

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА, ВАСКУЛЯРНО - ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ХОРИОНА И ПЛАЦЕНТЫ, ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ, ФОЛАТНОГО ЦИКЛА ПРИ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИБЕЛИ ПЛОДА

Никогосян Л. Р.

Одесский национальный медицинский университет, кафедра акушерства и гинекологии №1
(Заведующий кафедрой академик НАМН Украины, д.мед. н., профессор Запорожан В.Н.), г. Одесса, Украина

Резюме

Обстежено 327 вагітних. Шанси розвитку антенатальної загибелі плода при наявності поліморфізму генів рецептора гормону прогестерону (PGR) PROGINS, васкулярно-ендотеліального фактору росту (VEGF), ферментів ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS3), метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR) у вагітних з антенатальною загибеллю плода склали 1,7 і знаходяться у межах довірчого інтервалу (CI 0,53 - 2,19; P=0,86). Проведення передконцепційної підготовки та застосування запропонованих заходів не впливає на частоту поліморфізму досліджуваних генів, але профілакує виникнення акушерсько-перинатальних ускладнень, антенатальну загибель плода.

Ключові слова: поліморфізм генів рецепторів прогестерону, васкулярно - ендотеліального фактора росту хоріона і плаценти, ендотеліальної синтази, фолатного циклу, антенатальна загибель плода.

Резюме

Обследовано 327 беременных. Шансы развития антенатальной гибели плода при наличии полиморфизма генов рецептора гормона прогестерона (PGR) PROGINS, васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGF), ферментов эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS3), метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) у беременных с антенатальной гибелью плода составили 1,7 и находятся в пределах доверительного интервала (CI 0,53 - 2,19; P=0,86). Проведение предконцепционной подготовки и применение предложенных мероприятий не влияет на частоту полиморфизма исследуемых генов, но способствует профилактике возникновения акушерско-перинатальных осложнений, антенатальную гибель плода.

Ключевые слова: полиморфизм генов рецепторов прогестерона, васкулярно - эндотелиального фактора роста хориона и плаценты, эндотелиальной синтазы, фолатного цикла, антенатальная гибель плода.

Summary

327 pregnant women are inspected. The chances of antenatal fetus death development at presence of genetic polymorphism of progesterone receptor hormone (PGR) of PROGINS, vascular-endotelial factor of growth (VEGF), enzymes of endotelial cyntase oxide of nitrogen (eNOS3), methilentetrahydrofolatreductase (MTHFR) at the pregnant with antenatal fetus death was made by 1,7 and are within the limits of confidence interval (CI 0, 53 - 2, 19; P=0, 86). The conducting of pre-conception preparation and application of the offered measures does not influence on frequency of the probed genes polymorphism, but instrumental in the prophylaxis of origin of obstetric-perinatal complications, antenatal fetus death.

Keywords: genetic polymorphism of progesteron receptors, vascular-endotelial factor of growth chorion and placenta, endotelial cyntase oxide of nitrogen, folat cycle, antenatal death of fetus.

Введение

Удельный вес антенатальной гибели плода (АГП) составляет 1,2% от общего количества родов. Доля этой патологии в структуре репродуктивных потерь достаточно высокая – 10 – 20%. Наследственная склонность к АГП детерминируется целой группой генов (гены склонности) [5, 8].

Недостаточность продукции прогестерона является причиной нарушений секреторных свойств эндометрия и его рецепции к половым гормонам. Рецептор гормона прогестерона (PGR) контролирует физиологические эффекты гормона. Инсерция в интроне G носит название PROGINS и представлена 2 алелями: T1 – нормальный, T2 – мутантный. Частота алеля T2 полиморфизма PROGINS имеет достоверную связь, особенно при генотипе T2/T2, с

бесплодием, невынашиванием беременности, эндометриозом, опухолевыми процессами матки, яичников. Частота генотипов PROGINS PGR в популяции составляет: T1/T1 - 71,0%; T1/T2 - 25,8%; T2/T2 - 3,2%. Частота алелей: T1 - 83,9%; T2 - 16,1% при коэффициенте шансов OR - 1,07 (Доверительный интервал (CI) - 0,53 - 2,19; P=0,86) [2].

