

УДК: 5.57.575.; 5.57.577; 6.618.

**Н.П. Веропотвелян,
Ю.С. Погуляй, Л.О. Кодунов**

(г.Кривой Рог, Украина)

**ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОЛИМОРФНЫХ ГЕНОВ СИСТЕМЫ
HLA II КЛАССА, ФОЛАТНОГО ОБМЕНА,
ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ
У СУПРУЖЕСКИХ ПАР С ПРИВЫЧНЫМ
НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ**

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, система HLA, фолатный цикл, факторы свертываемости крови.

Резюме. В работе изложены основные теоретические аспекты молекулярно-генетических причин невынашивания беременности, а также результаты собственных исследований по распределению полиморфных генов системы HLA II класса, фолатного обмена, факторов свертываемости крови у супружеских пар с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).

Нами было проведено генотипирование по системе HLA II класса 69 парам с ПНБ; определение полиморфных вариантов гена MTHFR – 192 женщинам с ПНБ и 132 образцам продуктов концепции (материал замерших беременностей); исследование на наличие мутаций в генах II и V факторов свертываемости крови проведено 181 женщине с ПНБ.

Оценка результатов исследований показала, что количество значимых совпадений (3-6) по системе HLA II класса составило 21,8%. Проанализировав распространение аллелей повышенного риска невынашивания беременности, развития антифосфолипидного синдрома (АФС), гестозов и эклампсий было установлено, что наличие хотя бы одного из факторов имело место в 67 случаях из 69 (98%), а два и более фактора одновременно имело 31,9% пар.

Распространенность мутантного аллеля гена MTHFR у женщин с ПНБ составила 58%; в структуре материала замерших беременностей – 63,6%; наибольшая частота встречаемости мутантного аллеля отмечена в группе трисомий по 16 и 18 хромосоме. Суммарная частота распространения мутаций в генах II и V факторов составила 6%, что не превышает общепопуляционный показатель.

ВВЕДЕНИЕ

Классически ПНБ принято называть два или более самопроизвольных прерывания беременности (в сроке от зачатия до 37 недель), однако многие практические врачи подразумевают под этим термином невынашивание более одной беременности [2,3]. Среди причин гибели эмбриона принято выделять социально-демографические и медицинские причины. В последней группе различают факторы, возникшие со стороны эмбриона (генные и хромосомные аномалии), а также со стороны материнского/отцовского организма – анатомические, эндокринные, инфекционные, генетические, иммунные [4]. В значительной доле случаев самопроизвольное прерывание беременности, особенно на ранних сроках, имеет повторяющийся характер, что позволяет пред-

положить наличие генетических факторов, обуславливающих потерю беременности. В 80% случаев иммунологические факторы являются причиной невынашивания беременности неясной этиологии [4]. Предполагается, что репродуктивные потери могут быть следствием нарушенной экспрессии иммунологических факторов во время беременности. Тканевая совместимость супругов и носительство определенных аллелей комплекса MHC (major histocompatibility complex, HLA (Human Leukocyte Antigen)) II класса являются одной из основных причин запуска иммунного механизма прерывания беременности. Главный комплекс гистосовместимости делится на 3 класса (I,II,III). К антигенам HLA I класса относят локусы HLA-A,HLA-B,HLA-C они находятся на каждой ядерной клетке, кроме ворсинчатого

трофобласта. К антигенам HLA I класса относят также недавно открытые неклассические молекулы HLA-G, HLA-E, HLA-F (псевдогены, гены транскрипции) (локус HLA-G экспрессируется на трофобласте) [4,5].

Молекулы HLA II представлены основными подклассами – DR, DQ и DP.

Регион III класса генов принимает участие в процессах воспаления (комплемент, пропердин, ФНО и др.). Мутации, рекомбинации и конверсия генов создают многообразие аллельных форм и определяют полиморфизм антигенов MHC (число возможных комбинаций составляет 3×10^6). С полиморфизмом антигенов MHC связано такое явление, как генетический контроль иммунного ответа, и они сами являются сильными антигенами [5].

