

УДК 575.224.22

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТОВ С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОТЕРЯМИ

© 2020 г. Е. В. Машкина¹, *, К. А. Коваленко¹, А. В. Миктадова¹, М. А. Шкурят¹

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: lenmash@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2019 г.

После доработки 20.04.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

В результате исследования определены частоты генотипов и аллелей по полиморфным вариантам генов, контролирующих уровень активных форм кислорода (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX4*) и функционирование эндотелия (*EDN1*, *NOS3*) у женщин с различным характером течения первого триместра беременности. Выявлена ассоциация аллеля 7958A гена *SOD1* с увеличением риска спонтанной потери беременности в первом триместре (OR = 2.17, 95% CI 1.14–4.13). Женщины с генотипом *AsnAsn* гена *EDN1* имеют повышенный относительный риск остановки развития эмбриона в первом триместре (OR = 7.18, 95% CI 1.4–36.75). Для аллеля –786T гена *NOS3* выявлена ассоциация с повышенным риском потери беременности в первом триместре (OR = 1.68, 95% CI 1.04–2.72). Выявлены значимые модели взаимодействия исследуемых генов, изменяющие риск невынашивания беременности в первом триместре.

Ключевые слова: полиморфизм генов, антиоксиданты, невынашивание беременности, межгенные взаимодействия, *SOD1*, *SOD2*, *NOS3*, *EDN1*.

DOI: 10.31857/S001667582003011X

Анеуплоидия эмбриональных клеток является основной генетической причиной невынашивания беременности на ранних сроках. Однако большая часть абортусов первого триместра имеет нормальный кариотип и этиология потери беременности остается не идентифицированной. Анализ генетического материала более 3000 абортусов методом хромосомного микроматричного анализа показал, что клинически значимые варианты полиморфизма числа tandemных повторов характерны для 1.6% абортусов, тогда как частота редких вариантов неопределенного клинического значения колебалась от 1 до 40% случаев [1–6]. Таким образом, на сегодняшний день причина эуплоидных выкидышей полностью не определена и продолжает изучаться как путем поиска новых генетических маркеров, так и путем анализа аллельных вариантов генов-кандидатов.

Немаловажную роль в генезе ранних репродуктивных потерь играет влияние системы редокс-гомеостаза, одним из основных компонентов которой является сеть ферментов антиоксидантной системы. Активные формы кислорода (АФК) в физиологических концентрациях обеспечивают протекание важнейших процессов, таких как транскрипция генов, деление клетки, детоксикация ксенобиотиков, реакции апоптоза и др. Однако избыточная про-

дукция свободных радикалов оказывает повреждающее воздействие на различные компоненты клетки, вызывая перекисное окисление липидов, окислительные модификации белков, повреждение в молекуле ДНК.

Активные формы кислорода и антиоксиданты являются одними из ключевых факторов, определяющих физиологический метаболизм женской репродуктивной системы; баланс между АФК и антиоксидантами значительно влияет на изменения эндометрия в зависимости от фазы цикла, на фолликулогенез, овуляцию, оплодотворение, рост плаценты, эмбриогенез и имплантацию [7, 8]. Уровень АФК в процессе эмбриогенеза функционально сопряжен с процессами формирования и функционирования плаценты, обеспечивающей кровоснабжение зародышевых клеток. До 12 нед. беременности плацента человека формируется в условиях гипоксии. В конце первого триместра вторая волна инвазии трофобласта приводит к существенному увеличению концентрации плацентарного кислорода, что усиливает окислительно-восстановительные реакции в клетках трофобласта. То есть формирование плацентарного кровообращения связано с резким увеличением уровня кислорода в клетках плаценты [9]. Изменения концентрации кислорода модулируют уровень АФК, кото-

рые могут действовать как сигнальные молекулы. Это особенно важно для тканей, требующих больших затрат энергии и содержащих большое число митохондрий, в том числе плаценты [10]. По мере развития беременности и метаболических потребностей растущего плода наблюдаются увеличение числа плацентарных митохондрий и активация их функционирования. Это способствует увеличению уровня АФК [11]. Таким образом, повышение уровня АФК в процессе беременности является физиологически обоснованным процессом, однако требует строго контроля со стороны системы антиоксидантов.

