

УДК: 618.39- 021.3: 575.113.2

АЛЕЛЬНІ ПОЛІМОРФІЗМИ ГЕНІВ *GSTP1*, *FGB* ТА *PAI-1* ЯК ЙМОВІРНІ МАРКЕРИ РАНЬОГО МИМОВІЛЬНОГО ПЕРЕРИВАННЯ ВАГІТНОСТІ У ЛЮДИНИ

Н.В. ВИШТАК, Л.Б. ЧОРНА, Г.В. МАКУХ, Д.В. ЗАСТАВНА

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»
 Україна, 79000, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а
 e-mail: nv_vishtak@ukr.net

Мета. З'ясувати особливості розподілу алельних поліморфізмів генів детоксикації ксенобіотиків *GSTP1* та тромбофілії (*FGB* і *PAI-1*) у матеріалі мимовільно елімінованих 6–12-тижневих ембріонів людини. **Методи.** виділення ДНК, ПЛР, електрофорез в агарозному гелі. **Результати.** Носійство генотипу 313GG гена *GSTP1* в ембріональному матеріалі асоційоване зі збільшенням вдвічі ризику раннього переривання вагітності ($OR=2.06$, $p<0.05$). **Висновки.** Ймовірним маркером раннього мимовільного переривання вагітності у людини є варіант 313GG гена *GSTP1*.

Ключові слова: алельний поліморфізм генів детоксикації ксенобіотиків *GSTP1* та тромбофілії *FGB* і *PAI-1*, раннє мимовільне переривання вагітності у людини.

Вступ. Найбільш частим ускладненням вагітності є її невиношування. Поняття «невиношування вагітності» (НВ) включає в себе мимовільне переривання вагітності в терміні від моменту її зачаття і до 23-го тижня розвитку плоду. Переривається біля 15 % вагітностей, причому у переважній більшості (3/4 випадків) на ранніх термінах і приблизно 25 % жінок хоча би раз у житті втрачали вагітність. Окрім спорадичних, зустрічається також звичке невиношування вагітності (ЗНВ) – регулярне (3-и рази і більше) мимовільне переривання вагітностей [1–5].

Однією з основних причин ЗНВ є генетичні фактори, а саме: хромосомні аномалії, генні мутації, спадкова схильність [6, 7]. Мимовільний аборт на ранніх термінах часто трактується як «еволюційний механізм елімінації неповноцінних нащадків». При цьому практичний інтерес представляє визначення генів-кандидатів, асоційованих з ризиком звичкого невиношування вагітності, в перелік яких, зокрема, входять і гени системи детоксикації та факторів згортання крові [8–11]. Виходячи з вищесказаного, ми вважали за доцільне оцінити особливості розподілу алельних поліморфних варіантів генів детоксикації ксенобіотиків *GSTP1* та тромбофілій (*FGB* і *PAI-1*) у матеріалі мимовільно елімінованих 6–12-тижневих ембріонів людини. Зокрема, вивчали роль поліморфних локусів: A313G, G455A та 675 4G/5G генів *GSTP1*, *FGB* та *PAI-1* відповідно, у генезі звичкого невиношування вагітності.

Матеріали і методи

Матеріалом для проведення дослідження слугували 50 зразків ворсин хоріона 6–12-тижневих ембріонів людини, отриманих внаслідок мимовільного переривання вагітності. Обстежені ембріони отримані при повторній (3-ій та більше) втраті вагітності, тобто від жінок з діагнозом «звичке невиношування вагітності». Для контролю відібрано 157 практично здорових осіб, як загальнопопуляційна вибірка. Жінки із ЗНВ та здорові особи поінформовані про суть дослідження і згідно принципів біоетики дали згоду на дослідження біологічного матеріалу.

Матеріалом для дослідження слугувала ДНК, виділена із ворсин хоріона мимовільно елімінованих ембріонів та лейкоцитів периферійної крові здорових індивідів. Виділення та

© Н.В. ВИШТАК, Л.Б. ЧОРНА, Г.В. МАКУХ, Д.В. ЗАСТАВНА, 2015

очистку ДНК із ворсин хоріону проводили методом фенол – хлороформної екстракції [12]. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Наявність та специфічність проходження ПЛР перевіряли шляхом електрофорезу в 2 % агарозному гелі. Дослідження мутацій проводили з використанням рестрикційного аналізу.

