

З. І. РОССОХА^{1,3}, Л. П. ШЕЙКО^{1,2}, Н. Л. МЕДВЕДЄВА³, Н. Г. ГОРОВЕНКО^{1,2}**ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ
ГЕНА *FGB* (-455G/A, C148T) З РІВНЕМ ФІБРИНОГЕНУ
У ЖІНОК З РЕПРОДУКТИВНИМИ РОЗЛАДАМИ**

¹Відділ генетичної діагностики ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини МОЗ України» <amn_igrm@ukr.net>; ²Кафедра медичної та лабораторної генетики (зав. – чл.-кор. НАМН України Н. Г. Горovenko) Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика <medgen2010@ukr.net>;

³ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України» <refcentre2013@ukr.net>

*Фібриноген є важливим коагуляційним фактором системи зсідання крові, за рівнем якого оцінюють стан системи гемостазу у жінок з репродуктивними розладами. Нами виявлено асоціацію між поліморфними варіантами -455G/A (rs1800790) та C148T (rs1800787) за геном *FGB* і концентрацією фібриногену в плазмі крові жінок з обтяженим ранніми репродуктивними втратами або безпліддям анамнезом. Обстежено 177 пацієнток, у яких вивчали взаємозв'язок проаналізованих анамнестичних та клініко-лабораторних даних і показників гемостазу (на момент звернення) з поліморфними варіантами гена *FGB*. За результатами проведеного дослідження дисфібриногенемію спостерігали у 23 % обстежених: підвищений рівень фібриногену (≥ 4 г/л) виявлено у 8,5 %, знижений (≤ 2 г/л) рівень фібриногену – у 14,5 %. Генотип -455AA та комбінація генотипів -455AA/148TT за геном *FGB* були асоційовані із зниженням рівня фібриногену у пацієнток з гіпокоагулянтними гемостатичними порушеннями.*

Ключові слова: фібриноген; ген *FGB*; поліморфні варіанти; C148T, -455G/A; репродуктивні розлади.

Вступ. Питанню збереження та покращання репродуктивного здоров'я жінок медична спільнота та ВООЗ приділяють велику увагу, постійно створюють програми, в яких розробляють нові концептуальні підходи [10]. Але, на жаль, проблема репродуктивних розладів та втрат у жінок залишається надзвичайно актуальною як для розвинених країн, у яких функціонують численні клінічні протоколи, так і для України в нинішніх економічних умовах. В Україні показники безпліддя, спонтанних абортів, мертвонароджуваності, материнської та неонатальної смертності залишаються сталими і високими впродовж тривалого часу, про що неодноразово зазначалося у щорічних звітах МОЗ України [2, 4].

Велика увага протягом останніх трьох десятиріч приділялась вивченню ролі набутої та спадкової тромбофілії у розвитку репродуктивних розладів. За деякими даними, внесок тромбофілії у патологію вагітності становить від 40 до 80 %, а також мають місце різні клінічні прояви ускладнень при своєчасно не виявленій тромбофілії [1, 3]. Значна кількість дослідників асоціювали поліморфні зміни генів каскаду зсідання крові як такі, що значно впливають на появу та розвиток тромбофілії у вагітних, що може провокувати репродуктивні втрати [8]. В акушерській практиці найбільшу загрозу становлять приховані дефекти гемостазу, які у разі невчасної діагностики можуть стати реальними причинами несприятливого завершення гестації. Оцінка рівня фібриногену в плазмі крові є важливим діагностичним маркером багатьох гострих станів та розладів системи зсідання крові у пацієнток з репродуктивними розладами. Саме тому визначення рівня фібриногену є рутинним тестом при виконанні досліджень гемостазу, а його аналіз, на відміну від дослідження генетичного поліморфізму, доступний і при виявленні їх взаємозв'язку може бути важливим маркером клінічної реалізації генетично обумовлених порушень гемостазу. Серед найбільш досліджених поліморфних варіантів гена фібриногену (*FGB*), розглядають -455G/A (rs1800790)

та C148T (rs1800787). Поряд з фізіологічними причинами та екзогенними чинниками патологічної зміни рівня фібриногену не менш важливою є генетична складова – особливості поліморфних варіантів гена *FGB* [6, 7]. Дослідження останніх років показали асоціацію поліморфних варіантів гена з розладами репродуктивної функції у жінок, з порушеннями системи зсідання крові, що супроводжуються змінами рівня фібриногену в плазмі крові [5, 9]. Тому слід звернути увагу та детальніше вивчити особливості впливу генетичного поліморфізму на зміни рівня фібриногену у жінок з репродуктивними розладами для клінічної інтерпретації коливань рівня фібриногену.