Совокупность ферментативных и низкомолекулярных антиоксидантов контролирует интенсивность образования в клетке высокорепактивных свободных радикалов кислорода. Супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPX) являются тремя важнейшими антиоксидантными ферментами. Супероксиддисмутаза катализирует реакцию дисмутации супероксиданиона с образованием пероксида водорода. У млекопитающих известны три формы SOD: цитозольная (Cu/Zn-SOD, SOD1), митохондриальная (Mn-SOD, SOD2) и внеклеточная (SOD3). Фермент SOD1 локализуется в ядре, цитоплазме и митохондриях. SOD2 функционирует в митохондриях. Внеклеточная супероксиддисмутаза SOD3, например в кровеносных сосудах, связана с поверхностью эндотелиальных клеток и внеклеточным матриксом [12].

Образовавшаяся в результате реакции дисмутации перекись водорода может быть инактивирована до воды каталазой или глутатионпероксидазой. GPX присутствует как в митохондриях, так и в цитоплазме, тогда как каталаза обнаруживается только в пероксисомах.

Изменение активности и/или уровня антиоксидантных ферментов как в меньшую, так и в большую сторону оказывает негативное воздействие на процессы эмбриогенеза. Показано, что сверхэкспрессия Cu/Zn-SOD нарушает процессы слияния и дифференцировки клеток трофобласта, что сопровождается снижением уровня таких соединений как хорионический гормон человека, плацентарный лактоген, а также гормона роста плаценты [13].

Как в реакциях окислительного стресса, так и в механизмах антиоксидантной защиты клетки от действия АФК непосредственное участие может принимать оксид азота. Оксид азота является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. В организме NO синтезируется из аминокислоты L-аргинин в ходе реакции, катализируемой NO-синтазой (NOS). Известны три изоформы NOS: NOS1 – нейрональная (nNOS);

NOS2 – индуцибельная, или макрофагальная (iNOS); NOS3 – эндотелиальная (eNOS). Во время беременности NOS3 влияет на имплантацию, децидуализацию, регуляцию кровотока в плаценте. В оптимальной концентрации фермент важен для стимуляции процессов внутриутробного развития; в то же время отклонения его концентрации приводят к нарушениям в развитии эмбриона [14–16].

Большую роль в регуляции гемодинамических процессов играет эндотелин 1. Эндотелин 1 стимулирует выработку вазодилататоров и факторов роста, в том числе и NO, обладает вазоконстрикторным действием, участвует в регуляции сосудистого тонуса [17, 18]. Существуют различные механизмы, с участием которых эндотелин 1 оказывает свой эффект, такие как индукция воспаления и окислительного стресса, увеличение выработки факторов роста, синтез коллагена и внеклеточного матрикса и стимуляция пролиферации гладкомышечных клеток. Эндотелин 1 способен усиливать сосудосуживающие эффекты других нейрогуморальных и эндокринных факторов.

Генетически обусловленные изменения в уровне и/или активности антиоксидантов и белков системы гемостаза являются потенциальными причинами нарушения репродуктивной функции человека. Полиморфные варианты генов антиоксидантов в результате экспрессии изоформ белков оказывают влияние на широкий спектр метаболических процессов и риск развития патологических состояний. Данные литературы об ассоциации аллельных вариантов генов антиоксидантов с репродуктивными потерями в первом триместре беременности немногочисленны и противоречивы.