Статистичний аналіз проводили з використанням критерію χ^2 та критерію Фішера. Для всіх видів аналізу критичний рівень значущості для статистичних критеріїв приймався рівним $p \leq 0.05$. Оцінку відносного ризику проводили за величиною відношення шансів (OR).

Результати та обговорення

Досягнення молекулярної генетики останніх років надають все більше доказів того, що звикле невиношування вагітності є не лише поліетіологічною, а й мультифакторною патологією. Це означає, що ризик ЗНВ внаслідок дії тих чи інших чинників залежить від функціонального стану генів, які беруть участь у захисті організму від цих чинників. Наявність в геномі ембріону алелів генів, які асоціюються із зміною активності ферментів системи біотрансформації ксенобіотиків та виникненням тромботичних станів, є потенційною причиною репродуктивних втрат. Для перевірки даної гіпотези проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних локусів A313G (Ile105Val) гена *GSTP1*, G455A гена *FGB* та 675 4G/5G ins/del гена *PAI-1* у зразках ДНК хоріона мимовільно елімінованих

ембріонів у порівнянні із їх поширеністю серед осіб загальнопопуляційної вибірки.

Молекулярно-генетичний аналіз поліморфного локусу A313G гена *GSTP1* проведено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом ПЛР-продуктів методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), використовуючи ендонуклеазу рестрикції *A/w 26I*. Результати проведеного генотипування поліморфного локусу A313G гена *GSTP1* (*A/w 26I*) подані у таблиці 1.

Частота реєстрації гомозиготного варіанта «дикого» типу – 313AA в дослідній групі відрізнялась від даних, отриманих у контрольній групі (34 % в обстежуваній групі проти 45 % в контрольній групі), проте статистично вірогідних значень не досягла. Частота генотипу 313AG становила 36 % в дослідній групі, і практично не відрізнялася від розподілу даного генотипу у осіб контрольної групи (38 %). Щодо частоти генотипу 313GG *GSTP1* встановлено, що у дослідній групі варіант 313GG спостерігали з частотою удвічі вищою у порівнянні з контролем при показниках: 39 % та 17 %, відповідно. Статистичне опрацювання результатів показало, що ця відмінність є вірогідно значущою при показниках $p < 0,05$.

При оцінці стану здоров'я населення загально-визнаним є обчислення показника відносного ризику (RR) або відношення шансів (OR), за допомогою яких вираховується ризик тої, чи іншої патології при носійстві досліджуваного чинника, в тому числі і генетичного. Відповідно, наступним етапом нашого дослідження було проведення розрахунку величини ризику мимовільного перериву

Таблиця 1. Результати генотипування поліморфного локусу A313G гена *GSTP1* (*A/w 26I*) зразків ДНК мимовільних викиднів

<i>GSTP1</i> A313G Генотип / алелі	ММВ (n = 50)		КГ (n = 157)		Статистичні дані		
	N	%	N	%	χ^2	OR (95 % CI)	RR 95 % CI
313AA	17	34	70	45	1,744*	0,640 (0,33–1,24)	0,763 (0,50–1,17)
313AG	18	36	60	38	0,079*	0,909 (0,47–1,76)	0,942 (0,62–1,43)
313GG	15	39	27	17	5,53**	2,06 (1,14–4,3)	1,744 (1,011–3,009)
A	52	52	200	64	4,355**	0,617 (0,39–0,97)	0,816 (0,66–1,003)
G	48	48	114	36			

Примітка. ММВ – матеріал мимовільних викиднів, КГ – контрольна група, n – кількість зразків ДНК, N – кількість зразків ДНК з визначеним генотипом/алелями, p – рівень значущості, * – $p > 0,05$; ** – $p < 0,05$, OR – коефіцієнт відношення шансів, RR – відносний ризик.

