

УДК 618,14

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА С КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Е.А. РЕШЕТНИКОВ, С.П. ПАХОМОВ, И.Н. СОРОКИНА, В.С. ОРЛОВА, М.И. ЧУРНОСОВ

e-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Целью исследования было изучить связи полиморфных вариантов генов фолатного обмена с клиническими (уровень артериального давления до беременности и в конце беременности) и клинико-лабораторными показателями (протеинурия, содержание фибриногена, общего белка, мочевины и креатинина в крови, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время) у беременных с преэклампсией. В группу исследования вошли 322 беременных с диагнозом преэклампсия и 179 женщин с нормальным течением беременности. Полиморфизмы генов фолатного цикла (*MTHFR* +677C>T (rs1801133), *MTHFR* +1298A>C (rs1801131), *MTRR* +66A>G (rs1801394), *MTR* +2756A>G (rs1805087)) исследовали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в режиме реального времени (Real-time-PCR). Установлено, что полиморфные маркеры +2756AA *MTR* и +1298AC, +1298CC *MTHFR* ассоциированы с повышенным уровнем диастолического и систолического артериального давления соответственно у женщин с преэклампсией до беременности. Генотипы +677CT и +677TT *MTHFR* связаны с повышенным уровнем протеинурии, а генетические варианты +2756AA *MTR* и +66GG *MTRR* – с более низким содержанием белка в крови и высоким уровнем протеинурии у беременных с преэклампсией.

Ключевые слова: беременность, преэклампсия, генетический полиморфизм, гены фолатного цикла, метилентетрагидрофолатредуктаза.

ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISMS OF FOLATE CYCLE GENES WITH CLINICAL-LABORATORY INDICATORS IN PREGNANT WOMENS WITH PREECLAMPSIA

E.A. RESHETNIKOV, S.P. PAHOMOV, I.N. SOROKINA, V.S. ORLOVA, M.I. CHURNOSOV

Belgorod State National Research University

The aim of the study was to study the relationship between the polymorphic variants of the folate metabolism genes with the clinical (blood pressure level before pregnancy and at the end of pregnancy) and clinical and laboratory indicators (proteinuria, fibrinogen, total protein, urea and creatinine blood levels, activated partial thromboplastin time, thrombin time) in pregnant women with preeclampsia. The study group included 322 pregnant women with preeclampsia and 179 women with normal pregnancy. Polymorphisms of the genes of the folate cycle (*MTHFR* +677C>T (rs1801133), *MTHFR* +1298A>C (rs1801131), *MTRR* +66A>G (rs1801394), *MTR* +2756A>G (rs1805087)) were studied by polymerase chain reaction (PCR) of real-time DNA synthesis (Real-time-PCR). It was found that polymorphic markers +2756AA *MTR* and +1298AC, +1298SS *MTHFR* are associated with an increased level of diastolic and systolic blood pressure, respectively, in women with preeclampsia prior to pregnancy. Genotypes +677CT and +677TT *MTHFR* are associated with an increased level of proteinuria, and genetic variants of +2756AA *MTR* and +66GG *MTRR* are associated with a lower protein content in the blood and a high proteinuria level in pregnant women with preeclampsia.

Key words: pregnancy, preeclampsia, genetic polymorphism, folate cycle genes, methylenetetrahydrofolate reductase.

doi:10.18522/2218-2268-2017-3-48-53

Введение

Преэклампсия (ПЭ) – это осложнение беременности, возникающее во второй ее половине и характеризующееся появлением отеков, протеинурии, артериальной гипертензии, а также глубокими расстройствами функции сосудистой системы, гемостаза, иммунитета, гемодинамики и микроциркуляции, развитием фетоплацентарной недостаточности, нарушений функции почек, печени, легких [Сидорова, 2016; Williams et al., 2011]. Частота ПЭ составляет 8–20 % среди всех беременных [Сухих, Мурашко, 2010]. В течение последнего десятилетия преэклампсия является одним из основных факторов перинатальной заболеваемости в мире и стабильно занимает 3–4-е место в структуре причин материнской заболеваемости и смертности [Айламазян, Мозговая, 2010; Сидорова, 2016].

Анализ современной литературы свидетельствует, что ПЭ является мультифакторным заболеванием. Генетическая компонента развития ПЭ, может составлять до 50 % всех факторов риска [Баранов, 2009].

