

**Н. В. Зотова, Н. В. Казьмина, Е. В. Маркова,
Г. Н. Полстяная, Н. А. Махалова, А. В. Новосельцева**

Центр репродуктивной медицины
ул. Коломенская, 26, корп. 1, Красноярск, 660037, Россия
E-mail: krasivf@scn.ru

ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

С целью выявления цитогенетических и молекулярно-генетических факторов привычного невынашивания беременности проведено обследование 84 пациенток в Красноярском центре репродуктивной медицины. Аномалии кариотипа выявлены в 4,9 % случаев. Мутации в генах предрасположенности к невынашиванию беременности (*MTHFR*, *FII*, *FV*) идентифицированы у 16,7 % пациенток. Определены частоты сочетанных мутаций. Исследованы полиморфизмы генов *GSTM1* и *GSTT1*.

Ключевые слова: невынашивание беременности, генетические факторы.

Наиболее частыми причинами невынашивания беременности являются генетические дефекты, которые могут передаваться от родителей либо возникать *de novo* под действием факторов среды. При этом нарушения наследственного материала на хромосомном и генном уровне приводят к учащению случаев привычного невынашивания беременности.

Наличие сбалансированных хромосомных перестроек у одного из родителей является основной цитогенетической причиной привычного невынашивания. Частота носительства хромосомных аномалий в семьях с невынашиванием более чем в 10 раз превышает популяционный уровень [1], составляя около 8 % [2].

Среди основных молекулярно-генетических факторов предрасположенности к невынашиванию беременности важное значение придают мутациям генов метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*, мутация *C677T*) (OMIM: 607093), II (*FII*, мутация *G20210A*) (OMIM: 176930) и V (*FV*, мутация Лейдена – *G1691A*) (OMIM: 227400), факторов свертывания крови, так как данные дефекты приводят к нарушениям фолатного цикла и системы гемостаза. Такие мутации в сочетании друг с другом и дополнительными факторами значительно повышают риск развития осложнений при беременности (дефекты нервной трубки у плода, аномалии имплантации и раннего

развития зародыша, отставание развития плода, поздний токсикоз (гестоз), фетоплацентарная недостаточность, отслойка плаценты), приводят к нарушению плацентарного кровообращения (тромбообразование), а также развитию тромботических осложнений при приеме гормональных контрацептивов и проведении хирургических операций. В связи с этим анализ мутаций генов *MTHFR*, *FV* и *FII* показан пациенткам с невынашиванием беременности ранних сроков [3–6].

Среди генетических факторов предрасположенности к невынашиванию беременности в качестве дополнительных рассматриваются также делеционные полиморфизмы «генов внешней среды» *GSTM1* (OMIM: 134660) и *GSTT1* (OMIM: 138350). Белковые продукты этих генов – глутатион-S-трансферазы, ферменты второй фазы детоксикации ксенобиотиков – играют важную роль во взаимодействии организма со средовыми факторами [7]. Конъюгация с глутатионом, катализируемая спектром изоферментов глутатион-S-трансфераз, является одним из универсальных механизмов защиты клеток. Мутантные делеционные варианты генов *GSTM1* и *GSTT1* широко распространены в популяциях человека. Недостаточность энзиматической активности вследствие генетического дефекта может являться причиной повышенной индивидуальной чувствительности беременных женщин к канцерогенам окружающей сре-

ды, что может оказывать негативное воздействие на плод [8].

Выявление генетических факторов невынашивания беременности позволяет оптимизировать схему ведения беременности для снижения риска самопроизвольного прерывания. Выявление мутаций в генах системы гемостаза служит показанием к профилактическому клинико-лабораторному усилению контроля гемостаза во время беременности и противотромботической терапии.

Целью работы стало выявление нарушений кариотипа и исследование частот встречаемости мутаций в генах *MTHFR*, *FV*, *FII*, *GSTM1* и *GSTT1* у женщин с невынашиванием беременности.

Материал и методы

Проведено молекулярно-генетическое обследование 84 пациенток с привычным невынашиванием беременности (средний возраст $31,6 \pm 4,9$ лет), 41 человеку из них выполнено кариотипирование.