вання вагітності при носійстві ембрионом генотипу 313GG *GSTP1*. Вказаний підхід вважається доцільним, оскільки будь-які подальші превентивні заходи обумовлені величиною ризику, а не просто його наявністю. Як видно з даних таблиці 1, носійство генотипу 313GG гена *GSTP1* підвищує ризик ЗНВ вдвічі при показниках $RR=1,74$, $OR=2,06$. Ймовірно, що причиною цього є нездатність ферментної системи біотрансформації плоду справитись з детоксикацією продуктів оксидативного стресу внаслідок зниження біохімічної активності мутантної форми глутатіон-трансферази класу P1, що кодується геном *GSTP1*. Це дозволило визначити наявність статистично значущого зв'язку між наявністю у плоду нефункціонального генотипу 313GG *GSTP1* та ризиком ЗНВ. Такі результати нам видаються цікавими, оскільки відомо, що глутатіон-S-трансферази починають експресуватися в самому ранньому ембріональному періоді розвитку [11]. Очевидно також, що цей напрямок наукового пошуку також безпосередньо стосується питання індивідуальної чутливості до стресу на тканинно-молекулярному рівні.

Дослідження останніх років вказують також на значну роль генетично детермінованих форм тромбофілії у структурі репродуктивних втрат. За окремими даними роль тромбофілії серед причин патології вагітності складає від 40 до 80 % [13]. Виявлено декілька десятків алельних варіантів генів, носійство яких асоціюється з розвитком передтромботичних порушень у системі гемостазу, серед них: гени факторів I, II, V, XII згортання крові, тканинного активатора плазміногена (ТРА), інгібітора активатора плазміногена першого типу – PAI-1.

Найбільшу увагу дослідників привертає поліморфний варіант 455 G/A в промоторному регіоні гена фібриногена *FGB* (фактор I згортання крові). Для встановлення розподілу генотипів та алелів за поліморфним локусом 455G/A гена *FGB*, проводи-

ли молекулярно-генетичне дослідження методом ампліфікації *in vitro* з використанням ендонуклеази рестрикції *Hae III*. В результаті проведених досліджень встановлено розподіл алелів та генотипів за поліморфним варіантом 455G/A гена *FGB* у матеріалі мимовільних викиднів (ММВ) та у осіб загальнопопуляційної контрольної вибірки (табл. 2).

За результатами дослідження встановлено, що нормальний генотип GG локусу *FGB* 455G/A зустрічався частіше у ММВ (63 %), ніж у групі контролю (51 %). У осіб контрольної групи частіше, ніж у ММВ виявляли гетерозиготний генотип GA (46 % проти 37 %). Генотип AA виявлено тільки у однієї особи загально популяційної контрольної вибірки, що склало 3 %. Щодо розподілу алелів, то він був наступним: у ММВ алель А зустрічався з частотою 0,190, а у контрольній групі – 0,260.

Отже, виходячи з отриманих даних встановлено, що у ММВ алель А поліморфного локусу 455G/A гена *FGB* зустрічався рідше, ніж у групі здорових осіб контрольної вибірки. У ММВ алель А у гомозиготному стані взагалі не був виявлений, на противагу 3 % відсоткам у контрольній групі при даних вибірках. Виходячи з вищенаведеного, можна припустити, що мінорний А алель локусу 455G/A гена *FGB* не має значного самостійного впливу на життєздатність ембріона. Отримані результати, на нашу думку вказують на необхідність розширення таких досліджень.

Інгібітор активатора плазміногена 1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1) є ключовим регулятором фібринолітичної системи, яка забезпечує розчинення фібринових волокон та запобігає надмірному тромбоутворенню. Згідно літературних даних, поліморфний варіант 675 4G/5G *ins/del* впливає на регуляцію експресії гена *PAI-1* і веде до зростання його синтезу. У носіїв алеля 4G концентрація PAI-1 вища, ніж у носіїв алеля 5G, що може

Таблиця 2. Розподіл генотипів за поліморфним локусом 455G/A гена *FGB* у матеріалі мимовільних викиднів

<i>FGB</i> 455G/A Генотипи / алелі	ММВ (n = 35)		КГ (n = 35)		p	OR (95 % CI)
	N	%	N	%		
455GG	22	63	18	51	0,466	1,6 (0,61–4,15)
455GA	13	37	16	46	0,469	0,62 (0,24–1,62)
455AA	–	–	1	3	–	–
G	57	81	52	74	0,415	1,52 (0,68–3,40)
A	13	19	18	26		0,66 (0,29–1,47)

Примітка. ММВ – матеріал мимовільних викиднів, n – кількість зразків ДНК, N – кількість зразків ДНК з визначеним генотипом/алелями, p – рівень значущості, OR – коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 3. Розподіл алелів та генотипів за поліморфним локусом 675 4G/5G гена *PAI-1* у матеріалі мимовільних викиднів