Целью данной работы было исследование ассоциации полиморфных вариантов генов, контролирующих уровень активных форм кислорода (SOD1, SOD2, CAT, GPX4) и функционирование эндотелия (EDN1, NOS3), с невынашиванием беременности в первом триместре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови 127 женщин с невынашиванием беременности в первом триместре (средний возраст 29 лет). Среди них – 58 женщин с неразвивающейся беременностью и 53 женщины со спонтанным абортом на сроке 5–10 нед. гестации. В контрольную группу вошли 125 женщин (средний возраст 30 лет) с физиологически протекающей беременностью, у которых в анамнезе отсутствовали спонтанный аборт и/или неразвивающаяся беременность. Все женщины подписали письменное информированное согласие об участии в исследовании. Исследование

Таблица 1. Частота аллелей и генотипов (абс. (%)) по полиморфным вариантам генов супероксиддисмутазы в клетках крови женщин

Генотип, аллель	Контроль	Невынашивание беременности			
		СА	$\chi^2 (p)$	НБ	$\chi^2 (p)$
<i>7958G>A</i> , ген <i>SOD1</i>					
<i>GG</i>	102 (82.3)	35 (66.0)	5.64 (0.06)	46 (79.3)	1.45 (0.49)
<i>GA</i>	20 (16.1)	16 (30.2)		12 (20.7)	
<i>AA</i>	2 (1.6)	2 (3.8)		0	
Аллель <i>7958A</i>	0.097	0.189	5.76 (0.02)	0.103	0.04 (0.84)
<i>Ala16Val (47C>T)</i> , ген <i>SOD2</i>					
<i>AlaAla</i>	26 (20.8)	14 (26.4)	0.7 (0.7)	15 (25.9)	0.84 (0.66)
<i>AlaVal</i>	60 (48.0)	23 (43.4)		28 (48.3)	
<i>ValVal</i>	39 (31.2)	16 (30.2)		15 (25.9)	
Аллель <i>16Val</i>	0.552	0.519	0.33 (0.57)	0.5	0.86 (0.35)

Примечание. СА – спонтанный аборт; НБ – неразвивающаяся беременность; χ^2 – сравнение частот генотипов и аллелей с контролем.

одобрено комитетом по биоэтике Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета.

Критериями исключения из исследования были ранее диагностированные артериальная гипертензия, диабет, заболевания щитовидной железы и аутоиммунная патология, а также инфекционные заболевания во время беременности. Кроме того, были исключены женщины с аномалиями матки и синдромом поликистозных яичников. В сравниваемых группах отсутствовали женщины с экзогенными факторами риска – злоупотребление алкоголем, контакт с вредными факторами производства (электромагнитное излучение, шум, вибрация, химическое производство).

ДНК из клеток крови выделяли термокоагуляционным методом с использованием реагента “ДНК-экспресс-кровь” (Литех, Россия). Аллельные варианты *7958G>A* (rs4998557) гена *SOD1*, *47C>T* (*Ala16Val*) (rs4880) гена *SOD2*, *-262C>T* (rs1001179) гена *CAT*, *718C>T* (rs713041) гена *GPX4*, *5665G>T* (*Lys198Asn*) (rs5370) гена *EDN1*, *-786T>C* (rs2070744) гена *NOS3* исследовали с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия). Анализ основан на проведении реакций амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3%-ном агарозном геле.

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга определяли с использованием Hardy–Weinberg equilibrium calculator в программе www.oege.org/software/Hardy-Weinberg [19]. Оценку различий в распределении аллельных вариантов генов в обследованных

группах осуществляли по критерию χ^2 . О риске развития невынашивания беременности судили по отношению шансов (odds ratio – OR). OR указан с 95%-ным доверительным интервалом (CI).

Для анализа межгенных взаимодействий использовали биоинформатический подход – Multifactor Dimensionality Reduction (программа MDR, v.1.1.0 www.epistasis.org/mdr.html) для моделирования геномных взаимодействий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования частот генотипов и аллелей по полиморфным вариантам генов супероксиддисмутазы *SOD1* и *SOD2* среди женщин европеоидной расы с нарушением репродуктивной функции представлены в табл. 1. Распределение частот генотипов и аллелей в лейкоцитах периферической крови по исследованным вариантам аллелей в трех группах женщин соответствует равновесию Харди–Вайнберга.