Мета дослідження – визначити асоціацію між поліморфними варіантами гена *FGB* (-455G/A і C148T) та змінами концентрації фібриногену у пацієнток з репродуктивними розладами.

Матеріали і методи. Загальну групу становили 177 пацієнток з репродуктивними розладами, серед яких у 90 були ранні репродуктивні втрати в анамнезі (група I), у 87 – безпліддя в шлюбі понад 5 років в анамнезі (група II). Критеріями включення до дослідження були безпліддя або ранні репродуктивні втрати в анамнезі, а критеріями виключення – аномальний каріотип у жінок, інфекційні (в тому числі статеві) захворювання і екстрагенітальна патологія. У всіх пацієнток проаналізовано анамнестичні, клініко-лабораторні дані та показники гемостазу на момент звернення. Середній вік обстежених становив $(33,70 \pm 0,38)$ року, а середня маса тіла та зріст – $(63,90 \pm 1,17)$ кг та $(165,4 \pm 0,5)$ см відповідно. Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів -455G/A та C148T за геном *FGB* проводили за модифікованими протоколами з використанням олігонуклеотидних праймерів («Metabion», Німеччина) методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Продукти ампліфікації фрагментів ДНК гена *FGB* -455G/A та C148T підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції *HaeIII* і *HindIII* відповідно («ThermoScientific», США) (рис. 1).

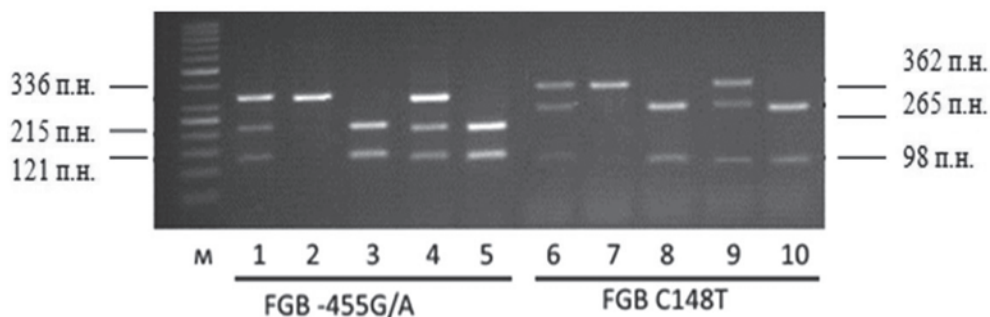


Рис. 1. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу гена *FGB*

Поліморфізм -455 G/A: генотип GG – 3, 5, генотип GA – 1, 4, генотип AA – 2; поліморфізм C148T: генотип CC – 8, 10, генотип CT – 6, 9, генотип TT – 7; М – маркер молекулярної маси

Частоти поліморфних варіантів гена *FGB* у досліджуваних групах перевіряли на відповідність закону Харді – Вайнберга. Статистичні розрахунки проводили з використанням стандартних пакетів програми Microsoft Excel 2010. Для оцінки достовірності кількісних показників визначали середню арифметичну величину та похибку середньої арифметичної величини ($M \pm m$). Достовірними вважали результати при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Частота поширення поліморфних варіантів у загальній групі пацієнток (рис. 2) не відрізнялася від популяційної вибірки, пред-

ставленої в online-базі «1000 геномів», та відповідала закону Харді – Вайнберга ($P > 0,05$).