<i>PAI 1</i> 4G/5G Генотипи / алелі	ММВ (n = 35)		КГ (n = 35)		p	OR (95 % CI)
	N	%	N	%		
5G/5G	5	14	6	17	0,743	0,81 (0,22–2,93)
4G/5G	16	46	16	46	1,00	1,00 (0,40–2,53)
4G/4G	14	40	13	37	0,810	1,13 (0,44–2,90)
5G	26	0,371	28	0,400	0,730	0,89 (0,45–1,75)
4G	44	0,629	42	0,600		1,13 (0,57–2,23)

Примітка. ММВ – матеріал мимовільних викиднів, КГ – контрольна група, n – кількість зразків ДНК, N – кількість зразків ДНК у визначених генотипом/алелями, p – рівень значущості, OR – коефіцієнт відношення шансів.

призводить до підвищення ризику порушення функцій плаценти і невиношування вагітності [14]. Для встановлення розподілу генотипів та алелів поліморфного локусу 675 4G/5G ins/del проведено молекулярно-генетичне дослідження методом ампліфікації *in vitro* з використанням ендонуклеази рестрикції *BslI*. Результати дослідження наведено у таблиці 3.

Результати показали тенденцію до зниження частки гомозиготного генотипу 5G/5G у матеріалі мимовільних викиднів – 14 % у порівнянні з загальною популяційною контрольною вибіркою – 17 %. У ММВ частка гомозигот за генотипом 4G/4G була дещо вищою у порівнянні з контрольною групою і склала 40 %, проти 37 %, відповідно. Частота 4G алеля у групі ММВ становила 0.629 і практично не відрізнялась від контролю – 0.600 (p=0.730). Статистичне обрахування отриманих результатів не виявило вірогідно значимих відмінностей у розподілі алелів та генотипів за поліморфним локусом 4G/5G гена *PAI-1* у ММВ та у групі здорових осіб контрольної вибірки (p > 0.05).

Висновки

Оцінка особливостей розподілу алельних поліморфізмів генів детоксикації ксенобіотиків *GSTP1* та тромбофілій (*FGB*- і *PAI-1*) у матеріалі мимовільно елімінованих 6–12-тижневих ембріонів людини дозволила встановити, що значущим у генезі раннього мимовільного переривання вагітності є наявність генотипу 313GG за поліморфним локусом A313G гена *GSTP1*. Наявність даного генотипу у плода асоціюється з підвищенням ризику втрати вагітності вдвічі (OR = 2.06, 95 % CI 1.14 – 4.3). Аналіз розподілу генотипів за поліморфним варіантом 455G/A гена *FGB* показав тенденцію до зниження частоти алеля A у зразках ДНК мимовільно елімі-

нованих викиднів у порівнянні з особами групи контролю. При дослідженні частоти генотипів поліморфного локусу 675 4G/5G гена *PAI-1* у зразках ДНК матеріалу мимовільних викиднів вірогідних відмінностей між групами не виявлено.

Перелік літератури

1. Katz V.L., Lentz G.M., Lobo R.A., Gershenson D.M. Spontaneous and recurrent abortion: etiology, diagnosis, treatment // Elsevier Mosby. – Comprehensive Gynecology. 6th ed. Philadelphia, PA. – 2012. – Chap. 16.
2. Mohangoo A.D., Blondel B., Gissler M. et al. International comparisons of fetal and neonatal mortality rates in high-income countries: should exclusion thresholds be based on birth weight or gestational age? // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 5. – e64869.
3. Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage // Lancet. – 2006. – Vol. 368. – P. 601–611.
4. Stirrat G.M. Recurrent miscarriage; definition and epidemiology // Lancet. – 1990. – Vol. 336. – P. 673–675.
5. Farcas S., Belebgeanu V., Popa C. et al. Role of chromosomal translocations in recurrent spontaneous abortion // TMJ. – 2007. – Vol. 57. № 2–3. – P.117–121.
6. Zimmern R.L. The clinical use of genetics and molecular biomarkers: a public health perspectives // Europ. J. Human Genetics. – 2008. – Vol. 16, Suppl. 2. – P. 7.
7. Міщенко В.П., Руденко І.В., Запороженко М.Б. і ін. Медико-генетична діагностика спадкової схильності до невиношування вагітності, репродуктивних втрат // Здоров'я жінчини. – 2014. – № 5. – С. 30–33.
8. Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Готов А.С. и др.; под ред. В.С. Баранова и Э.К. Файламазяна. Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. Генетическая карта репродуктивного здоровья: методические рекомендации – СПб., 2009. – 68 с.
9. Макух Г.В., Чорна Л.Б., Третяк Б.І. і ін. Спектр та частота алельних варіантів генів фолатного обміну (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*), гемостазу (*FV*, *FII*), інсулін – подібного фактора росту – II (*IGF-II*) та гендерний розподіл у самовільних абортусів // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. – Київ.: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 503 – 508.
10. Беспалова О.Н. Генетические факторы риска невынашивания беременности: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук: специальность 14.00.01 «Акушерство и гинекология»; 03.00.15 «Генетика». – СПб., 2009. – 40 с.