Эмбрион (зигота), возникающий в результате слияния генетического материала двух гамет, в значительной степени отличается генетически от материнского организма и обладает антигенами отцовского происхождения. Считается, что избежать отторжения эмбриону помогает абсолютная неиммуногенность клеток трофобласта [6].

Антигенный состав трофобласта в основном представлен антигенами II класса гистосовместимости (HLA DRB1, DQA1, DQB1), так как большинство антигенов I класса (HLA A, HLA B, HLA C) не экспрессируются на поверхности синцитиотрофобласта. Эта «чужеродность» является нормальным физиологическим явлением, запускающим особые иммунные реакции, направленные на сохранение беременности [7]. Чем больше степень различия между индивидами по HLA-антигенам, особенно класса HLA-DR, тем интенсивнее протекает реакция активации пролиферации клеток [6,7].

Проллиферируя, клетки трофобласта внедряются в кровотоки матери, происходит контакт антигенов плода с Т-лимфоцитами матери. Далее осуществляется выработка специальных «защитных» антиотцовских аллоантител (APCA – antipaternal cytotoxic antibodies, Ab2-anti-anti HLA antibodies, MLR-Bf – mixed lymphocyte reaction blocking factor), которые покрывают поверхность клеток трофобласта и играют важную роль в успешном развитии беременности [7]. Также, при стимуляции антигенами клеток трофобласта происходит ингибирование цитотоксичности NK-клеток (естественных киллеров) децидуальной оболочки, что необходимо для имплантации эмбриона и развития васкуляризации плаценты [5].

В супружеских парах с ПНБ неясного генеза было отмечено, что одинаковые антигены в HLA-генотипах встречаются чаще, по сравнению с теми парами, где беременность развивается

нормально [1]. Большое число совпадающих антигенов HLA II класса у супругов приводит к тому, что не происходит достаточной иммуностимуляции организма матери, и она не вырабатывает необходимого количества аллоантител к антигенам эмбриона [1,6]. Возможно также развитие аутоиммунной реакции матери, приводящей к выработке антифосфолипидных, антинуклеарных, антитиреоидных и других антител, повреждающих плаценту [7].

Общепринятыми критериями риска невынашивания беременности при генетическом тестировании пар по генам MHC II класса являются :

- наличие 3 и более общих антигенов системы главного комплекса гистосовместимости – HLA II класса;
- наличие аллелей, генотипов, гаплотипов «повышенного риска»;
- носительство локусов DR4, DR7, DRw53 DRB1 системы HLA [1,3,4].

Другими факторами, обуславливающими невынашивание беременности, является склонность к более активному свертыванию крови у женщины (тромбофилия). Возможными причинами возникновения тромбофилических состояний являются следующие: повышение уровня гомоцистеина в крови (обуславливается мутациями генов системы фолатного цикла MTHFR, MTRR, MTR, цистатион-β-синтазы); дефицит антитромбина III; дефицит протеина С3. Дефицит протеина S; полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена, PAI, мутация гена протромбина (FII фактора свертываемости крови), мутация гена F V Лейден фактора свертываемости крови [5].

Цель и задачи исследования

Изучить вклад молекулярно-генетических факторов в механизмах ранних репродуктивных потерь у супружеских пар с ПНБ:

- определить долю супружеских пар, имеющих одинаковые аллели в одном, двух или трех локусах HLA II класса (DRB1, DQA1, DQB1) в группе с ПНБ;
- определить частоту аллелей гена MTHFR у женщин с ПНБ и среди продуктов концепции неразвивающихся беременностей;
- определить частоту мутаций в генах факторов F2, F5 системы свертывания крови;

Материалы и методы

Генетическое тестирование (выявление полиморфных вариантов по мутации С677Т гена MTHFR, мутаций в генах F2, F5 системы свертывания крови и генотипирование главного комплекса гистосовместимости по генам II класса

