

ЧОРНА Л. Б.¹✉, ЗАСТАВНА Д. В.¹, ЗАГАНЯЧ Я. Ю.¹, КОЛОДІЙ О. І.², ЦИБУЛЬКА С. Р.¹

¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а, ORCID: 0000-0003-3357-1574, 0000-0002-3858-71802, 0009-0004-2686-9203, 0009-0006-8627-8506

² КНП «3-я міська клінічна лікарня м. Львова», жіноча консультація,

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

✉ chorna_1@ukr.net, (097) 383 26 29

ЧАСТОТА АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *FXIII*, *PAI-1* ТА *ACE* У ЖІНОК ІЗ ЗВИЧНИМ НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ

Мета. У роботі досліджували можливу асоціацію між 3 алельними варіантами генів, білкові продукти яких беруть участь у фібринолітичному процесі, та звичним невиношуванням вагітності (ЗНВ). Метою роботи було встановити частоту та розподіл алельних варіантів генів *FXIII 103G/T*, *PAI-1 675 4G/5G* та *ACE I/D* у жінок із ЗНВ. **Методи.** Дослідження було проведено у 102 жінок (57 жінок з ЗНВ та 45 жінок контрольної групи). Генетичне тестування досліджуваних генетичних локусів проводили методом ПЛР – ПДРФ. **Результати.** В результаті проведених досліджень виявлено, що алель *4G* локусу *PAI-1 675 4G/5G* більш поширений у жінок з ЗНВ ($P < 0,05$). Показано, що наявність у генотипі жінки алеля *4G* гена *PAI-1* збільшує ризик ЗНВ у 1,7 рази. У жінок з ЗНВ виявлено достовірно вищу частоту накопичення комплексних генотипів *GG/4G5G/DD* і *GG/4G4G/DD* генів *FXIII*, *PAI-1*, *ACE*, та *4G5G/ID* і *4G4G/DD* генів *PAI-1* та *ACE*. Крім того, встановлено, що генотип *5G5G* та поєднання генотипу *5G4G* з генотипом *I* гена *ACE* чинять протективний ефект та достовірно знижують ризик ЗНВ. **Висновки.** Отримані нами дані свідчать про те, що у формуванні генетичного ризику втрати вагітності велике значення має як носійство окремих алелів ризику, так і їх взаємодія.

Ключові слова: *FXIII*, *PAI-1*, *ACE*, генетичний поліморфізм, звичне невиношування вагітності.

Втрата вагітності є важливою проблемою репродуктивного здоров'я і торкається 2–5 % пар у світі [1]. Незважаючи на тривале вивчення проблеми невиношування вагітності (НВ), етіологічні чинники та патогенетичні механізми репродуктивних втрат все ще повністю не розкрито. Невиношування вагітності є

поліетіологічним станом, що об'єднує різні порушення як у репродуктивній системі, так і в організмі жінки загалом. На сьогодні відомо багато причин репродуктивних втрат, проте більше, ніж у 50 % випадків етіологічні чинники залишаються нез'ясованими [2, 3].

За даними наукових досліджень встановлено, що порушення у системі гемостазу як набуті, так і спадкові залучені у етіологію звичного невиношування вагітності (ЗНВ), яке характеризується 2-ма та більше мимовільними викиднями [4]. Значна кількість компонентів коагуляційного каскаду прямо або опосередковано впливають на механізми імплантації ембріона, інвазії трофобласта, плацентациї, росту, розвитку та виживання плода. При цьому на ранніх термінах вагітності превалюють прокоагуляційні властивості, у той час, як пізніше вже диференційовані клітини трофобласта виявляють переважно антикоагуляційні властивості [5]. Тож, в умовах змін гемостазу, що характерні для вагітності, виникають умови для розвитку клінічних проявів як протромботичних, так і геморагічних тенденцій.