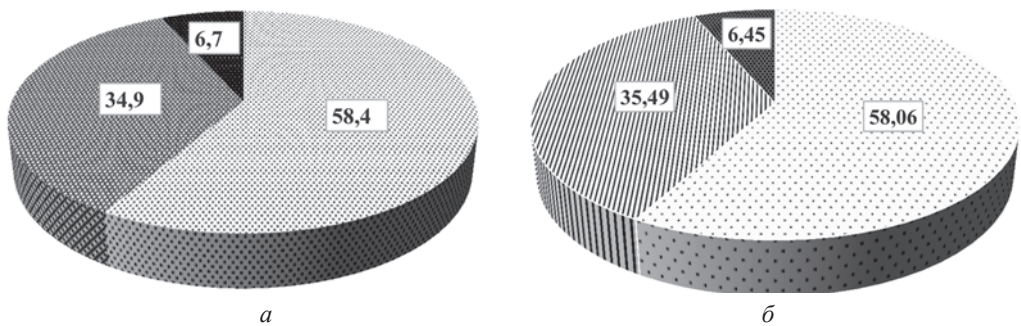


Рис. 2. Розподіл частот поліморфних варіантів C148T (а) та -455G/A (б) гена *FGB* у загальній групі:

■ – 148CC; ■ – 148CT; ■ – 148TT; ■ – 455GG; ■ – 455GA; ■ – 455AA

У більшості пацієнок загальної групи були поширені дві комбінації поліморфних варіантів 148CC/-455GG (58,4 %) та 148CT/-455GA (34,2 %), а комбінації генотипів 148CT/-455AA, 148TT/-455GG, 148TT/-455AA виявлено у незначній кількості хворих: 0,7; 0,7 і 6 % відповідно. При порівняльному аналізі I та II груп достовірної різниці за частотою виявлення генотипів і алелів за двома поліморфними варіантами гена *FGB* не спостерігалось (рис. 3).

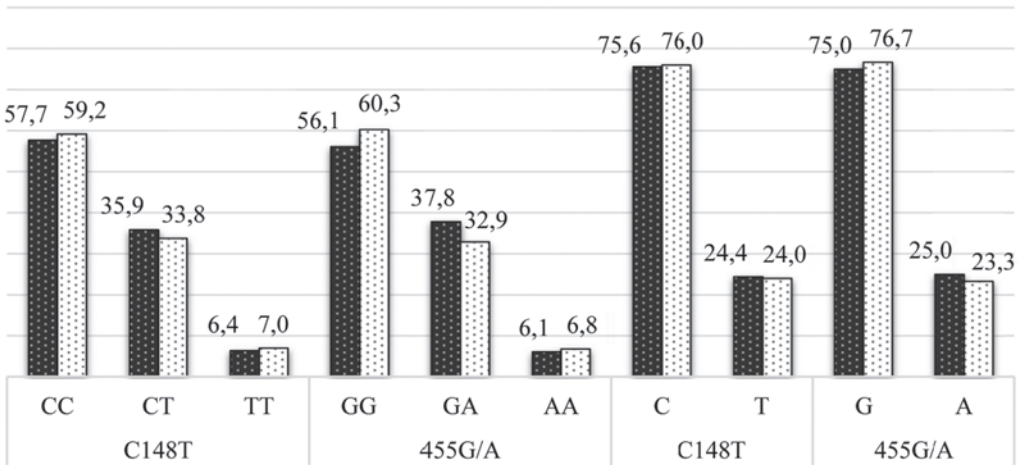


Рис. 3. Розподіл частот генотипів та алелів за поліморфними варіантами C148T і -455G/A гена *FGB* у групах порівняння

■ – група I; ■ – група II

На початку дослідження у 152 пацієнок визначали показники гемостазу. В загальній групі зміни рівня середнього показника фібриногену виявлено у 35 (23 %) жінок: гіпофібриногенемію (зниження рівня фібриногену ≤ 2 г/л) – у 22 (14,5 %), гіперфібриногенемію (підвищення рівня фібриногену ≥ 4 г/л) – у 13 (8,5 %), а у 117 (77 %) середній показник фібриногену був у межах норми (2–4 г/л). Серед обстежених обох груп, у яких відмічено дисфібриногенемію (зниження або підвищення середнього рівня фібриногену), не виявлено достовірної різниці її поширення (табл. 1), хоча в групі I переважала гіпофібриногенемія (12,22 %), на відміну від групи II (8,05 %). Але виявлені відмінності не були значущими.

