

ЧОРНА Л. Б.¹, ЗАСТАВНА Д. В.¹, МАКУХ Г. В.², КОЛОДІЙ О. І.³¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31 а, ORCID: 0000-0003-3357-1574, 0000-0002-3858-7180

² КНП ЛОР «Львівський обласний клінічний перинатальний центр»,

Україна, 79032, м. Львів, вул. Дж. Вашингтона, 6, ORCID: 0000-0001-7749-5353

³ КНП «3-я міська клінічна лікарня м. Львова», жіноча консультація,

Україна, 79007, м. Львів, вул. Рапопорта, 6, ORCID: 0009-0009-2964-2238

✉ chorna_l@ukr.net, (097) 383-26-29

ПОШИРЕНІСТЬ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *PAI-1* 675 4G/5G ТА *ACE I/D* СЕРЕД ЖІНОК З НАВИКОВИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ

Мета. Робота присвячена вивченню частоти спадкових чинників тромбофілії серед жінок з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ). Встановити частоту та розподіл алелів та генотипів поліморфних локусів *PAI-1* 675 4G/5G та *ACE I/D* серед жінок з ННВ. **Методи.** До дослідної групи увійшли 40 жінок у яких в анамнезі було два і більше викидні. Групу контролю склали 57 жінок, які народили більш як двоє здорових дітей. Генетичне тестування проводили методом полімеразної ланцюгової реакції та застосовували метод ПДРФ. **Результати.** Аналіз частоти алелів локусу 675 5G/4G гена *PAI-1* показав, що алель 675 4G зустрічається частіше у групі жінок з ННВ – 67 %, у порівнянні з 54 % у групі контролю. Встановлено, що наявність алеля 4G у генотипі жінки збільшує ризик ННВ майже у 2 рази ($P = 0.01$). У групі жінок з ННВ частка носіїв генотипу *DD* та алеля *D* гена *ACE* була вищою, ніж у групі контролю (31 % проти 19 %), проте значущих відмінностей не виявлено. Встановлено, що частота жінок з поєднанням генотипів 4G/4G та *DD* двох досліджуваних локусів склали 16,6 % у групі з ННВ на противагу 2,3 % у контрольній групі. Показано, що наявність гомозигот за двома алелями 4G гена *PAI-1* та *D* гена *ACE* приводить до зростання ризику ННВ у 8 разів (ВШ = 8.6, ДІ: 0.9841-75.154, $P = 0.04$). **Висновки.** Встановлено, що поліморфні варіанти *PAI-1* 675 4G/5G та *ACE I/D*, особливо в поєднанні є вагомими чинниками ризику ННВ.

Ключові слова: ННВ, спадкова тромбофілія, генетичний поліморфізм.

У близько 1-5 % жінок репродуктивного віку діагностують навикове невиношування вагітності (ННВ), яке характеризується двома і більше мимовільними викиднями на ранніх термінах вагітності [1]. Протягом останніх десяти-

тиліть вітчизняні та зарубіжні дослідники активно проводять дослідження щодо визначення ролі поліморфізму генів, відповідальних за розвиток тромбофілічних ускладнень, як предиктора репродуктивних втрат. Повноцінний плацентарний кровообіг залежить від збалансованого співвідношення прокоагулянтних та антикоагулянтних механізмів, спадкові тромбофілії можуть призводити до плацентарних судинних ускладнень. Баланс між коагуляцією та фібринолізом має вирішальне значення на ранніх термінах вагітності. Інгібітор тканинного активатора плазміногену типу I (*PAI-1*) та ангіотензинперетворюючий фермент (*ACE*) беруть участь у фібринолітичному процесі, і в низці досліджень повідомляється про зв'язок між поліморфізмом їх генів та невиношуванням вагітності (НВ) [2,3].

PAI-1 є ключовим регуляторним елементом у фібринолітичному каскаді, який забезпечує до 60 % всієї інгібіторної активності, тим самим визначаючи активність фібринолізу. Ендотеліальна експресія *PAI-1* модулюється поліморфізмом 4G/5G в промоторному регіоні гена *PAI-1*. Даний поліморфізм є фактором ризику розвитку тромбозів, інфаркту міокарда, гестозу, репродуктивних втрат та ін. [4].

Дослідження останніх років показали, що серед етіопатогенетичних факторів ризику НВ чільне місце належить ендотеліальній дисфункції як у материнському організмі, так і в фетоплацентарному комплексі. *ACE* – ключовий фермент ренін-ангіотензинової системи (*PAS*), широко представлений на поверхнях ендотеліальних та епітеліальних клітин. Поліморфний варіант гена *ACE I/D* впливає на рівень експресії гена та приводить до зростання концентрації *ACE*. Показана асоціація між поліморфізмами в генах *PAI-1* і *ACE* та рівнем *PAI-1* в плазмі крові.