Фактор XIII (*FXIII*) згортання крові – це багатофункціональна трансглутаміназа, що бере участь у формуванні та стабілізації фібринового згустку, а також в процесі агрегації та адгезії тромбоцитів [6]. Алельний варіант *103 G/T* (*rs5985*) гена *FXIIIА* (ген *FXIII*, субодиниця А) приводить до заміни амінокислотної послідовності в позиції 34 (*Val34Leu*) [7]. У результаті змінюються біохімічні властивості білка, а саме відбувається приблизно 2,5-кратне зростання активації *FXIII*, що веде до вираженої резистентності до фібринолізу [7]. *FXIII* відіграє важливу роль не тільки в процесах коагуляції та фібринолізу, але й у позаклітинному ремоделюванні, ангиогенезі, репарації тканин [8]. За даними досліджень поліморфний варіант *103 G/T*

© ЧОРНА Л. Б., ЗАСТАВНА Д. В., ЗАГАНЯЧ Я. Ю., КОЛОДІЙ О. І., ЦИБУЛЬКА С. Р.

може вести до підвищення ризику ускладнень вагітності, особливо у поєднанні з іншими факторами, зокрема з поліморфним варіантом гена *PAI-1* (інгібітор активатора плазміногену типу I) [9].

PAI-1 належить до родини інгібіторів серинових протеаз (серпінів) і є ключовим регулятором фібринолітичної системи, яка забезпечує розчинення фібринових волокон та запобігає надмірному тромбоутворенню. Алейний варіант *4G* локусу *675 PAI-1 4G/5G* (rs1799889) впливає на регуляцію експресії гена *PAI-1* та веде до зростання його синтезу у носіїв *4G4G* генотипу приблизно на 25 %. Виявлена асоціація поліморфного варіанту *PAI-1 4G/5G* з розвитком тромбозів, невиношуванням вагітності, непліддям, невдалими ЕКО та ін. [10]. У низці досліджень повідомляється про зв'язок між поліморфізмом *PAI-1 4G/5G* та ЗНВ, з огляду на його функціональну здатність впливати на активність фібринолізу [11, 12].

Ангіотензин-перетворюючий фермент (АПФ) – ендотеліальний екзоензим, який відіграє ключову роль у регуляції системної та ниркової циркуляції через перетворення ангіотензину I у вазоконстрикторний пептид ангіотензину II. У 16-му інтроні гена *ACE* виявлено інсерційно-делеційний (*I/D*) поліморфізм (rs1799752). За даними ряду дослідників виявлена асоціація варіанту *DD* гена *ACE* зі зміною рівня експресії гена *ACE* та із вищим у 2 рази рівнем АПФ [13]. *PAI-1* та АПФ беруть участь у фібринолітичному процесі, і в низці досліджень повідомляється про зв'язок між поліморфізмом їх генів та ЗНВ, хоча результати досліджень часто суперечливі [13, 14].

Метою роботи було встановити частоту та розподіл алейних варіантів генів *FXIII 103G/T*, *PAI-1 675 4G/5G* та *ACE I/D* у жінок зі звичним невиношуванням вагітності.

Матеріали і методи

Робота виконувалась на базі молекулярно-генетичної лабораторії ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ», м. Львів. Матеріалом для дослідження слугували зразки венозної крові жінок, які були скеровані на обстеження відносно порушення репродуктивної функції. Усі особи, які брали участь у дослідженні були мешканцями західноукраїнського регіону та надали інформовану згоду для участі у дослідженні. Дослідна група була сформована з 57 жінок у яких в анамнезі було два і більше мимовільні

викидні. Мимовільні викидні першого триместру вагітності (5-12 тиждень) спостерігалися у 67 % жінок, у 33 % жінок реєстрували викидні у другому триместрі. До групи контролю увійшли 45 практично здорових жінок без ускладненого генетичного, акушерського та тромботичного анамнезу, які народили двоє та більше здорових дітей. Жінки обох груп були репродуктивного віку – від 20 до 43 років.