По полиморфизму *7958G>A* (rs4998557) гена *SOD1* в исследуемых группах женщин преобладают гомозиготы по аллелю *7958G*. Доля гетерозигот по исследуемому аллельному варианту гена *SOD1* колеблется от 16 до 30% (табл. 1). Среди женщин со спонтанным прерыванием беременности и неразвивающейся беременностью в первом триместре характер распределения частот генотипов по полиморфизму *7958G>A* соответствует контрольной группе.

Частота аллеля *7958A* в контрольной группе составила 0.097. В группе женщин со спонтанным прерыванием беременности данный показатель составил 0.189, что статистически значимо выше

Таблица 2. Частота аллелей и генотипов (абс. (%)) по полиморфным вариантам генов *CAT* и *GPX4* в клетках крови женщин

Генотип, аллель	Контроль	Невынашивание беременности			
		СА	$\chi^2 (p)$	НБ	$\chi^2 (p)$
<i>-262C>T</i> , ген <i>CAT</i>					
<i>CC</i>	87 (69.6)	35 (66.0)	1.64 (0.44)	32 (56.1)	3.26 (0.2)
<i>CT</i>	34 (27.2)	14 (26.4)		23 (40.4)	
<i>TT</i>	4 (3.2)	4 (7.5)		2 (3.5)	
Аллель <i>-262T</i>	0.168	0.208	0.79 (0.37)	0.237	2.42 (0.12)
<i>718C>T</i> , ген <i>GPX4</i>					
<i>CC</i>	46 (37.1)	17 (32.1)	1.96 (0.38)	16 (28.1)	1.66 (0.44)
<i>CT</i>	62 (50.0)	32 (60.4)		31 (54.4)	
<i>TT</i>	16 (12.9)	4 (7.5)		10 (17.5)	
PXB (<i>p</i>)	>0.05	<0.05		>0.05	
Аллель <i>718T</i>	0.379	0.377	0 (0.98)	0.447	1.52 (0.22)

Примечание. СА – спонтанный аборт; НБ – неразвивающаяся беременность; χ^2 – сравнение частот генотипов и аллелей с контролем; PXB – равновесие Харди–Вайнберга.

по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Выявлена ассоциация аллеля *7958A* гена *SOD1* с увеличением риска спонтанной потери беременности в первом триместре (OR = 2.17, 95% CI 1.14–4.13). Для аллеля *7958G* гена *SOD1* выявлена ассоциация со снижением риска потери беременности в первом триместре (OR = 0.46, 95% CI 0.24–0.88).

В контрольной группе преобладают гетерозиготы по полиморфизму *Ala16Val* гена *SOD2*. Доля гомозигот по аллелю *16Val* гена *SOD2* составляет 31.2%. Среди женщин со спонтанным абортom и неразвивающейся беременностью в первом триместре характер распределения частот генотипов и аллелей по полиморфизму *Ala16Val* гена *SOD2* соответствует контролю (табл. 1).

Результаты исследования частот генотипов и аллелей по полиморфному варианту *-262C>T* гена *CAT* представлены в табл. 2. Распределение частот генотипов и аллелей по исследованному полиморфизму в лейкоцитах периферической крови женщин трех групп соответствует равновесию Харди–Вайнберга. Во всех исследуемых группах преобладают гомозиготные носители по аллелю *-262C* гена *CAT*. Частота аллеля *-262T* в контрольной группе составила 0.168. Среди женщин с прерыванием беременности в первом триместре частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *-262C>T* гена *CAT* не отличаются от контрольной группы.

По полиморфизму *718C>T* гена *GPX4* во всех трех группах преобладают женщины с генотипом *718CT* (табл. 2). Доля гомозигот по аллелю *718T* гена *GPX4* составляет от 7.5 до 17.5%. Среди жен-

щин со спонтанным абортom и неразвивающейся беременностью в первом триместре характер распределения частот генотипов и аллелей по полиморфизму *718C>T* гена *GPX4* не отличается от контрольной группы (табл. 2). Однако в группе женщин со спонтанным прерыванием беременности распределение частот генотипов не соответствует равновесию Харди–Вайнберга.