Оскільки середній рівень фібриногену у пацієнок не був асоційований з жодним з досліджених генотипів або їх комбінацією за геном *FGB*, нами проведено

аналіз впливу генетичного поліморфізму з урахуванням виявлених порушень у системі гемостазу. У 83 (54,7 %) осіб відмічено порушення системи гемостазу, що проявлялись у різноспрямованих змінах середнього рівня показників протромбінового індексу, протромбінового часу, міжнародного нормалізованого співвідношення, активного часткового тромбoplastинового часу та тромбінового часу. У пацієнток з генотипом -455AA та гемостатичними порушеннями показник середнього рівня фібриногену був значно зниженим. При поліморфному варіанті 148TT та виявлених гемостатичних порушеннях середній рівень фібриногену також був зниженим, але недостовірно (табл. 2). Отже, нами виявлено вплив дослідженого поліморфного варіанта -455G/A за геном *FGB* на зниження рівня фібриногену у пацієнток з репродуктивними розладами, які супроводжувалися гіпокоагулянтними станами.

Таблиця 1. Поширення дисфібриногенемії серед пацієнток у клінічних групах

Група	Референтні значення, г/л	Кількість пацієнток, абс. од. (%)	Середній рівень фібриногену ($M \pm m$), г/л
I	≤ 2	11 (12,22)	$1,76 \pm 0,03$
	2–4	74 (82,22)	$2,60 \pm 0,07$
	≥ 4	5 (5,55)	$4,89 \pm 0,24$
II	≤ 2	7 (8,05)	$1,80 \pm 0,06$
	2–4	74 (85,05)	$2,75 \pm 0,09$
	≥ 4	6 (6,9)	$4,49 \pm 0,17$

Таблиця 2. Середній рівень фібриногену (г/л) у пацієнток з гемостатичними порушеннями (наявні/відсутні) залежно від поліморфних варіантів C148T та -455G/A за геном *FGB*

Гемостатичні порушення	%	$M \pm m$	%	$M \pm m$	%	$M \pm m$	P
		148CC			148CT		
Наявні	54,7	$2,75 \pm 0,11$	36,8	$2,85 \pm 0,20$	8,5	$2,53 \pm 0,30$	0,05
Відсутні	43,5	$2,69 \pm 0,14$	47,8	$2,78 \pm 0,50$	8,9	$3,25 \pm 0,40$	
		-455GG			-455GA		
Наявні	54,7	$2,78 \pm 0,12$	37,7	$2,84 \pm 0,10$	7,5	$2,31 \pm 0,20$	
Відсутні	43,5	$2,69 \pm 0,14$	47,8	$2,78 \pm 0,20$	8,69	$3,25 \pm 0,40$	0,01

Наступні розрахунки проведено для показників середнього рівня фібриногену залежно від виявлення гемостатичних порушень та комбінацій поліморфних варіантів -455G/A, C148T за геном *FGB* в групах порівняння (табл.3). В обстежених з гемостатичними порушеннями та комбінацією генотипів 148TT/-455AA показник середнього рівня фібриногену був достовірно нижчим, ніж у пацієнток без гемостатичних порушень ($P = 0,01$). Отже, у разі комбінації генотипів 148TT/-455AA за геном *FGB* у пацієнток з репродуктивними розладами спостерігаються порушення гемостазу, які проявляються у розвитку гіпокоагулянтних змін та супроводжуються зниженням показника фібриногену.

Досліджені нами поліморфні варіанти гена *FGB* у ряді досліджень було розглянуто як фактори ризику репродуктивних розладів [2, 4, 5, 8], а нами встановлено механізми реалізації цього несприятливого впливу за рахунок розвитку гіпокоагуляції, що характерно як для ранніх репродуктивних втрат, так і безпліддя. Знижений рівень фібриногену необхідно розглядати як несприятливий прогностичний чинник для цих груп пацієнток, особливо при генотипі -455AA та комбінації генотипів 148TT/-455AA за геном *FGB*. Необхідні подальші дослідження для з'ясування додаткових чинників, пов'язаних із збільшенням ризику гіпокоагуляції у жінок з репродуктивними розладами та розробки ряду профілактичних заходів.