В осіб обох груп проводилося виділення ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом висолювання. Для генотипування досліджуваних локусів генів використовували ампліфікацію специфічних послідовностей ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим рестрикційним аналізом за допомогою специфічних ендонуклеаз рестрикції (Thermo Scientific, США). Продукти ампліфікації і рестрикції аналізували за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Для статистичної обробки отриманих даних застосовували критерій Фішера. Оцінку впливу поліморфних варіантів на ризик розвитку захворювання проводили за допомогою показника відношення шансів (ВШ) з 95 % довірчим інтервалом (95 % ДІ). Результати аналізу вважали статистично достовірними при рівні $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Проведено молекулярно-генетичний аналіз поліморфних варіантів генів *FXIII 103G/T*, *PAI-1 675 4G/5G* та *ACE I/D* у 57 жінок з ЗНВ. Розподіл частоти генотипів та алелів досліджуваних локусів у групі жінок з ЗНВ та у контрольній групі представлено у таблиці.

Дослідження поліморфного варіанту *103G/T* гена *FXIII* згортання крові показало, що у дослідній групі жінок з ЗНВ гетеро- та гомозиготний генотипи (*GT* та *TT*) виявляли частіше, ніж у групі контролю – 39 % та 7 % на противагу 32 % та 5 %, відповідно (табл.). У контрольній групі жінок алель *T* зустрічався з частотою 21 %, а у групі жінок з ЗНВ – у 26 % осіб. При статистичній обробці отриманих результатів нами не було встановлено статистично достовірних відмінностей у розподілі частот алелів та генотипів між дослідною та контрольною групами ($P > 0,05$).

Таблиця. Частота алелів та генотипів поліморфних варіантів *FXIII 103G/T*, *PAI-1 675 4G/5G* та *ACE I/D* у жінок із ЗНВ та у контрольній групі

Досліджувані поліморфні локуси, гени	Генотипи, алелі	Частота генотипів та алелів, %		Рівень значущості P*	ВШ	ДІ (95 %)
		Жінки з ЗНВ n=57	Контрольна група n= 45			
<i>FXIII 103G/T</i>	GG	54	63	0,42	0,71	0,31–1,58
	GT	39	32	0,34	1,30	0,57–2,99
	TT	7	5	0,48	1,55	0,27–8,86
	G	74	79	0,40	0,74	0,38–1,44
	T	26	21		1,79	0,93–3,42
<i>PAI-1 675 4G/5G</i>	5G5G	10	25	0,04*	0,36	0,12–1,02
	5G4G	46	44	0,50	1,07	0,53–2,24
	4G4G	44	31	0,12	1,69	0,79–3,63
	5G	33	46	0,03*	0,68	0,38–1,21
	4G	67	54		1,73	1,01–2,97
<i>ACE I/D</i>	II	25	27	0,82	0,89	0,37–2,19
	ID	47	55	0,43	0,72	0,32–1,58
	DD	28	18	0,24	1,80	0,69–4,70
	I	48	54	0,40	0,78	0,45–1,36
	D	52	46		1,28	0,74–2,23

Примітки: *відмінності порівняно з контролем достовірні при $P < 0,05$, n – кількість зразків.

При аналізі розподілу частоти генотипів локусу *675 4G/5G* гена *PAI-1* у групі жінок з ЗНВ виявлено, що тільки 10 % жінок з ЗНВ були носіями генотипу *5G5G* у порівнянні з 25 % осіб контрольної групи (табл.). Встановлено, що у контрольній групі жінок генотип *5G5G* зустрічався статистично достовірно частіше, ніж у групі жінок з ЗНВ ($P=0,04$), що може вказувати на протективний ефект даного генотипу щодо ЗНВ. Виявлено, що 44 % жінок з ЗНВ були носіями гомозиготного генотипу *4G4G* гена *PAI-1* на протигагу 31 % жінок контрольної групи, проте відмінність не досягла рівня статистичної достовірності ($P=0,12$). Аналіз частоти алелів локусу *675 4G/5G* гена *PAI-1* показав, що алель *675 4G* зустрічався статистично достовірно частіше у дослідній групі жінок – 67 %, у порівнянні з 54 % у групі контролю ($P=0,03$). Встановлено, що наявність *4G* алеля у генотипі жінки статистично достовірно збільшує ризик ЗНВ у 1,7 рази (ВШ – 1,73, ДІ: 1,01 – 2,97, $P=0,03$).