В генезе васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGF) ведущую роль играет полиморфный сайт 1154 G/A, который представлен 2 алелями: G - нормальный вариант и A - мутантный вариант. У гомозигот A/A уровень VEGF в крови достоверно ниже, чем у индивидумов с генотипом G/G, что свидетельствует о влиянии данного полиморфизма на экспрессию гена VEGF. При невынашивании беременности, самовольных выкидышах и при замершей беременности в I-м триместре концентрация VEGF в

сыворотке крови снижается в 2 раза. При этом частота алеля 1154 А гена VEGF при трех и более самовольных выкидышах в анамнезе, достоверно выше, чем в группе контроля [3, 6, 9, 14].

Среди этиологических факторов риска АГП ведущее место принадлежит эндотелиальной дисфункции как материнского, так и плодного организмов, за развитие которой ответственна недостаточная активность эндотелиальной синтазы (eNOS3). В гене eNOS3 полиморфизм в 4-м интроне представленный 2 алелями: 4b - алель, которая содержит 5 повторяющихся фрагментов, и 4a - алель, в котором 4 повтора. В гомозигот по алелю 4a уровень нитратов и нитритов в крови достоверно ниже, чем при алели 4b. Частота в популяции нормального варианта полиморфизма гена eNOS3 в гомозиготной форме b/b составляет 41%, мутантного варианта, который связан с повышением риска заболеваний, a/a - 13%. Частота гетерозиготной формы eNOS3 a/b - вариант полиморфизма с промежуточным положением по уровню базального NO, в популяции составляет 46% [4, 12, 13].

Основным ферментом метаболизма фолиевой кислоты и цианокобаламина является метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), снижение активности которой является одной из причин накопления гомоцистеина в организме, который сопровождается поражениями эндотелия сосудов, стимулированием тромбообразования, нарушением процесса плацентации, нарушением фето-плацентарного кровообращения, результатом чего может быть хроническая гипоксия плода, синдром задержки роста плода, гестоз, АГП. Полиморфизм гена MTHFR C677T является наиболее изученным. Алель C677T – результат точечной мутации, в результате которой аланин заменен на валин. При этом, нормальный алель – это алель С, мутантный алель – Т. Риск развития АГП увеличивается более чем в 14 раз при наличии у плода алеля гена MTHFR 677T в гомо- и гетерозиготном состоянии. Большое значение имеет не только генотип матери, но и генотип плода. В европейской популяции частота T677T MTHFR составляет 10-12% [1, 7, 10, 11].

Цель: Исследование частоты полиморфизма генов рецепторов прогестерона, васкулярно - эндотелиального фактора роста хориона и плаценты, эндотелиальной синтазы, фолатного цикла и взаимосвязи с риском развития антенатальной гибели плода.

Материалы и методы.

Согласно цели и задачам исследования в стационарных, амбулаторных условиях обследовано 327 женщин. Из них, 21 беременная с неосложненным течением беременности, родов, послеродового периода, которые родили здоровых детей, составила контрольную группу (I). Основная группа (II) представленная 102 беременными с АГП, кото-

рые были разделены в зависимости от срока диагностики: 22 – 29 недель (подгруппа II-1), 30 – 37 недель (подгруппа II-2), 38 – 40 недель (подгруппа II-3) по 34 беременных в каждой. Группу сравнения (III) составили 204 женщины, которые имели осложненный акушерско – гинекологический анамнез (спонтанные аборт, аборт, который не состоялся в срок беременности 9 и больше недель, АГП), и у которых была проведена предконцепционная подготовка и применены комплексно стандартные и предложенные меры по профилактике АГП. Определяли частоту полиморфизма генов PROGINS PGR, VEGF, eNOS3, MTHFR.

Методики определения полиморфизма исследуемых генов основаны на исследовании подготовленных препаратов ДНК из венозной крови беременных в количестве 2-3 мл, к которой добавляли 1 мл STE, 1/10 объема раствора SDS ЭДТА к концентрации 50 мм и протеиназу К к конечной концентрации 50 мг/мл. Инкубацию проводили при t +370 С на протяжении 12 часов. Потом смесь охлаждали, добавляли 1/10 объема 3 М раствора ацетата натрия и равный объем хлороформа, мягко экстрагировали на качалке на протяжении 15-20 мин при 160 об/мин и центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин. Количество выделенных препаратов ДНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле (система видеодокументации Imago) и спектрофотометрически (спектрофотометр Microwave-x, Biotech). Реакцию амплификации проводили в объеме 20 мкл с соответствующими праймерами на амплификаторе PRIMUS (Mwg-biotech, Germany). С помощью градиентного блока для полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Icycler, Bio – Rad), определяли наличие и вид исследуемых генотипов ферментов и факторов.