Важная роль в этиологии и патогенезе преэклампсии принадлежит генам-кандидатам фолатного обмена [Ворожищева, 2014; Zhou et al., 2016]. Мутации в генах фолатного обмена, обуславливающие снижение активности ферментов метилтетрагидрофолатредуктазы и метионинсинтазы редуктазы, приводят к избыточному накоплению гомоцистеина в крови и, как следствие, нарушению процессов метилирования в клетках [Ворожищева, 2014]. Дефицит фолиевой кислоты обуславливает формирование артериальной гипертензии у беременных, развитие тотальной ангиопатии, микротромбозов, нарастание инсулинорезистентности. Следует отметить, что роль генов-кандидатов фолатного обмена в формировании ПЭ активно изучается, однако данные исследования часто дают противоречивые результаты в разных популяциях мира [Павлова и соавт., 2011; Ворожищева, 2014; Obolens'ka et al., 2011; Williams et al., 2011; Valenzuela et al., 2012; Reilly R. et al., 2014].

Материалы и методы исследования

Характеристика исследованных групп

Согласно поставленным целям и задачам обследованы 501 женщина: 322 беременных с диа-

гнозом преэклампсия и 179 женщин с нормальным течением беременности (контрольная группа). Все клинические исследования осуществлялись согласно протоколам этического комитета Российской Федерации, с информированного согласия пациенток. В настоящее исследование вошли лица русской национальности, не имеющие между собой родства, являющиеся уроженками Центрально-Черноземного региона России. Клинико-лабораторное обследование женщин основной и контрольной группы проводилось на сроке родоразрешения в Перинатальном центре Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

В основную группу включены беременные с диагнозом преэклампсия. Диагноз преэклампсии ставился на основании генерализованных отеков, артериальной гипертензии и протеинурии [Сидорова, 2016]. Средний возраст женщин с ПЭ составил $27,19 \pm 6,4$ лет (варьировал от 18 до 44 лет). В контрольную группу вошли беременные без диагноза преэклампсия в возрасте от 19 до 41 года (средний возраст женщин составил $26,71 \pm 6,36$ лет) ($p > 0,05$). Таким образом, контрольная группа беременных не отличалась от основной группы по месту рождения, возрасту и национальности.

Критериями исключения при формировании выборки явились: наличие среди пациенток патологии матки (фибромиома матки, аномалии развития внутренних половых органов), патология беременности (аномалии прикрепления и расположения плаценты, резус-конфликт), патология плода (врожденные аномалии развития), наличие многоплодной беременности.

Артериальное давление (АД, мм. рт. ст.) у беременных измеряли трехкратно на обеих руках в положении женщины сидя с интервалом через одну минуту. За финальное АД принимали среднее из двух последних измерений. Данные об уровне систолического и диастолического артериального давления у женщин до беременности выкопировывались из амбулаторных карт.

Все беременные прошли необходимое лабораторное обследование, включающее в себя: общий анализ крови, коагулограмма, биохимический анализ крови, общий анализ мочи (белок, удельный вес, эпителий, лейкоциты, цилиндры), анализ мочи по Нечипоренко, анализ мочи по Зимницкому (лейкоциты, эритроциты).

Молекулярно-генетические методы

На базе научно-исследовательской лаборатории «Молекулярной генетики человека» Белгородского государственного национального исследовательского университета всем беременным с преэклампсией и беременным контрольной группы проведено типирование полиморфных вариантов генов фолатного цикла: метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR* +677C>T (rs1801133), *MTHFR* +1298A>C (rs1801131), метионин-синтазы-редуктазы (*MTRR* +66A>G (rs1801394)), метионин-синтазы (*MTR* +2756A>G (rs1805087)). Материалом для исследования послужила венозная кровь, полученная в объеме 8–9 мл из локтевой вены беременных женщин. Анализ всех полиморфных вариантов ферментов фолатного цикла с методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в режиме реального времени (Real-time-PCR).

Статистические методы

Формирование базы данных и статистические расчеты проводились с использованием программы «STATISTICA 6,0». Генные и фенотипические частоты рассчитывались стандарт-

ными методами. Оценка соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди–Вайнберга, выполнялась с использованием критерия χ^2 . С целью минимизации ошибок первого рода (ложноположительные результаты) при проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони.

Изучение связей полиморфных вариантов с патогенетически значимыми количественными признаками ПЭ (уровень АД, уровень фибриногена, протромбиновый индекс и др.) проводили с помощью методов непараметрической статистики [Реброва, 2006].

Результаты

Изученные клинические показатели (уровень артериального давления до беременности и в конце беременности) и клинико-лабораторные показатели (протеинурия, содержание фибриногена, общего белка, мочевины и креатинина в крови, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время) у беременных с преэклампсией представлены в таблице.

