазия щитовидной железы – 21,6%, сахарный диабет – 1%, варикозная болезнь – 7%. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частота генотипов и аллелей полиморфизмов генов фолатного цикла у пациенток с преэклампсией в регионе Узбекистана.

Ген	SNP	Генотип	% встречаемости
MTHFR	677 C>T Ala222Val	C/C	65.9
		C/T	27.3
		T/T	6.8
	1298A>C Glu429Ala	A/A	39.5
		A/C	46.5
		C/C	14
MTR	2756 A>G Asp919Gly	A/A	67.4
		A/G	23.3
		G/G	9.3
MTRR	66A>G LLt22Met	A/A	25
		A/G	59.1
		G/G	15.9

При изучении генов было выявлено, что у беременных женщин с преэклампсией гомозигота C/C в гене MTHFR в участке C677T встречается в 65,9% случаев. На долю гетерозигот C/T приходится 27,3% и гомозигот T/T – 6,8%, что может привести к риску развития тромбозов, преэклампсии. Гомозигота A/A в участке A1298C гена MTHFR встречается в 39,5%,

гетерозигота А/С – в 46,5 %, а гомозигота С/С – в 14 % случаев. Гетерозиготное состояние аллеля и гомозигота С/С вызывает снижение активности фермента МТНFR, что вызывает при беременности снижение фолатов в плазме.

Полученные результаты исследований гена MTR в участке A2756G показали, что гомозигота А/А встречается у 67,4 % и не проявляет особенностей. Гетерозигота А/Г встречается в 23,3 %, гомозигота G/G – в 9,3%. Биологическое проявление данных состояний заключается в гипергомоцистеинемии. При изучении гена MTRR в участке A66G только в 25 % выявлена гомозигота А/А, которая не проявляет особенностей и в 75 % случаев представлена гетерозиготой А/Г (59,1%) и гомозиготой G/G (15,9%), приводящие к риску гипергомоцистеинемии и низкому уровню содержания В12 в плазме крови.

Следует отметить роль гипергомоцистеинемии в патогенезе тромботических осложнений в рамках акушерской патологии - преэклампсии, не вынашивании беременности, дефектах нервной трубки у плода и др. ГГЦ может быть спровоцирована витаминно-минеральным дефицитом, особенно недостатком фолиевой кислоты и витаминов группы В, а также соматическими заболеваниями и генетическими аномалиями [6]. В норме при беременности концентрация гомоцистеина в крови женщины имеет более низкие титры. При беременности, протекающей на фоне ПЭ, уровень гомоцистеина повышается, при этом отмечена прямая зависимость между количественным значением гомоцистеина и степенью тяжести ПЭ. Наиболее частый полиморфный вариант в гене МТНFR - это замена цитозина в позиции 677 на тимидин, что в свою очередь приводит к замене аминокислотного остатка аланина на валин в сайте связывания фолата. Другой полиморфизм МТНFR А1298С в экзоне 7 приводит к замене остатка гуанина на остаток аланина. В результате таких полиморфизмов происходит умеренное повышение уровня гомоцистеина в крови, что является фактором риска развития ПЭ и других акушерских осложнений во время беременности [13,18,19].

Выводы

Таким образом, носительство мутации фолатного обмена у исследуемой нами группы женщин фертильного возраста в нашем регионе, ассоциировано с акушерскими осложнениями, в частности с преэклампсией, перинатальными потерями и отягощенным репродуктивным анамнезом. Женщины-носительницы мутации метаболизма фолатов еще на прегравидарном этапе либо в интергестационном интервале имеют взаимосвязь с факторами риска развития преэклампсии, от выраженности которых, вероятно, и будет зависеть степень клинического проявления тромбофилического генотипа фолатного обмена. Выявленные генетические маркеры позволяют сформировать группы риска по ПЭ и проводить профилактические мероприятия. Назначение метилфолата, фолиевой кислоты и витаминов В6, В12 может значительно снизить риск последствий данного варианта полиморфизма.

Несмотря на большое количество проведенных исследований в области взаимосвязи генетических полиморфизмов и преэклампсии, утверждать, что ведущую роль играет один определенный генетический полиморфизм, не целесообразно, поскольку вероятнее всего, только множественные комбинации полиморфных вариантов в сочетании со средовыми факторами приводят к развитию такого грозного осложнения беременности, как ПЭ. В настоящее время не существует специфических генетических маркеров ПЭ. Необходимо продолжать поиск генетических маркеров и их комбинаций, ассоциированных с ПЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Анохова Л. И., Белокриницкая Т. Е., Фролова Н. И., Смоляков Ю. Н. Клинические и молекулярно-генетические предикторы преэклампсии. // ЭНИ Забайкальский мед. вестн. 2017; 3: 7-13.
2. Белинина А.А., Мозговая Е.В., Ремнёва О.В. Спектр генетических тромбофилий у беременных с различной степенью тяжести преэклампсии. Бюллетень медицинской науки. 2020; 1(17): 29-33.
3. Ворожищева А.Ю. Генетические факторы развития преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения: /автореф. дис. ... канд. мед.наук. 03.02.07./ Ворожищева Анна Юрьевна.Томск, 2014; 24с.