© ЧОРНА Л. Б., ЗАСТАВНА Д. В., МАКУХ Г. В., КОЛОДІЙ О. І.

Результати досліджень, які присвячені вивченню асоціації даних поліморфних варіантів з ННВ, часто суперечливі, що, можливо, обумовлено етнічною неоднорідністю та/або клінічною гетерогенністю обстежуваних груп осіб [5, 6].

Метою роботи було встановити частоту та розподіл алелів та генотипів поліморфних локусів *PAI-1 675 4G/5G* та *ACE I/D* серед жінок з навиковим невиношуванням вагітності.

Матеріали і методи

Робота виконувалась на базі молекулярно-генетичної лабораторії ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ», м. Львів. Матеріалом дослідження слугували зразки венозної крові жінок, які були скеровані у Львівський міжобласний медико-генетичний центр для медико-генетичного консультування з приводу порушення репродуктивної функції та зразки венозної крові здорових жінок. Усі особи, які брали участь у дослідженні були мешканцями західноукраїнського регіону та надали інформовану згоду для участі у дослідженні.

До групи дослідження увійшли 40 жінок у яких в анамнезі було два і більше викидні. У 78 % жінок спостерігалися мимовільні викидні у першому триместрі вагітності (5-12 тиждень), у 20 % жінок – викидні у другому триместрі. До групи контролю увійшли 57 практично здорових жінок без ускладненого генетичного, акушерського та тромботичного анамнезу, які народили двоє та більше здорових дітей. Жінки всіх груп були репродуктивного віку – від 23 до 40 років.

У осіб обох груп проводилося виділення ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом висолювання. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили методом ПЛР з подальшим рестрикційним аналізом за допомогою специфічних ендонуклеаз рестрикції (Thermo Scientific, Литва). Продукти ампліфікації та рестрикції аналізували за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі, з додаванням бромистого етидію. Перевірку статистичних гіпотез та вірогідність відмінностей проводили з допомогою критерію χ^2 на рівні значущості $P < 0,05$ та застосовували точний критерій Фішера. Силу асоціації алелів та генотипів зі схильністю до захворювання оцінювали за показником відношення шансів (ВШ) з 95 % довірчим інтервалом (95 % ДІ).

Результати та обговорення

Розподіл частоти генотипів та алелів досліджуваних локусів *PAI-1 675 5G/4G* та *ACE I/D* у дослідній групі жінок з ННВ та у контрольній групі здорових жінок представлено у таблиці.

При дослідженні розподілу частоти генотипів локусу *675 5G/4G* гена *PAI-1* у групі жінок з ННВ виявлено, що тільки 10 % жінок з ННВ були носіями генотипу *5G5G* у порівнянні з 25 % осіб контрольної групи (табл.). Встановлено, що у контрольній групі жінок генотип *5G5G* зустрічався статистично значуще частіше, ніж у групі жінок з ННВ ($P = 0.01$), що вказує на протективний ефект даного генотипу щодо невиношування вагітності. Як видно з таблиці, 44 % жінок з ННВ були носіями гомозиготного генотипу *4G4G* гена *PAI-1*, на противагу 31 % жінок контрольної групи, проте відмінність не досягла рівня статистичної значущості ($P = 0.14$). При аналізі частоти алелів локусу *675 5G/4G* гена *PAI-1* виявлено, що алель *675 4G* зустрічався статистично вірогідно частіше у дослідній групі жінок – 67 %, у порівнянні з 54 % у групі контролю ($P = 0.01$). Встановлено, що наявність алеля *4G* у генотипі жінки статистично значуще збільшує ризик ННВ майже у 2 рази (ВШ – 1.75, ДІ: 1.11-2.67, $P = 0,01$).

Аналіз розподілу частоти генотипів локусу *ACE I/D* показав зростання частки носіїв генотипу *ACE II* у контрольній групі жінок – 26 %, у порівнянні з 14 % у групі жінок з ННВ, а частота носіїв гетерозиготного генотипу *ID* була однаковою в обох групах – 55 % (табл.). Значно частіше у групі жінок з ННВ виявляли носіїв генотипу *DD* гена *ACE* – 31 %, на противагу 19 % у групі контролю, проте відмінності не досягли рівня статистичної значущості ($P = 0.22$). Частота алеля *D* також була вищою у групі жінок з ННВ у порівнянні з контрольною групою – 58 % проти 47 %, відповідно, проте значущих відмінностей не було встановлено ($P = 0.11$). Таким чином при аналізі розподілу частоти генотипів та алелів локусу *ACE I/D* виявлено тенденцію до зростання частоти носіїв генотипу *DD* та алеля *D* у групі жінок з ННВ у порівнянні з контрольною групою жінок.