Таблиця 3. Середній рівень фібриногену (г/л) у жінок з гемостатичними порушеннями (наявні/відсутні) залежно від комбінацій за дослідженими поліморфними варіантами гена *FGB*

Комбінація генотипів	Наявні		Відсутні	
	%	$M \pm m$	%	$M \pm m$
148CC/-455GG	53,8	$2,75 \pm 0,11$	43,5	$2,69 \pm 0,14$
148CC/-455GA	0,94	$2,4 \pm 0,1$	—	—
148CT/-455GA	36,8	$2,85 \pm 0,20$	47,8	$2,78 \pm 0,20$
148TT/-455GG	0,94	$4,3 \pm 0,1$	—	—
148TT/-455AA	7,5	$2,31 \pm 0,20$	8,7	$3,25 \pm 0,40$

Висновки. 1. Зміни рівня фібриногену спостерігали у 23 % пацієток з репродуктивними розладами: підвищений рівень (≥ 4 г/л) виявлено у 8,5 %, а знижений (≤ 2 г/л) – у 14,5 %. 2. У 54,7 % жінок з репродуктивними розладами відмічено гемостатичні розлади (різностямовані зміни показників активного часткового тромбопластинового часу, протромбінового часу та індексу, тромбінового часу). 3. Генотип -455AA та комбінація генотипів -455AA/148TT за геном *FGB* були асоційовані із зниженням рівня фібриногену у пацієток з репродуктивними розладами у разі гіпокоагулянтних змін у системі гемостазу. 4. Зниження рівня фібриногену є важливою ланкою гіпокоагулянтних змін системи гемостазу у жінок з репродуктивними розладами, тому при генотипі -455AA та комбінації генотипів -455AA/148 TT за геном *FGB* необхідне повторне визначення рівня фібриногену для раннього виявлення відхилень.

Список літератури

1. *Беременность* високого ризику / Под. ред. А. Д. Макариця, Ф. А. Червенака, В. О. Бицадзе. – М.: ООО «Изд-во «Мед. информац. агентство», 2015. – 920 с.

2. *Вовк І. Б., Вдовиченко Ю. П., Трохимович О. В.* та ін. Ранні репродуктивні втрати. – К.: СПД «Савин-Мишкін», 2016. – 253 с.

3. *Генетический паспорт* – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. Баранова В. С. – СПб: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.

4. *Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я України. 2014 рік* / За ред. О. Квіташвілі; МОЗ України, ДУ «УІСД МОЗ України». – К., 2015. – 460 с.

5. *Aung N., Kennedy H., Faed J. M., Brennan S. O.* Novel heterozygous Bbeta (c.1311T>A) mutation (Fibrinogen St Kilda) associated with recurrent pregnancy loss // *Pathology*. – 2015. – Vol. 47, N 6. – P. 583–607.

6. *Neerman-Arbez M., Casini A.* Clinical Consequences and Molecular Bases of Low Fibrinogen Levels // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – P. 192; doi:10.3390/ijms19010192.

7. *Paraboschi E. M., Duga S., Asselta R.* Fibrinogen as a Pleiotropic Protein Causing Human Diseases: The Mutational Burden of Aα, Bβ, and γ Chains // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 2711; doi:10.3390/ijms18122711.

8. *Rossokha Z. I., Kyrachenko S. P., Gorovenko N. G.* Diagnosis and treatment of hereditary thrombophilia in obstetric practice (Review of clinical guidelines and literature) // *J. Medical aspects of women's health*. – 2014. – Vol. 81, N 6. – P. 5–13.

9. *Torabi R., Zarei S., Zeraati H., Zarnan A. H.* Combination of Thrombophilic Gene Polymorphisms as a Cause of Increased the Risk of Recurrent Pregnancy Loss // *J. Reprod. Infertil.* – 2012. – Vol. 13, N 2. – P. 89–94.

1. *Beremennost' vysokogo riska* / Pod. red. A. D. Makacariya, F. A. Chervenaka, V. O. Bicadze. – М.: ООО «Izd-vo «Med. informac. agentstvo», 2015. – 920 s.