Параметры распределения клинических и клинико-лабораторных показателей в исследуемой группе женщин с преэклампсией

| Показатель | Нижний квартиль, (Q25) | Медиана, (M _e) | Верхний квартиль, (Q75) | Критерий Шапиро-Уилка | Уровень значимости, (p) |
|--|------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| САД до беременности, мм.рт.ст. | 110,00 | 110,00 | 115,00 | 0,84 | 0,000000 |
| ДАД до беременности, мм.рт.ст. | 70,00 | 70,00 | 70,00 | 0,82 | 0,000000 |
| ПД до беременности, мм.рт.ст. | 40,00 | 40,00 | 40,00 | 0,79 | 0,000000 |
| АД ср. до беременности, мм.рт.ст. | 83,33 | 83,33 | 85,00 | 0,86 | 0,000000 |
| САД в конце беременности, мм.рт.ст. | 120,00 | 130,00 | 140,00 | 0,97 | 0,000001 |
| ДАД в конце беременности, мм.рт.ст. | 80,00 | 85,00 | 90,00 | 0,94 | 0,000000 |
| ПД в конце беременности, мм.рт.ст. | 40,00 | 50,00 | 55,00 | 0,93 | 0,000000 |
| АД ср. в конце беременности, мм.рт.ст. | 91,67 | 103,33 | 108,33 | 0,98 | 0,0004 |
| Протеинурия, г/л | 0,03 | 0,06 | 0,12 | 0,48 | 0,000000 |
| Содержание фибриногена в крови, г/л | 3,70 | 4,20 | 5,00 | 0,98 | 0,000004 |
| АЧТВ, с | 29,00 | 35,00 | 37,00 | 0,97 | 0,000001 |
| ТВ, с | 14,00 | 15,00 | 15,00 | 0,88 | 0,000000 |
| Содержание общего белка в крови, г/л | 61,00 | 65,15 | 69,00 | 0,99 | 0,01 |
| Содержание мочевины в крови, ммоль/л | 3,57 | 4,40 | 7,10 | 0,89 | 0,000000 |
| Уровень креатинина в крови, мкмоль/л | 64,00 | 72,00 | 84,00 | 0,98 | 0,0001 |

Примечание: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ТВ – тромбиновое время.

В результате исследования установлено, что у женщин с ПЭ, имеющих генотип $+2756AA$ *MTR*, уровень диастолического артериального давления до наступления беременности ($M_e=70,0$ мм.рт.ст., $Q_{25}-Q_{75}=70,0-80,0$ мм.рт.ст.) статистически достоверно выше аналогичного показателя индивидуумов с генотипами $+2756AG$ и $+2756GG$ по этому локусу ($M_e=70,0$ мм.рт.ст., $Q_{25}-Q_{75}=70,0-70,0$ мм.рт.ст.; $p=0,04$). Также у беременных с ПЭ, имеющих генотип $+2756AA$ *MTR*, уровень общего белка в крови ($M_e=62,0$ г/л., $Q_{25}-Q_{75}=60,0-67,0$ г/л.) ниже по сравнению с индивидуумами с генотипами $+2756AG$ и $+2756GG$ по этому локусу ($M_e=64,0$ г/л., $Q_{25}-Q_{75}=61,0-68,0$ г/л.; $p=0,05$).

У женщин с ПЭ, имеющих генотипы $+1298AC$ и $+1298CC$ *MTHFR*, уровень САД до беременности ($M_e=110,0$ мм.рт.ст., $Q_{25}-Q_{75}=110,0-120,0$ мм.рт.ст.) и протеинурии во время беременности ($M_e=0,066$ г/л., $Q_{10}-Q_{90}=0,033-0,160$ г/л.) статистически достоверно выше аналогичных показателей индивидуумов с генотипом $+1298AA$ *MTHFR* ($M_e=110,0$ мм.рт.ст., $Q_{25}-Q_{75}=110,0-115,0$ мм.рт.ст.; $p=0,03$ и $M_e=0,066$ г/л., $Q_{10}-Q_{90}=0,033-0,099$ г/л.; $p=0,03$ соответственно).

Индивидуумы с генотипом $+66GG$ *MTRR* имеют более низкий уровень общего белка в крови ($M_e=62,0$ г/л., $Q_{25}-Q_{75}=58,0-66,0$ г/л.), по сравнению с женщинами с генотипами $+66AG$ и $+66AA$ *MTRR* ($M_e=63,0$ г/л., $Q_{25}-Q_{75}=61,0-68,0$ г/л.; $p=0,05$).