На наступному етапі роботи вважали доцільним порівняти частоту носіїв поєднаних генотипів обох досліджуваних локусів *PAI-1 675 5G/4G* та *ACE I/D* у групі жінок з ННВ та у контрольній групі. В результаті проведеного аналізу виявлено, що частка осіб з генотипом *4G4G/DD* складає 16.6 % у групі жінок з ННВ на противагу 2.3 % у контрольній групі жінок.

Таблиця. Розподіл генотипів та алелів поліморфних локусів *PAI-1* 5G/4G та *ACE* I/D у групі жінок з ННВ та контрольній групі

Досліджувані поліморфні локуси, гени	Генотипи, алелі	Частоти генотипів та алелів, %		Рівень значущості P	ВШ	ДІ (95 %)
		Жінки з ННВ n=40	Контрольна група n= 57			
<i>PAI-1</i> 675 5G/4G	5G5G	10	25	0.01*	0.34	0.15-0.80
	5G4G	46	44	0.87	1.10	0.58-2.07
	4G4G	44	31	0.14	1.68	0.86-3.27
	5G	33	46	0.01*	0.57	0.36-0.9
	4G	67	54		1.75	1.11-2.76
<i>ACE</i> I/D	II	14	26	0.21	0.47	0.16-1.37
	ID	55	55	1.00	1.00	0.45-2.2
	DD	31	19	0.22	1.88	0.75-4.70
	I	42	53	0.11	0.62	0.35-1.10
	D	58	47		1.60	0.90-2.80

Примітки: n – кількість осіб у групі, P – рівень значущості, P* ≤ 0,05 - статистично значуща відмінність.

Встановлено, що наявність гомозигот за двома алелями 4G гена *PAI-1* та D гена *ACE* статистично значуще збільшує ризик ННВ у 8 разів (ВШ= 8.6, ДІ: 0.9841-75.154, P = 0.04). Крім того, значно частіше у групі жінок з ННВ зустрічалося поєднання двох гетерозиготних генотипів – 5G4G та ID (27.8 %), у порівнянні з 16 % у контрольній групі, проте значущих відмінностей не виявлено.

Таким чином у роботі встановлено асоціацію ННВ з 4G алелем локусу *PAI-1* 675 та з гомозиготами за двома алелями 4G гена *PAI-1* та D гена *ACE*.

Спільним у механізмі імплантаційних втрат при тромбофіліях вважається надмірна активація згортання крові, дисбаланс у системі згортання крові, ендотеліопатія, локальні геморагії та мікротромби в області інвазії бластоцисти з порушенням плацентації [7].

Основним ендогенним механізмом, що запобігає тромбоутворенню є фібриноліз. Процес регуляції фібринолізу залежить в першу чергу від активності активаторів плазміногену (*t-PA*, *u-PA*), рівня синтезу *PAI* та їх взаємодії. На сьогодні відомі два типи *PAI*, що відіграють важливу роль у процесі фібринолітичного контролю при вагітності: *PAI-1* та *PAI-2*. При цьому *PAI-1* в основному локалізований в судинному ендотелії, а *PAI-2* – у клітинах трофобласта плаценти та в області плацентарного ложа, хоча останні здатні до продукції як *PAI-2*, так і *PAI-1*.

Ген, що кодує *PAI-1* локалізований на хромосомі 7 (7q21.3-q22.1) і містить 9 екзонів. Найбільш поширеним є поліморфізм 4G/5G інсерція /делеція в промоторному регіоні гена у положенні 675 п. н. вище сайту транскрипції.

Цей поліморфний варіант відіграє роль в регуляції експресії гена *PAI-1* і приводить до посилення його синтезу. В експериментах *in vitro* показано, що 4G алель продукує mRNA у шість разів більше, ніж 5G, а рівень *PAI-1* є вищим приблизно на 25 % у носіїв 4G/4G генотипу [8]. Високий рівень *PAI-1* в ендометрії пов'язують із зниженням глибини інвазії трофобласта та порушенням імплантації [9].