Аналіз поліморфного варіанту *I/D* гена *ACE* показав, що частота носіїв гетерозиготного генотипу *ID* була вищою у контрольній групі жінок і склала 55 % у порівнянні з 47 % у дослідній групі. У групі жінок з ЗНВ виявлено значне зростання частки носіїв гомозиготного генотипу *DD* – 28 % проти 18% контрольній групі. При дослідженні розподілу частоти алелів також показано зростання частки носіїв *D* алеля

у жінок з ЗНВ – 52 % при 46 % у групі контролю. Проте відмінності у розподілі генотипів та алелів не досягли рівня статистичної достовірності ($P>0,05$).

На наступному етапі роботи нами було застосовано аналіз комплексних або поєднаних генотипів, враховуючи те, що білкові продукти досліджуваних генів мають прямий або опосередкований функціональний вплив на активність фібринолізу. Нами проведений аналіз поєднання генотипів за трьома та за двома поліморфними локусами *FXIII 103G/T*, *PAI-1 675 4G/5G* та *ACE I/D* у жінок із ЗНВ та у контрольній групі жінок.

З найвищою частотою у групі жінок з ЗНВ зустрічалося поєднання генотипів *4G5G/ID* – 28 %, у контрольній групі такий генотип виявлено у 13 % осіб. У 19 % жінок з ЗНВ виявляли поєднання генотипів *GG/4G5G/DD*, у порівнянні з 9 % у групі контролю. Носіями поєднаних генотипів *4G4G/DD* за 2-ма генами *PAI-1* та *ACE*, та *GG/4G4G/DD* за 3-ма генами *FXIII*, *PAI-1* та *ACE* були 14 % та 9 % жінок з ЗНВ у порівнянні з 4 % та 2 % осіб контрольної групи. При статистичних обрахунках виявлено, що частота носіїв поєднаних генотипів за трьома генами *GG/4G5G/DD* та *GG/4G4G/DD* була достовірно вищою серед жінок з ЗНВ – 28 % на протигагу 11 % у групі контролю ($P=0,04$). Частка жінок з ЗНВ носіїв поєднаних генотипів за двома генами *4G5G/ID* та *4G4G/DD* також

була достовірно вищою – 42 % при 17 % у контрольній групі ($P=0,01$). У контрольній групі жінок найчастіше зустрічався комплексний генотип *4G5G/II* – 20 % осіб, при тому що у групі жінок з ЗНВ такий генотип виявляли тільки у 5 % жінок. Таким чином, нами встановлено, що генотип *4G5G/II* статистично достовірно частіше зустрічався у контрольній групі жінок, що вказує на його протективний ефект та зниження ризику ЗНВ ($P=0,03$). Крім того, серед осіб контрольної групи виявляли носіїв генотипів, які або не зустрічалися, або були менш репрезентативними у дослідній групі: *5G5G/ID* – 11 % та *5G5G/II* – 4 %.