11. Van Lieshout E., Knapen M., Lange W. Localization of glutathione S-transferase α and π in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age // Hum. Reprod. – 1998. – Vol. 13. – P. 1380–1386.
12. McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. PCR a Practical Approach. Oxford University press. – New York: Oxford University press, 1993. – 253 p.
13. Макацария А.Д., Бицадзе В.О. Полиморфизм генетической и приобретенной тромбофилии и некоторые акушерские осложнения // Мать и дитя. Материалы II Российского форума. – Москва, 2000.
14. Coulam C.B., Jeyendran R.S., Fishel L.A. et al. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage // Am. J. Reprod. Immunol. – 2006. – Vol. 55, № 5. – P. 360–368.

Представлено М.А. Пілінською, Л.Л. Лукаш
Надійшла 13.01.2015

**АЛЛЕЛЬНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ *GSTP1*,
FGB И *PAI-1* КАК ВЕРОЯТНЫЕ МАРКЕРЫ
РАННЕГО САМОПРОИЗВОЛЬНОГО ПРЕРЫВАНИЯ
БЕРЕМЕННОСТИ У ЧЕЛОВЕКА**

Н.В. Виштак, Л.Б. Чорна, Г.В. Макух, Д.В. Заставна

ГУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины»
Украина, 79008, г. Львов, ул. М. Лысенко, 31а
e-mail: nv_vishtak@ukr.net

Цель: Выяснить особенности распределения аллельных полиморфизмов генов детоксикации ксенобиотиков *GSTP1* и тромбофилии (*FGB* и *PAI-1*) в материале самопроизвольно элиминированных 6–12-недельных эмбрионов человека. **Методы.** выделение ДНК, ПЦР, электрофорез в агарозном геле. **Результаты.** Носительство генотипа

313GG гена *GSTP1* в эмбриональном материале ассоциировано с увеличением вдвое риска раннего самопроизвольного прерывания беременности (OR = 2,06, p <0,05). **Выводы.** Вероятным маркером раннего самопроизвольного прерывания беременности у человека является вариант 313GG гена *GSTP1*.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм генов детоксикации ксенобиотиков *GSTP1* и тромбофилии *FGB* и *PAI-1*, раннее самопроизвольное прерывание беременности у человека.

**ALLELIC POLYMORPHISMS OF *GSTR1*, *FGB* AND *PAI-1*
GENES AS POSSIBLE MARKERS OF EARLY PREGNANCY
LOSS IN HUMAN**

N.V. Vyshtak, L.B. Chorna, H.V. Makukh, D.V. Zastavna

SI «Institute of Hereditary Pathology, NAMS of Ukraine»
Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31-a
e-mail: nv_vishtak@ukr.net

Aim. To disclose the peculiarities of the distribution of allelic variants of xenobiotic detoxification gene *GSTR1* and thrombophilia genes (*FGB* and *PAI-1*) in the material of 6-12-week old spontaneously eliminated human embryos. **Methods:** DNA extraction, PCR, agarose gel electrophoresis. **Results.** The 313GG genotype of *GSTP1* gene is associated with a two-fold increase in risk for early spontaneous abortion (OR=2.06, p<0.05). **Conclusions:** The 313GG variant of *GSTP1* gene is a probable marker of early spontaneous abortion.

Keywords: allelic variants of xenobiotic detoxification gene *GSTR1* and thrombophilia genes *FGB* and *PAI-1*, early spontaneous abortion.