Відомо, що *ACE* є однією з важливих ланок підтримки рівноваги між факторами вазоконстрикції та вазодилатації. Даний фермент контролює перетворення ангіотензину I на ангіотензин II, який у свою чергу є одним з вазоконстрикторів. Ген *ACE* локалізований на хромосомі 17q23 і містить 26 екзонів та експресується в багатьох тканинах, включаючи судинні ендотеліальні клітини. Поліморфний варіант гена *ACE* визначається інсерцією/делецією (I/D) Alu-повтору 287 п. н. у 16-му інтроні гена. Показано, що цей поліморфізм відповідає за більш ніж 50 % індивідуальних варіацій активності *ACE* в сироватці крові [10]. У носіїв гомозиготного генотипу DD гена *ACE* рівень *ACE* ферменту в 2 рази вищий, ніж у носіїв гомозиготного генотипу II. Ген *ACE* відіграє фізіологічну роль у процесах фібринолізу, оскільки регулює концентрацію *PAI-1*, а алель D розглядається як гіпофібринолітичний фактор [11]. Ендотеліальний синтез *PAI-1* індукується ангіотензином II, продукцію якого контролює *ACE*. Високі рівні *PAI-1* ведуть до інгібування фібринолізу. За даними авторів поліморфні варіанти *PAI-1* 4G/5G та *ACE* I/D асоціюють з порушенням формування плаценти та інвазії трофобласта [10, 12].

Підсумовуючи результати дослідження, в роботі встановлено, що поліморфні варіанти *PAI-1 4G/5G* та *ACE I/D* можуть бути вагомим чинником в етіології ННВ. Отримані нами результати співпадають з низкою наукових публікацій у різних популяційних та етнічних групах [2, 3, 11-14].

Вважаємо, що для формулювання більш коректних висновків дослідження необхідно продовжити та розширити внаслідок збільшення дослідної групи жінок з ННВ.

Висновки

Встановлено, що при наявності у генотипі жінки *4G* алеля гена *PAI-1* ризик ННВ зростає у 2 рази, а при наявності гомозигот за двома алелями *4G* гена *PAI-1* та *D* гена *ACE* у 8 разів. Виявлена в роботі асоціація даних тромбофілічних факторів з ННВ є вагомою підставою для розширення діагностичних панелей при різних репродуктивних втратах. Своєчасне виявлення спадкових факторів тромбофілії має важливе значення в плані діагностики та підвищення ефективності корекції ускладнень вагітності.