HLA DR, HLA DQA1, HLA DQB1) было проведено 192 женщинам и 69 (средний возраст 30 ± 2 года, среднее количество СА – 3 ± 1) супружеским парам с привычным невынашиванием беременности, а также 132 образцам продуктов концепции неразвивающихся беременностей в сроке 6 ± 2 недель. Исследования во всех случаях проводились методом полимеразной цепной реакции с использованием коммерческих наборов фирмы «Изоген» (Москва) и последующей детекцией путем электрофореза в 2 % агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе распределения аллелей HLA в парах с ПНБ мы получили следующие результаты: частота значимых совпадений (3 и более) составила 21,8%; частота совпадений по двум аллелям составила 27,8%; 98% пар с ПНБ имеют аллели «повышенного риска» Hb, развития АФС, гестозов/эклампсий; наибольшая частота распространения отдельных аллелей локусов системы MHC II наблюдалась: у женщин – DQA1 0102, 0501; DQB1 0201, 0602; DRw52, DRw53; у мужчин – DQA1 0102, 0103, 0501; DQB10201, 0601; DRw15, DRw52.

При анализе распределения полиморфных вариантов генов MTHFR, протромбина, лейденского фактора отмечено следующее:

1. В группе женщин с ПНБ распространенность мутантного аллеля гена MTHFR составила 58%; генов F2 и F5 – 6 %.
2. В группе материала замерших беременностей распространенность мутантного аллеля гена MTHFR составила 63,6%.
3. Наибольшая распространенность мутантного аллеля гена MTHFR в группе женщин, имевших замершую беременность с хромосомной аномалией продукта концепции, наблюдалась в группе трисомии по 18-й хромосоме (71,4%) и 16-й (81%) против 64% в группе с нормальным кариотипом.
4. Наибольшая распространенность мутантного аллеля гена MTHFR в группе матери-

ла замерших беременностей наблюдалась в группе 18-й и 16-й хромосомы (100 и 85,7% соответственно).

Выводы

Проведенные нами исследования показали некоторые отличия в оценке основных молекулярно-генетических факторов, которые предложены как провокаторы невынашивания беременности:

- генотипирование по системе HLA не выявило существенных различий с данными, полученными другими авторами. Однако, согласно результатам нашего исследования значимыми также необходимо считать уже случаи совпадения по 2 аллелям антигенов II класса гистосовместимости (DRB1, DQA1, DQB1);
- частота мутаций в генах F2 и F5 системы свертывания крови в группе женщин с ПНБ не превысила среднюю популяционную (6%);
- согласно полученных нами результатов в отношении ассоциации нарушений фолатного обмена (в частности гена MTHFR) и развития хромосомной патологии (в частности синдрома Дауна) было отмечено, что распространенность мутантного аллеля была выше как среди женщин с ПНБ, так и в материале продукта концепции в случае трисомии по 18-й и 16-й хромосомам в замершей беременности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическое тестирование по данным параметрам должно быть комплексным и требует разработки программы подсчета риска по генетическим маркерам, предрасполагающим к нарушению репродуктивной функции. Результаты молекулярно-генетического тестирования целесообразно использовать при проведении медико-генетического консультирования, пре-концепционной профилактики и планировании беременности, в выборе оптимальной тактики обследования и лечения женщин с невынашиванием при наступлении последующей беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айрапетов Д.Ю. Аллоиммунный механизм привычного невынашивания беременности / Д.Ю. Айрапетов, И.М. Ордянец, О.С. Побединская // Рус. Мед. Журнал 2010;1:11:3-6.
2. Бескорвайная Т.С. Влияние аллелей полиморфных генов системы HLA II класса, фолатного обмена, гемостаза и детоксикации на репродукцию человека [Электронный ресурс]: Диссертация кандидата биологических наук : 03.00.15.
3. Бескорвайная Т.С. Роль антигенов II класса главного комплекса гистосовместимости в привычном невынашивании беременности / Т.С. Бескорвайная, Н. В. Полтавец, Е. А. Близнач [и др.] // Мед. генет. 2005; 2:543-546.
4. Ковалевская Т.С. Генетические аспекты невынашивания беременности / Т.С. Ковалевская, Н.Н. Вассерман, С.М. Тверская, А.В. Поляков // Мед. генет. -2003; 2: 11: 480-484.3
5. Сидельникова В.М. Профилактика и лечение невынашивания беременности-М.:Медпресс-информ.- 2011.
6. Pandey M.K. Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy / M.K. Pandey, V. Saxena, S. Agrawal // BMC Pregnancy Childbirth 2003 Feb; 19: 3(1).
7. Steck T. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 haplotypes in aborted fetuses and couples with recurrent spontaneous abortions / T. Steck, van der Ven K., J Kwak. [et al.] // J Reprod Immunol. 1995; 29: 95-104.29.

**ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ПОЛІМОРФНИХ
ГЕНІВ СИСТЕМИ HLA II КЛАСУ, ФОЛАТНОГО
ОБМІНУ, ФАКТОРІВ ЗГОРТАННЯ КРОВІ
У СУПРУЖНИХ ПАР ЗІ ЗВИЧНИМ
НЕВИНОШУВАННЯМ ВАГІТНОСТІ**

М.П. Веропотвелян, Ю.С. Погуляй, Л.О. Кодунов

Резюме. У роботі викладені основні теоретичні аспекти молекулярно-генетичних причин невиношування вагітності, а також результати власних досліджень по розподілу поліморфних генів системи HLA II класу, фолатного обміну, факторів згортання крові у подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності. Нами було проведено генотипування по системі HLA II класу 69 парам з ЗНВ; визначення поліморфних варіантів гену MTHFR було проведено 192 жінкам з ЗНВ і 132 зразкам продуктів концепції (матеріал замерлих вагітностей); дослідження на наявність мутацій в генах II і V факторів згортання крові проведено 181 жінці з ЗНВ. Оцінка результатів проведених досліджень показала, що кількість значимих співпадань (3-6) по системі HLA II класу склала 21,8%. Проаналізувавши розповсюдження алелей підвищеного ризику невиношування вагітності, розвитку АФС, гестозів та еклампсій було встановлено, що наявність хоча б одного із факторів мало місце в 67 випадках із 69 (98%), а два і більше факторів одночасно мали 31,9% пар.

Розповсюдженість мутантного алеля гену MTHFR у жінок з ЗНВ склала 58%; в структурі матеріалу замерлих вагітностей – 63,6%; найбільша частота зустрічаємості мутантного алелю відмічена в групі трисомій по 16 і 18 хромосомам. Сумарна частота розповсюдження мутацій в генах II і V факторів згортання крові склала 6%, що не перевищує загальнопопуляційного.

Ключові слова: звичне невиношування вагітності, система HLA, фолатний цикл, фактори згортання крові

**FEATURES OF DISTRIBUTION OF POLYMORPHIC
GENES OF SYSTEM HLA II CLASS, FOLIC
METABOLISM, FACTORS OF BLOOD
COAGULATION AT MARRIED COUPLES WITH
HABITUAL ABORTED PREGNANCY**

M. P. Veropotveljan, J.S. Poguljaj, L.O. Kodunov

Summary. In this article the basic theoretical aspects of molecular genetic causes of habitual pregnancy loss (HPL) and the results of our research on the allocation of polymorphic genes of HLA II class, folat metabolism, coagulation factors in couples with habitual pregnancy loss are described. We have performed genotyping of HLA II class system in 69 couples with HPL; 192 women with HPL were screened for polymorphic variants of MTHFR gene and 132 samples of material of non-developing pregnancies, research on the presence of mutations in genes II and V of the coagulation factors held 181 women with HPL. The assessment of the results of the studies showed that the number of meaningful coincidence (3-6) in the system HLA class II was obtained in 21.8% of the cases. We analyzed the allocation of the alleles which increased the risk of the miscarriage and leads to development of APS, preeclampsy and eclampsies: in 67 cases (98%) was found at least one of the factors; two or more factors simultaneously was in 31.9% of couples. 58% of women with HPL had mutant alleles of the gene MTHFR; in the structure of the material non-developing pregnancies it was 63.6%; highest frequency of the mention mutant alleles has been in the group of 16 and 18 trisomies.

Total frequency of mutations in genes II and V of coagulation factors was in 6%, that is not exceeding in general population.

Key words: habitual pregnancy loss, HLA system, folat cycle, coagulation factors.

Рецензент: Професор кафедри пропедевтики дитячих хвороб
Буковинського державного медичного університету
д.м.н., професор Годованець Ю.Д.