Кроме частоты полиморфизма, определяли величину соотношения шансов (odds ratio, OR) – показатель, который показывает, во сколько раз возможность развития АГП в исследуемых группах беременных отличается от такой, в группе здоровых пациентов. Доверительный интервал CI – 0,53 - 2,19; P=0,86. В пределах доверительного интервала - шанс положительный. Формула для определения OR: $OR = (A/B) : (C/D)$, где А - % или абсолютное число носителей нормальных алелей исследуемых генов, В - % или абсолютное число носителей мутантных алелей исследуемых генов в контрольной группе. С - % или абсолютное число носителей мутантных алелей исследуемых генов, D - % или абсолютное число носителей нормальных алелей исследуемых генов в группе наблюдения,

Результаты исследования.

В группах I и III частота нормальных гомозиготных генотипов PROGINS гена PGR T1/T1 составила 71,4% и 7,5%, гомозиготных генотипов T2/T2 - 4,8% и 61,8% (различие с контрольной группой достоверное - p<0,001) (таблица).

Таблица

Частота полиморфизма исследуемых генов у женщин с А

Генотипы	Группы									
	I, n-21		II-1, n-34		II-2, n-34		II-3, n-34		III, n-204	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Полиморфизм PROGINS гена PGR										
T1/T1	15	71,4	3	8,8*	2	5,9*	2	5,9*	15	7,5*
T2/T2	1	4,8	23	67,6*	19	55,9*	17	50,0*	126	61,8*
T1/T2	5	23,8	8	23,5	13	38,2	15	44,1	63	30,9
Полиморфизм 1154 G/A гена VEGF										
G/G	14	66,7	4	11,8*	3	8,8*	2	5,9*	17	8,3*

A/A	1	4,8	26	76,5*	21	61,8*	20	58,8*	130	63,7*
G/A	6	28,6	4	11,8	10	29,4	12	35,3	57	27,9
Полиморфизм гена eNOS3										
b/b	15	71,4	3	8,8*	4	11,8*	4	11,8*	22	10,8*
a/a	2	9,5	25	73,5*	23	67,6*	21	61,8*	136	66,7*
b/a	4	11,8	6	17,6	7	20,6	9	26,5	46	22,5
Полиморфизм гена MTHFR										
T677T	3	14,3	26	76,5*	24	70,6*	21	61,8*	125	61,3*
C677C	18	85,7	6	17,6*	7	20,6*	7	20,5*	38	18,6*
C677T	-	-	2	5,9	3	8,8	6	17,6	41	20,1

Примечание: * - $p < 0,001$ по отношению к контрольной группе

В группах II-1, II-2, II-3 частота полиморфного гомозиготного генотипа (T2/T/2) составляет 67,6%, 55,9%, 50,0% случаев соответственно. Различие с контрольной группой достоверное ($p < 0,001$).

В группах I и III частота нормального гомозиготного генотипа G/G эндотелиального фактора роста (VEGF) 1154 G/A составляет 66,7% и 8,3%, гомозиготного полиморфного генотипа A/A - 4,8%; - 63,7% (различие с контрольной группой достоверное - $p < 0,001$) (таблица). В группах II-1, II-2, II-3 частота полиморфного гомозиготного генотипа 1154 A/A гена VEGF, составляет 776,5%, 61,8%, 58,8% случаев, соответственно ($p < 0,001$).

В контрольной группе eNOS3 4 b/b определено у 71,4%, a/a - у 9,5%, a/b - у 11,8% наблюдений, в группе III - 10,8%, 66,7%, 22,5%, соответственно ($p < 0,001$) (таблица).

В группе II-1 мутантный вариант полиморфизма eNOS3 4a/a определен у 73,5%, b/b - у 8,8% ($p < 0,001$), a/b - у 17,6% наблюдениях, у беременных группы II-2 - 67,6%, 11,8% ($p < 0,001$), a/b - у 20,6% случаях, у беременных группы II-3 - у 61,8%, 11,8%, 26,3%, соответственно.

Частота встречаемости полиморфного гомозиготного генотипа T677T MTHFR в группах I, III была 14,3%; 61,3%, в группах II-1, II-2, II-3 - 76,5%; 70,6%; 61,3%, соответственно ($p < 0,001$) (таблица).