2. *Vovk I. B., Vdovichenko Yu. P., Trohimovich O. V.* та ін. Ranni reproduktivni vtrati. – К.: SPD «Savin-Mishkin», 2016. – 253 s.

3. *Geneticheskij pasport* – osnovaindividual'noj i prediktivnoj mediciny / Pod red. Baranova V. S. – SPb: Izd-vo N-L, 2009. – 528 s.

4. *Shchorichna dopovid' pro stan zdorov'ya naselennya, sanitarno-epidemichnu situaciyu ta rezul'tati diyal'nosti sistemi ohoroni zdorov'ya Ukraïni. 2014 rik* / Za red. O. Kvitashvili; MOZ Ukraïni, DU «UISD MOZ Ukraïni». – К., 2015. – 460 s.

10. World Health Organization [Electronic resource]: Global prevalence of infertility, infecundity and childlessness / Mode to access: <http://www.who.int/reproductive health/topics/infertility/burden/en/>.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ
ВАРИАНТОВ ГЕНА *FGB* (-455G/A, C148T) СО СРЕДНИМ
УРОВНЕМ ФИБРИНОГЕНА У ЖЕНЩИН
С РЕПРОДУКТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

З. И. Россоха, Л. П. Шейко, Н. Л. Медведева, Н. Г. Горovenko (Киев)

Фибриноген является важным коагуляционным фактором свёртывания крови. По его уровню оценивают состояние системы гемостаза у женщин с репродуктивными нарушениями. Нами выявлена ассоциация между полиморфными вариантами -455G/A (rs1800790) и C148T (rs1800787) по гену *FGB* и концентрацией фибриногена в плазме крови женщин с отягощённым ранними репродуктивными потерями или бесплодием анамнезом. Обследовано 177 пациенток, у которых изучали взаимосвязь проанализированных анамнестических и клинико-лабораторных данных и показателей гемостаза (в момент обращения) с полиморфными вариантами гена *FGB*. По результатам проведённого исследования дисфибриногемии наблюдали у 23 % обследованных: повышенный уровень фибриногена (≥ 4 г/л) обнаружен у 8,5 %, сниженный (≤ 2 г/л) – у 14,5 %. Генотип -455AA и комбинация генотипов -455AA/148TT по гену *FGB* были ассоциированы со снижением уровня фибриногена у женщин с гипокоагулянтными гемостатическими расстройствами.

Ключевые слова: фибриноген; ген *FGB*; полиморфные варианты; C148T; -455G/A; репродуктивные нарушения.

RESEARCH OF THE ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS
OF THE *FGB* GENE (-455G/A, C148T)
WITH AVERAGE LEVEL OF FIBRINOGEN
IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE DISORDERS

Z. I. Rossokha^{1,3}, L. P. Sheyko^{1,2}, N. L. Medvedieva, N. G. Gorovenko^{1,2} (Kyiv, Ukraine)

¹Department of Genetic Diagnostics State Institution «Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; ²Department of Medical and Laboratory Genetics Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education; ³State Institution «Reference-centre for molecular diagnostic of Public Health Ministry of Ukraine»

Fibrinogen is an important factor in blood coagulation. The evaluation of the hemostasis system in women with reproductive disorders is assessed according to fibrinogen level. The purpose of this work was to identify the association between polymorphic variants -455G/A (rs1800790) and C148T (rs1800787) in the *FGB* gene and the fibrinogen level in the blood plasma in women with aggravated early reproductive loss or infertility history. The research involved 177 patients. There were studied the relationship between anamnestic, clinical-laboratory data and hemostasis indicators (at the time of treatment) with polymorphic variants of the *FGB* gene. According to the results of the study, dysfibrinogenemia was observed in 23 % of the examined patients: increased fibrinogen level (≥ 4 g/l) – 8,5 % of patients, decreased fibrinogen level (≤ 2 g/l) – 14.5 %. The -455AA genotype and -455AA/148TT genotypes combination for the *FGB* gene were associated with a decreased level of fibrinogen in women with hypocoagulant hemostatic disorders.

Key words: fibrinogen; *FGB* gene; polymorphic variants; C148T; -455G/A; reproductive disorders.