У результаті проведених досліджень ми виявили, що у групі жінок з ЗНВ *4G* алель локусу *675 4G/5G* гена *PAI-1* зустрічався достовірно частіше та встановлено, що його наявність у генотипі жінки збільшує ризик ЗНВ у 1,7 рази ($P<0,05$). Також нами виявлено, що генотип *5G5G* частіше зустрічався у контрольній групі жінок і підтверджено його протективний ефект, що вказує на зниження ризику ЗНВ ($P<0,05$). Таким чином у нашому дослідженні підтверджено важливу роль поліморфного варіанту *675 4G/5G* гена *PAI-1* у зростанні ризику ЗНВ. *PAI-1* є центральним компонентом фібринолітичної системи, що пригнічує тканинні та урокіназні активатори плазміногена, знижуючи таким чином рівень плазміну. В експериментах *in vitro* показано, що *4G* алель продукує у шість разів більше mRNA, ніж *5G* алель, при цьому рівень *PAI-1* у носіїв *4G/4G* генотипу є вищим приблизно на 25 % [15]. За даними досліджень показана значна роль *PAI-1* у контролі активності фібринолізу, не тільки при зниженні тромботворення, але й у процесах ремоделювання тканин під час імплантації ембріона та плацентації [13]. Отримані нами результати узгоджуються з результатами низки досліджень та підтверджують наявність асоціації між *4G* алелем та виникненням повторних втрат вагітності [10, 12].

References

1. Chester M. R., Tirlapur A., Jayaprakasan K. Current management of recurrent pregnancy loss. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2022. Vol. 24. P. 260–271. doi: 10.1111/tog.12832.
2. Hong L. Y., Marren A. Recurrent pregnancy loss: A summary of international evidence-based guidelines and practice. *Aust J Gen Pract*. 2018. Vol. 47. P. 432–436.
3. Kasak L., Rull K., Laan M. Genetics and Genomics of Recurrent Pregnancy Loss. *The Bulletin Human Reproductive and Prenatal Genetics*. 2019. Vol. 21. P. 463–494.
4. Homer H. A. Modern management of recurrent miscarriage. *Aust NZJ Obstet Gynaecol*. 2019. Vol. 59, № 1. P. 36–44. doi: 10.1111/ajo.12920.

Фізіологія нормального перебігу вагітності передбачає значні зміни в системі згортання крові та фібринолізу. Такі зміни пов'язані з розвитком матково-плацентарного кровообігу та носять пристосувальний характер. Більш того, функціональний баланс у системі згортання крові та фібринолізу забезпечує адекватну інвазію трофобласта, що має вирішальне значення для успішної імплантації. Як видно з отриманих нами результатів, у групі жінок з ЗНВ виявлено значне накопичення комплексних несприятливих генотипів, які, за даними досліджень, мають гіпофібринолітичний вплив, а, отже, підвищують схильність до гіперкоагуляції, що може призводити до порушення процесу імплантації плода і, як наслідок, до раннього переривання вагітності.

Висновки

У роботі досліджували асоціацію між 3 алельними варіантами генів *FXIII*, *PAI-1* та *ACE*, продукти яких беруть участь у фібринолітичному процесі та ЗНВ. Результати показали, що наявність у генотипі жінки алеля *4G* гена *PAI-1* збільшує ризик ЗНВ у 1,7 рази. У групі жінок з ЗНВ встановлено достовірно вищу частоту накопичення комплексних генотипів *GG/4G5G/DD* і *GG/4G4G/DD* генів *FXIII*, *PAI-1*, *ACE* та *4G5G/ID* і *4G4G/DD* генів *PAI-1* та *ACE*, відповідно. Крім того, встановлено, що генотип *5G5G* гена *PAI-1* та поєднання генотипу *5G4G* гена *PAI-1* з генотипом *II* гена *ACE* чинять протективний ефект та достовірно знижують ризик ЗНВ. Отримані нами дані свідчать про те, що у формуванні генетичного ризику втрати вагітності велике значення має як носійство окремих алелів ризику, так і їх взаємодія. У зв'язку з цим є очевидною необхідність дослідження комплексів генів, які можуть розширити уявлення про внесок генетичного поліморфізму в патогенез невиношування вагітності.