Шансы развития АГП (OR) при наличии полиморфизма генов рецептора гормона прогестерона (PGR) PROGINS, васкулярно-эндотелиального фактора роста (VEGF), ферментов эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS3), метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) у беременных с АГП в среднем составили 1,7 и находятся в пределах доверительного интервала (CI) (0,53 - 2,19; $P = 0,86$). Наиболее выразительные показатели были у женщин с дисплазией эпителия шейки матки (ДЭШМ), анемией, инфекционными процессами почек, гестозом.

Выводы:

Полученные данные подтверждают риск развития антенатальной гибели плода у беременных, как результат нарушения процессов регуляции обмена стероидных гормонов (прогестерона), васкулярно - эндотелиального фактора роста хориона и плаценты, эндотелиальной функции в организме матери и фето-плацентарном комплексе, метаболических процессов фолатного цикла вследствие наличия полиморфизма генов PROGINS PGR, VEGF, eNOS3, MTHFR.

Экстраполируя полученный результат наличия полиморфизма исследуемых генов на всю выборку, можно утверждать, что отсутствие предконцепционной подготовки не исключает возможности развития АГП, а проведение предконцепционной подготовки и применения предложенных мер способствует профилактике возникновения акушерско-перинатальных осложнений, АГП.

Література

1. Воронін К.В. Вплив мутації гену метилентетрагідрофолатредуктази та гіпергомоцистеїнемії на виношування вагітності / К.В. Воронін, Т.О. Лоскутова, Н.В. Давиденко // Тавричеський медико-біологічний вестник. - 2012. - Т. 15, № 2, ч. 2(58). - С. 51-54.
2. Воронова І. І. Гормональні аспекти та літально-профілактичні заходи у жінок з загрозою преривання вагітності, обумовленої недостаточністю прогестерону в першому триместрі вагітності / І.І. Воронова, Т.Н. Деміна [і др.] // Збірник наукових праць Асоціації акушерів – гінекологів України. - Київ: Інтермед, 2009. - С. 216-220.
3. Климов В.А. Нарушение продукции факторов роста при плацентарной недостаточности / В.А. Климов, И.В. Чибисов // Збірник наукових праць Асоціації акушерів – гінекологів України. - К.: Інтермед, 2008. - С. 337-341.
4. Климов В.А. Физиология эндотелия во время беременности / В.А. Климов, В.В. Чуб, Я.Н. Кремінський // Збірник наукових праць Асоціації акушерів – гінекологів України. - Київ: Інтермед, 2008. - С. 332-337.
5. Современный подход к ведению беременных с мертвым плодом / И.А. Салов, Н.Ф. Хворостухина, И.Е. Рогожина [і др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. - 2007. - № 4. - С. 17-21.
6. Щеголев А.И. Фетоплацентарный ангиогенез при нормальной беременности: роль плацентарного фактора роста и ангиопоэтинов / А.И. Щеголев, Е.А. Дубова, К.А. Павлов // Акушерство и гинекология. - 2010. - №6. - С. 10-15.
7. C677T variant form at the MTHFR gene and CL I: a risk factor for mothers? / M. Martinelli, L. Scapoli, F. Pezzetti [et al.] // Am. J. Med. Genet. — 2001. — Vol. 98. — P. 357-360.
8. Complications and adverse pregnancy outcomes? / M.F. Picciano, Odendaal, R. Thiart [et al.] // Am. J. Clin. Nutrition. -2000. - V. 71, №4. - P. 857-858.
9. Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter / A. Stevens, J. Soden, P. E. Bronchley [et al.] // Cancer Reseach. — 2003. — Vol. 63. — P. 812-816.
10. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C / A. Undas, E.B. Williams, S. Butenas // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 4389-4397.
11. Increased frequency of combined methylenetetrahydro folate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos / H. Zetterberg, B. Regland, M. Palmer [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. — 2002. — Vol. 10. — P. 113-118.
12. Mozgovaia E. V. Genetic predisposition to pre-eclampsia: polymorphism of genes involved in regulation of endothelial functions / E.V. Mozgovaia, O.V. Malysheva, T.E. Ivashchenko [et al.] // BJMG. — 2002. — Vol. 5, N 3-4. — P. 19-26.
13. Noor R. Superoxide dismutase — applications and relevance to human diseases / R. Noor, S. Mittal, J. Iqbal // Med. Sci. Monit. — 2002. — V. 8. — P. 210 — 215.
14. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss / D. Papazoglou, G. Galazios, K. Papatheodorou [et al.] // Fertil. Steril. — 2005. — Vol. 83, N 4. — P. 959-963.