References

1. Mc Namee K., Dawood F., Farquharson R. G. Thrombophilia and early pregnancy loss. *Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012. Vol. 26. P. 91–102.
2. Aslbahar F., Neamatzadeh H., Tabatabaiee R. S., Karimi-Zarchi M., Javaheri A., Mazaheri M., Foroughi E., Nasiri R. Association of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism with Recurrent Pregnancy Loss: a Meta-Analysis of 26 Case-Control Studies. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2018. Vol. 40 (10). P. 631–641. doi: 10.1055/s-0038-1672137.
3. Adler G., Mahmutbegovic E., Valjevac A., Adler M. A., Mahmutbegovic N., Safranow K., Czernska E., Pawinska-Matecka A., Ciechanowicz I., Marjanovic D. Association Between - 675 ID, 4G/5G PAI-1 Gene Polymorphism and Pregnancy Loss : A Systematic Review. *Acta Inform Med.* 2018. Vol. 26 (3). P. 156–159. doi: 10.5455/aim.2018.26.156-159.
4. Garcia S., Sung N., Mullenix T. M., Dambaeva S., Beaman K., Gilman-Sachs A. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with reproductive failure: metabolic, hormonal, and immune profiles. *Am J Reprod Immunol.* 2016. Vol. 76. P. 70–81. doi: 10.1111/aji.12516.
5. Krause M., Sonntag B., Klamroth R. Heinecke A., Scholz C., Langer C., Scharrer I., Greb R. R., Eckardstein A., Nowak-Gött U. Lipoprotein (a) and other prothrombotic risk factors in Caucasian women with unexplained recurrent miscarriage. Results of a multicentre case-control study. *Thromb Haemostasis.* 2005. Vol. 93 (5). P. 867–781.
6. Kurzawińska G., Barlik M., Drews K., Agata Różycka A., Seremak-Mrozikiewicz A., Ozarowski M., Klejewski A., Czerny B., Wolski H. Coexistence of ACE (I/D) and PAI-1 (4G/5G) gene variants in recurrent miscarriage in Polish population. *Ginekol Pol.* 2016. Vol. 87 (4). P. 271–276. doi: 10.17772/gp/62203.
7. Hansda J., Roychowdhury J. Study of Thrombophilia in Recurrent Pregnancy Loss. *J Obstet Gynaecol India.* 2012. Vol. 62 (5). P. 536–540.
8. Burzotta F., Iacoviello L., Di Castelnuovo A., Zamparelli R., D'Orazio A., Amore C., Schiavello R., Donati M. B., Maseri A., Possati G., Andreotti F. 4G/5G PAI-1 promoter polymorphism and acute - phase levels of PAI-1 following coronary by pass surgery: a prospective study. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2003. Vol. 16. P. 149–154.
9. Buchholz T., Lohse P., Rogenhofer N., Kosian E., Pihusch R., Thaler C. J. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod.* 2003. Vol. 18. 2473–2477.
10. Mello G., Parretti E., Gensini F., Sticchi E., Mecacci F., Scarselli G., Genuardi M., Abbate R., Fatini C. Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ace i/d polymorphism. *Hypertension.* 2003. Vol. 41 (4). P. 932–937. doi: 10.1161/01.HYP.0000063146.40351.
11. Su M. T., Lin S. H., Chen Y. C., Kuo P. L. Genetic association studies of ace and pai-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thrombosis and Haemostasis.* 2013. Vol. 109 (1). P. 8–15.
12. Correa-Noronha S. A., Noronha S.M., Alecrim C., Mesquita Ade C., Brito G. S., Junqueira M. G., Leite D. B., Carvalho C. V., Silva I. D. Association of angiotensin-converting enzyme i gene i/d polymorphism with endometrial but not with ovarian cancer. *Gynecological Endocrinology.* 2012. Vol. 28 (11). P. 889–891.
13. Ahmed H. K., Elgoraish A. G., Abdalla S.E., Babker M. A., Alfeel A. H, Abbas A. O., Mohamedahmed K. A., Elzaki S. G. Meta-analysis – fibrinolysis – coagulation – ACE – PAI-1 – recurrent pregnancy loss. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G and Angiotensin-Converting Enzyme I/D Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss in Sudanese Women: A Case-Control study. *International Journal of Biomedicine.* 2023 Vol. 13 (1). P. 127–133.
14. Nina Perez N., Ostojić S., Zdravčević M., Volk M., Kapović M., Peterlin B. Insertion/deletion polymorphism in intron 16 of ACE gene in idiopathic recurrent spontaneous abortion: case-control study, systematic review and meta-analysis *Reprod Bio-med Online.* 2016. Vol. 32 (2). P. 237–246. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.11.003.

CHORNA L. B.¹, ZASTAVNA D. V.¹, MAKUKH H. V.², KOLODIY O. I.³

¹ *SI "Institute of Hereditary Pathology NAMS of Ukraine",*

Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31 a

² *Lviv State Regional Clinical Perinatal Center,*

Ukraine, 79032, Lviv, Dzh. Vashynhtona str., 6

³ *KNP «3rd city clinical hospital of Lviv», Women's consultation,*

Ukraine, 79007, Lviv, Rapoport str., 6

PREVALENCE OF *PAI-1 675 4G/5G* AND *ACE I/D* POLYMORPHIC VARIANTS IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSSES

Aim. The present study aimed to assess the distribution of inherited risk factors of thrombophilia among women with RPL. To determine the frequency and distribution of alleles and genotypes of polymorphic loci *PAI-1 675 4G/5G* and *ACE I/D* among women with RPL. **Methods.** The study was carried out in a group of 97 women (57 controls and 40 women with RPL). Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to identify the polymorphisms. **Results.** The frequency of *4G* allele of *PAI-1 675 5G/4G* locus was more frequent in the group of women with RPL – 67 %, compared to 54 % in the control group. It was established that the presence of the *4G* allele increases the risk of RPL by almost 2 times ($P = 0.01$). In the group of women with RPL the frequency of carriers of *DD* genotype and *D* allele of *ACE* gene was higher than in the control group (31 % vs. 19 %), but no significant differences were found. The frequency of women with a combination of *4G4G* and *DD* genotypes of the two studied loci was 16.6 % in the group with RPL versus 2.3 % in the control group. It was shown that the presence of homozygotes for two alleles *4G* of the *PAI-1* gene and *D* of the *ACE* gene leads to an 8-fold increased risk of RPL (OR = 8.6, CI: 0.9841-75.154, $P = 0.04$). **Conclusions.** Significance of *PAI-1 675 4G/5G* and *ACE I/D* polymorphic variants, especially in combination, in the predisposition to RPL was established.

Keywords: recurrent miscarriage, inherited thrombophilia, genetic polymorphism.