Установлено, что у беременных с ПЭ с генотипами $+677CT$ и $+677TT$ *MTHFR* уровень протеинурии ($M_e=0,066$ г/л., $Q_{10}-Q_{90}=0,033-0,125$ г/л.) выше, чем у беременных с генотипом $+677CC$ *MTHFR* ($M_e=0,066$ г/л., $Q_{10}-Q_{90}=0,033-0,120$ г/л.; $p=0,04$).

Обсуждение

Как свидетельствуют результаты настоящего исследования, полиморфизмы генов фолатного обмена (*MTR* $+2756A>G$, *MTHFR* $+1298A>C$, *MTRR* $+66A>G$, *MTHFR* $+677C>T$) имеют важное патогенетическое значение при формировании клинических и клинико-лабораторных показателей у беременных с ПЭ. Полиморфные маркеры $+2756AA$ *MTR* и $+1298AC$, $+1298CC$ *MTHFR* ассоциированы с повышенным уровнем диастолического и систолического артериального давления соответственно у женщин с ПЭ до беременности. Генотипы $+677CT$ и $+677TT$

MTHFR – с повышенным уровнем протеинурии, а генетические варианты $+2756AA$ *MTR* и $+66GG$ *MTRR* связаны с более низким содержанием белка в крови и высоким уровнем протеинурии у индивидуумов, беременность которых осложнилась развитием ПЭ. В основе выявленных нами связей генетических полиморфизмов генов фолатного цикла с клиническими и клинико-лабораторными показателями женщин с ПЭ могут лежать следующие медико-биологические механизмы. Согласно литературным данным, у индивидуумов, гомозиготных по аллелю $+1298C$ *MTHFR*, выявлено снижение активности *MTHFR* до 60 % от нормы [Friedman et al., 1999], а у гомозигот по аллелю $+677T$ *MTHFR* снижение активности фермента достигает 30 %, у гетерозигот $+677CT$ *MTHFR* – до 65 % [Bailey et al., 1999]. Снижение активности ферментов фолатного цикла (метилентетрагидрофолатредуктаза, метионин-синтаза, метионин-синтаза-редуктаза) (у индивидуумов с генетическими вариантами $+677TT$, $+677CT$ *MTHFR*, $+1298CC$ *MTHFR*, $+1298AC$) ведет к нарушению доставки и метаболизма фолиевой кислоты, накоплению гомоцистеина в плазме крови и развитию гипергомоцистеинемии [Суховольская и соавт., 2012]. При этом гомоцистеин начинает проявлять свои токсические свойства, которые в первую очередь касаются сосудистой стенки. Согласно данным литературы, высокий уровень гомоцистеинемии (ГЦ) является фактором риска развития как атеросклеротического, так и тромбогенного поражения сосудов. Повышение концентрации гомоцистеина увеличивает оксидативный стресс, стимулирует продукцию гладкомышечных клеток и изменяет эластичные свойства сосудистой стенки [Зайнуллина и соавт., 2005; Стрижаков и соавт., 2009]. Нарушение микроциркуляции увеличивает проницаемость сосудов, что ведет к ухудшению реологических свойств крови, замедлению кровотока в микроциркуляторном русле, повышению периферического сопротивления и, как следствие, к артериальной гипертензии, что в свою очередь повышает риск развития преэклампсии и степень выраженности ее проявлений (протеинурия, гипопроteinемия) [Баранова, Большакова, 2004].

В различных исследованиях по поиску ассоциаций генов фолатного цикла с клиническими и клинико-лабораторными показателями у беременных были получены противоречивые резуль-

таты. Так, в португальской популяции была установлена связь генотипа +677TT MTHFR со снижением САД и ДАД у женщин с гестационной гипертензией [Matos et al., 2013], а в исследовании на якутской, бурятской и русской популяциях не было выявлено ассоциаций полиморфизма MTHFR +677C>T с уровнем АД, протеинурией и гипопроотеинемией у беременных с преэклампсией [Ворожищева, 2014]. В аналогичном исследовании, проведенном на русской популяции Центральной России также не было выявлено связей полиморфного маркера гена MTHFR с протеинурией и артериальной гипертензией при преэклампсии [Халфорд-Князева, 2013].