5. Kasparova D., Fait T. Early pregnancy loss and inherited thrombophilic states. *Ceska Gynekol.* 2009. Vol. 74, № 5. P. 360–365.
6. Hsieh L., Nugent D. Factor XIII deficiency. *Haemophilia.* 2008. Vol. 14. P. 1190–1200.
7. Muszbek L., Berczky Z., Bagoly Z. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010. Vol. 36. P. 18–33.
8. Schroeder V., Kohler H.-P. New developments in the area of factor XIII. *J. Thromb. Haemost.* 2013. Vol. 11. P. 234–244.
9. Dossenbach-Glaninger A., Trotsenburg M., Dossenbach M. Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism and Coagulation Factor XIII Val34Leu Polymorphism: Impaired Fibrinolysis and Early Pregnancy Loss. *Clinical chemistry.* 2003. Vol. 49. № 7. P. 1081–1086.
10. Li X., Liu Y., Zhang R., Tan J., Chen L., Liu Y. Meta-analysis of the association between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and recurrent pregnancy loss. *Med Sci Monit.* 2015. Vol. 21. P. 1051–1056. doi: 10.12659/MSM.892898.
11. Salazar Garcia M. D., 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.
12. Elmahgoub I. R., Afify R. A., Abdel Aal A. A., El-Sherbiny W. S. Prevalence of coagulation factor XIII and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms among Egyptian women suffering from unexplained primary recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol.* 2014. Vol. 103. P. 18–22. doi: 10.1016/j.jri.2014.02.007.
13. 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. *Thromb Haemost.* 2012. Vol. 109. P. 8–15. doi: 10.1160/TH12-08-0584.
14. Goodman C., Hur J., Goodman C. S. Are polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes associated with recurrent spontaneous miscarriages? *Am J Reprod Immunol.* 2009. Vol. 62. P. 365–370.
15. Burzotta F., Iacoviello L., Di Castelnuovo A. 4G/5G PAI-1 promoter polymorphism and acute – phase levels of PAI-1 following coronary bypass surgery: a prospective study. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2003. Vol. 16. P. 149–154.

CHORNA L. B.¹, ZASTAVNA D. V.¹, ZAGANYACH Ya. Yu.¹, KOLODIY O. I.², TSYBULKA S. R.¹

¹ SI “Institute of Hereditary Pathology NAMS of Ukraine”,

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

² KNP “3rd city clinical hospital of Lviv”, Women’s consultation,

Ukraine, 79007, Lviv, Raporta str., 6

FREQUENCY OF *FXIII*, *PAI-1* AND *ACE* GENE POLYMORPHISMS IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

Aim. We investigated the possible association between 3 allelic variants of genes, whose proteins are involved in the fibrinolysis, and recurrent pregnancy loss (RPL). The aim of the study was to determine the frequency and distribution of allelic variants of *FXIII* 103 G/T, *PAI-1* 675 4G/5G and *ACE* I/D genes in women with RPL. **Methods.** The study was carried out in a group of 102 women (57 women with RPL and 45 women of control group). Genetic testing was performed by PCR-RFLP method. **Results.** It was revealed that 4G allele frequency of *PAI-1* 675 4G/5G was significantly more common in women with RPL than in controls ($P < 0.05$). The presence of 4G allele leads to a 1,7-fold increase risk of RPL. It was showed significantly higher frequency of accumulation of complex genotypes GG/4G5G/DD and GG/4G4G/DD of *FXIII*, *PAI-1*, *ACE* genes, and 4G5G/ID and 4G4G/DD of *PAI-1* and *ACE* genes in group of women with RPL. In addition, 5G5G genotype of *PAI-1* and combination of 4G5G genotype with II genotype of *ACE* gene demonstrated a protective effect and significantly reduced the risk of RPL ($P < 0.05$). **Conclusions.** Our findings suggest that both the carriage of individual risk alleles and their interaction are important in the formation of genetic risk of recurrent pregnancy loss.

Keywords: *FXIII*, *PAI-1*, *ACE*, gene polymorphisms, recurrent pregnancy loss.