Цитогенетический анализ проводили по стандартной методике с 72-часовым культивированием ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови и последующим дифференциальным окрашиванием с трипсином (*GTG*). Для каждого пациента анализировали 11–13 метафаз. В ряде случаев проводили дополнительную окраску конститутивного гетерохроматина гидроксидом бария (*CBG*) и ядрышковых организаторов с использованием нитрата серебра (*NOR*) [9]. В случаях с подозрением на мозаицизм использовали подтверждающую FISH-диагностику с использованием зондов, меченных биотином или дигоксигенином. Для каждого пациента анализировали 1 000 клеток (интерфаз и метафаз). Анализ кариограмм и FISH-сигналов проводился на флюоресцентном микроскопе Olympus BX-51

с использованием программных продуктов Applied Spectral Imaging (США).

Выделение ДНК производили из 100 мкл стабилизированной ЭДТА крови с использованием набора «ДНК-сорб-В» в соответствии с инструкцией («АмплиСенс», Россия). С помощью ПЦР- и ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) исследовали мутацию *C677T* гена *MTHFR*. Для анализа мутаций *G20210A* гена *FII* и *G1691A* гена *FV* использовали диагностический набор «FVFI» («ДНК-лаборатория», Россия). Делеционный полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1* исследовали с помощью мультиплексной ПЦР по методике G. Liu и соавт. [10].

Визуализацию осуществляли электрофоретически в 7 % полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Анализ изображений проводили с помощью фотодокументирующей системы «GelDoc».

Результаты исследования и обсуждение

При проведении цитогенетического обследования женщин с привычным невынашиванием беременности аномалии кариотипа выявлены в 4,9 % случаев. При этом одна пациентка имела структурную перестройку – инверсию 9-й хромосомы, а вторая – повышенную частоту нерасхождения по хромосоме X (5 % клеточный клон).

У 16,7 % пациенток с привычным невынашиванием беременности выявлено носительство клинически значимых мутаций генов *MTHFR*, *FII* и *FV*.

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа генов предрасположенности к невынашиванию беременности выявлено, что частота встречаемости гомозигот по Т-аллелю гена *MTHFR* составила

Частоты встречаемости различных мутантных генотипов и сочетаний генотипов у женщин с невынашиванием беременности (n = 84)

Генотипы	Частоты генотипов	
	Абс.	%
<i>MTHFR</i> T/T	10	11,9
<i>FII</i> A/wt	3	3,6
<i>FV</i> A/A	1	1,2
<i>GSTM1</i> 0/0	38	45,2
<i>GSTT1</i> 0/0	15	17,8
<i>GSTM1</i> 0/0 + <i>GSTT1</i> 0/0	9	10,7
<i>GSTM1</i> 0/0 + <i>MTHFR</i> T/T	4	4,8

11,9 % (*MTHFR* T/T) (табл.). Для сравнения: в исследовании Н. Сагп и соавт. [3] гомозиготный вариант данной мутации выявлен с частотой 12,9 % случаев. У пациенток-носительниц гомозиготной мутации *MTHFR* снижение активности метилентетрагидрофолатредуктазы приводит не только к развитию гипергомоцистеинемии, тромбофилии, но и повышает вероятность возникновения хромосомных аномалий у плода. Мутация *C677T* гена *MTHFR* в гетерозиготном состоянии распространена в популяции и не имеет клинической значимости [11].

Мутация *G20210A* гена *FII* (*FII* A/wt) в гетерозиготном состоянии выявлена у 3-х пациенток (3,6 %), в то время как мутация *G1691A* гена *FV* в гомозиготе (*FV* A/A) выявлена только у одной пациентки с невынашиванием (1,2 %). При этом все женщины с данными мутациями имели тромбофилические осложнения в анамнезе.

Делеционные варианты генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* (*GSTM1* 0/0) и *GSTT1* (*GSTT1* 0/0) выявлены в 45,2 и 17,8 % случаев соответственно. На сегодняшний момент вопрос о роли диагностики делеционных полиморфизмов генов *GSTM1* и *GSTT1* при невынашивании беременности остается неясным. Это связано с тем, что наряду с данными, свидетельствующими об ассоциации невынашивания беременности с делециями генов *GSTM1* и *GSTT1*, существуют работы, в которых такой ассоциации не установлено [7].