Противоречивость результатов, полученных в различных исследованиях, может быть связана с отличиями в этническом и, соответственно, генетическом фоне изучаемых популяций. Как показывают результаты наших исследований [Чурносков и соавт., 2005; Сорокина и соавт., 2007], даже население отдельных региональных групп русских (Белгородская область, юг Центральной России, центр Центральной России) столь же генетически разнообразно, как и некоторые крупные народы Западной Европы (немцы, норвежцы и др.), и существенно выше изменчивости большинства этносов славянской языковой группы (болгары, чехи, поляки). И эта особенность русского генофонда определяет необходимость при проведении исследования учитывать, на какой популяционной выборке получены результаты.

Таким образом, в результате данного исследования были установлены значимые ассоциации генов фолатного обмена с повышенным уровнем артериального давления у женщин до беременности, повышенным уровнем протеинурии и более низким содержанием белка в крови у беременных с преэклампсией.

Конфликты интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература

Айламазян ЭК, Мозговая ЕВ. Гестоз: теория и практика. М.: Изд-во МЕДпресс-информ, 2008.

Баранов ВС. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009.

Баранова ЕИ, Большакова ОО. Клиническое значение гомоцистеинемии (обзор литературы). Артериальная гипертензия. 2004; 1: 12–15.

Ворожищева АЮ. Генетические факторы развития преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2014; 24.

Зайнулина МС, Глотов АС, Корнюшина МЛ. Тромбофилии в акушерской практике. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009.

Павлова КК, Трифонова ЕА, Готовцева ЛВ, Максимова НР, Ноговицына АН, Степанов ВА. Роль полиморфизмов генов eNOS, ACE и MTHFR в развитии гестоза в якутской популяции. Якутский мед. журн. 2010; 3(31): 28–31.

Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Изд-во Медиа Сфера, 2006.

Сидорова ИС. Преэклампсия. М.: Изд-во «Мед. Информ. агентство», 2016

Сорокина ИН, Чурносков МИ, Балановская ЕВ. Генофонд населения Белгородской области II. «Фамильные портреты» в группах районов с разным уровнем подразделенности и роль миграций в их формировании. Генетика. 2007; 8(43): 1120–1128.

Стрижаков АН, Макацария АД, Тимохина ЕВ, Баймурадова СМ, Козлова УА. Клиническое значение приобретенных и наследственных форм тромбофилий в патогенезе синдрома задержки роста плода. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2009; 8(2):16–21.

Сухих ГТ, Мурашко ЛЕ. Преэклампсия. М.: Издательство ГЕОТАР-медиа. 2010.

Суховольская МА, Субботина ТН, Ольховский ИА, Базарин КП. Мутации в генах метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и метиотин-синтазы (MTR) и факторы риска гипергомоцистеинемии у спортсменов. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 9:65.

Халфорд-Князева ИП. Генетические маркеры прогнозирования преэклампсии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2013; 16.

Чурносков МИ, Песик ВЮ, Рудых НА. Материалы по изучению структуры генофонда русского населения Центральной России. Мед. генетика. 2005; 6(4): 289a-289.

Bailey L, Gregory J. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolatereductase and other enzymes: metabolic significance – cancer, risks and impact on folate requirement. J Nutr. 1999; 129:919–922.

Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Bavaev S, Mendel M, Kidron M, Baron H. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolatereductase gene: association with

plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr.* 1999;129:1656–1661.

Matos A, da Silva AP, Maia H, Ferreira J, Clode N, Areias MJ, Bicho MC, Bicho M, Rebelo I. The polymorphism C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), may increase risk for future higher blood pressure in women with previous hypertension in pregnancy. *Pregnancy Hypertens.* 2013; 3(2): 69.

Obolens'ka MI, Rodrihes RR, Martseniuk OP. Folate-related processes in human placenta: gene expression, amino thiols, proliferation and apoptosis. *Ukr Biokhim Zh.* 2011;83(1):5–17.

Reilly R, McNulty H, Pentieva K, Strain JJ, Ward M. MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there

a modulating role for B-vitamins? *Proc Nutr Soc.* 2014;73(1):47–56.

Valenzuela FJ, Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. *J Pregnancy.* 2012;2012:632732.

Williams PJ, Broughton Pipkin F. The genetics of preeclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(4):405–417.

Zhou L, Cheng L, He Y, Gu Y, Wang Y, Wang C. Association of gene polymorphisms of FV, FII, MTHFR, SERPINE1, CTLA4, IL10, and TNFalpha with pre-eclampsia in Chinese women. *Inflamm Res.* 2016; 65(9): 717–724.