4. Ли X, Luo YL, Zhang QH, Mao C, Wang XW, Лю С., Chen Q. Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы C677T, A1298C и риск преэклампсии: метаанализ. *MolBiolRep.*, 2014; 41 (8): 5435–48.
5. Лоскутова Т. О. Эффективность прогнозирования преэклампсии у вагитных. / Т.О. Лоскутова // *Медицинские перспективы*. 2014, Том XIX, №1.-С.101-106.
6. Мальцева Л.И., Павлова Т.В. Генетические аспекты гестоза. *Практическая медицина*. 2011;6(54):7-12.
7. Трифонова Е.А. Гомоцистеин, полиморфизмы гена MTHFR и осложнения беременности / Е.А. Трифонова, Т.В. Габидулина, Т.А. Агаркова, Н.А. Габитова, В. А. Степанов // *Акушерство и гинекология*. 2011.– № 2.– С. 8–15.
8. Ходжаева З.С. Мутация гена MTHFR C677T и синдром репродуктивных потерь / З.С. Ходжаева, С.И. Блинецкая // *Вестник РУДН*. 2009. - №6. - С.339-344.
9. Цахилова С.Г., Сарахова Д.Х., Джонбобоева Г.Н., и др. Генетические аспекты развития гестоза на современном этапе (обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2012;5:98-101.
10. Ван XM, Wu HY, Qiu XJ. Полиморфизм C677T гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и риск преэклампсии: обновленный метаанализ, основанный на 51 исследовании. *ArchMedRes. Elsevier Inc*; 2013. 44 (3): 159–68.
11. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL и Ray JG: Группа идентификации высокого риска преэклампсии: Клинические факторы риска преэклампсии, определенные на ранних сроках беременности: систематический обзор и метаанализ крупных когортных исследований. *BMJ*. 353 (i1753) 2016 г. PubMed / NCBI Просмотр статьи: Google Scholar
12. Войку Д.И., Мунтяну О., Гергичану Ф., Арсен Л.В., Богиллея Р.Э., Градинару Д.М. и Кирстою М.М.: Унаследованная от матери тромбофилия и исходы беременности. *ExpTherMed*. 20: 2411–2414. 2020. PubMed / NCBI Просмотр статьи: Google Scholar
13. Chikosi AB, Moodley J, Pegoraro RJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in black South African women with pre-eclampsia. *ObstetGynaecol*. 1999;106(11):1219-1220.
14. Kupferminc M. Thrombophilia and pregnancy / M. Kupferminc // *Curr. Pharm. Des.* 2005. – Vol. 11, № 6.-P. 735–748.
15. Mello G, Parretti E, Marozio L, Pizzi C, Lojacono A, Frusca T, Tondi F, Borri P, Scarselli G и Sibai BM: Тромбофилия в значительной степени связана с тяжелой преэклампсией. Результаты крупномасштабного исследования, контролируемого лечением. *Гипертензия*. 46: 1270–1274. 2005. PubMed / NCBI Просмотр статьи: Google Scholar
16. Mastrolia S.A. Placental vascular pathology and in creased thrombin generation as mechanisms of disease in obstetrical syndromes / S.A. Mastrolia, M. Mazor, G. Loverro, V. Klaitman, O. Erez // *PeerJ*. – 2014. – № 18. – P. 2:e653. <https://doi.org/10.7717/peerj.653>.
17. Momot A. The Risk Factors of Thrombogenic, Thrombophilia, and the Principle for Heparin Prophylaxis in Personalized Medicine. In: Özcan Başaran, Murat Biteker editors. *Anticoagulation Therapy* / A. Momot, I Taranenko, L. Tsyvkina, N. Semenova, I. Molchanova // Croatia: InTech. – 2016. – P. 47-67.
18. Frosst P, Blom H, Milos R. A Candida tegen etic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetra hydro folate reductase. *NatGenet*. 1995; 10:11-113. 21. Chikosi AB, Moodley J, Pegoraro RJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in black South African women with pre-eclampsia. *ObstetGynaecol*. 1999;106(11):1219-1220.
19. Williams MA, Sanchez SE, Zhang C, et al. Methylene tetra hydro folate reductase 677 C—T polymorphism and plasma folate in relation to pre-eclampsia risk among Peruvian women. *Matern Fetal Neonatal Med*. 2004; 15(5):337-344.) 43.
20. Wu X, Yang K, Tang X, Sa Y, Zhou R, Liu J, Luo Y, Tang W. Полиморфизм гена метаболизма фолиевой кислоты MTHFR C677T и A1298C и риск преэклампсии: метаанализ. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32 (5): 797– 805

Поступила 09.06.2022