У 9 пациенток (10,7 %) выявлено сочетанное носительство делеций генов *GSTM1* и *GSTT1* (*GSTM1* 0/0 + *GSTT1* 0/0), 4 женщины (4,8 %) являлись носительницами как делеции гена *GSTM1*, так и гомозиготного T-аллеля гена *MTHFR*.

Таким образом, у 16,7 % пациенток с привычным невынашиванием беременности выявлены клинически значимые варианты генотипов *MTHFR*, *FII* и *FV*, ассоциированные с развитием тромбофилии, нарушениями фолатного цикла и системы гемостаза. Выявленная в работе высокая частота встречаемости делеционного варианта гена *GSTM1* недостаточно информативна сама по себе. Вероятнее всего, делеционные полиморфизмы генов *GSTM1* и *GSTT1* являются генетическим фоном, который в сочетании с другими генетическими (мутации

генов *MTHFR*, *FII*, *FV*, хромосомные нарушения у родителей) и средовыми факторами приводят к невынашиванию беременности. В связи с этим для всех пациенток с невынашиванием целесообразно проводить молекулярно-генетические и цитогенетические исследования с целью выявления групп риска по невынашиванию беременности, ее осложнений, в том числе гестозов, связанных непосредственно с генетическими нарушениями.

Список литературы

1. Харченко Т. В. и др. Цитогенетические аспекты невынашивания беременности и эмбриональных потерь при вспомогательных репродуктивных технологиях / Т. В. Харченко, А. Б. Ильин, В. Г. Абашин // Журн. акушерства и жен. болезней. 2003. № 1. С. 72–76.
2. Гинзбург Б. Г. Цитогенетические аспекты невынашивания беременности в системе медико-генетического консультирования // Проблемы репродукции. 2000. № 1. С. 57–59.
3. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss / Н. Сагп, О. Саломон, Д. Сайдман et al. // Hum. Reprod. 2002. Vol. 17, № 6. P. 1633–1637.
4. Factor V Leiden and prothrombin *G20210A* mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase *C677T*, are associated with recurrent miscarriage / Z. J. Foka, A. F. Lambropoulos, H. Saravelos et al. // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15, № 2. P. 458–462.
5. Spina V. et al. The impact of the factor V Leiden mutation on pregnancy / V. Spina, V. Aleandri, F. Morini // Hum. Reprod. Update. 2000. Vol. 6, № 3. P. 301–306.
6. Tamura T., Picciano F. M. Folate and human reproduction // Am. J. Clin. Nutr. 2006. Vol. 83. P. 993–1016.
7. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss / F. Sata, H. Yamada, T. Kondo et al. // Molecul. Hum. Reprod. 2003. Vol. 9, № 3. P. 165–169.
8. Distribution of components of the glutathione detoxification system across the human placenta after uncomplicated vaginal deliveries / M. T. Raijmakers, S. W. Bruggeman, E. A. Steegers et al. // Placenta. 2002. Vol. 23, № 6. P. 490–496.

9. *Хромосомы человека*. Атлас / А. Ф. Захаров, В. А. Бенюш, Н. П. Кулешов и др. М., 1982.

10. *Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma* / G. Liu, D. P. Miller, W. Zhou et al. // *Cancer Research*. 2001. Vol. 61. P. 8718–8722.

11. *Калашикова Е. А., Кокаровцева С. Н.* Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции // *Мед. генетика*. 2005. № 8. С. 386–390.

Материал поступил в редколлегию 02.03.2007

N. V. Zotova, N. V. Kazmina, E. V. Markova, G. N. Polstyanaya, N. A. Mahalova, A. V. Novoselceva

Diagnostics of genetic factors of recurrent pregnancy

We studied 84 patients of the Center for Reproductive Medicine to investigate cytogenetic and molecular-genetic factors of recurrent pregnancy loss. Karyotype abnormalities were found in 4.9%. Mutations in genes of predisposition to recurrent miscarriage (*MTHFR*, *FII*, *FV*) were found in 16.7%. Compound mutation rates were determined. We also studied polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* genes.

Keywords: recurrent pregnancy, genetic factors.