По полиморфизму *Lys198Asn* гена *EDN1* в исследуемых группах женщин преобладают гомозиготные носители по аллелю *Lys198*. Доля гетерозиготных носителей по исследуемому аллельному варианту гена *EDN1* колеблется от 17.5 до 26% (табл. 3). Среди женщин с неразвивающейся беременностью в анамнезе равновесие Харди–Вайнберга по частотам генотипов не соблюдается, при этом доля гомозигот по аллелю *198Asn* гена *EDN1* в 6 раз выше по сравнению с контролем и в 2.8 раза выше по сравнению с группой женщин со спонтанным абортom в анамнезе (табл. 3). Распределение частот генотипов по полиморфизму *Lys198Asn* гена *EDN1* среди женщин с неразвивающейся беременностью статистически значимо отличается от контрольной группы. Женщины с генотипом *AsnAsn* гена *EDN1* имеют повышенный относительный риск остановки развития эмбриона в первом триместре (OR = 7.18, 95% CI 1.4–36.75).

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *-786T>C* гена *NOS3* в лейкоцитах периферической крови женщин трех групп соответствует равновесию Харди–Вайнберга. В контрольной группе преобладают гетерозиготные носители по полиморфизму *-786T>C* гена *NOS3*

Таблица 3. Частота аллелей и генотипов (абс. (%)) по полиморфным вариантам генов *EDN1* и *NOS3* в клетках крови женщин

Генотип, аллель	Контроль	Невынашивание беременности			
		СА	χ^2 (p)	НБ	χ^2 (p)
<i>Lys198Asn</i> , ген <i>EDN1</i>					
<i>LysLys</i>	92 (74.2)	37 (69.8)	0.94 (0.63)	41 (71.9)	7.83 (0.02)
<i>LysAsn</i>	30 (24.2)	14 (26.4)		10 (17.5)	
<i>AsnAsn</i>	2 (1.6)	2 (3.8)		6 (10.5)	
РХВ (p)	>0.05	>0.05		<0.05	
Аллель <i>198Asn</i>	0.137	0.17	0.63 (0.43)	0.193	1.87 (0.17)
–786T>C, ген <i>NOS3</i>					
<i>TT</i>	42 (33.9)	28 (52.8)	5.6 (0.06)	25 (43.1)	1.8 (0.41)
<i>TC</i>	57 (46.0)	17 (32.1)		21 (36.2)	
<i>CC</i>	25 (20.2)	8 (15.1)		12 (20.7)	
Аллель –786C	0.431	0.311	4.48 (0.03)	0.388	0.62 (0.43)

Примечание. СА – спонтанный аборт; НБ – неразвивающаяся беременность; χ^2 – сравнение частот генотипов и аллелей с контролем; РХВ – равновесие Харди–Вайнберга.

(46%). Среди женщин со спонтанным абортом и неразвивающейся беременностью выявлено увеличение доли гомозигот по аллелю –786T (52.8 и 43.1% соответственно) (табл. 3).

Частота аллеля –786C в контрольной группе составила 0.431. В группе женщин со спонтанным прерыванием беременности данный показатель составил 0.311, что статистически значимо ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Выявлена ассоциация аллеля –786C гена *NOS3* с уменьшением риска спонтанной потери беременности в первом триместре (OR = 0.6, 95% CI 0.37–0.96). Для аллеля –786T гена *NOS3* выявлена ассоциация с повышенным риском потери беременности в первом триместре (OR = 1.68, 95% CI 1.04–2.72).

Физиологическое течение беременности требует согласованной работы генов нескольких функциональных групп, в том числе генов антиоксидантов, генов, контролирующих работу эндотелия сосудов. Сочетанное присутствие нескольких аллельных вариантов генов, кодирующих функционально связанные белковые молекулы, может приводить к формированию нового фенотипа за счет незначительных, но многочисленных взаимосвязанных изменений в функционировании генома и протеома. Поэтому мы провели анализ межгенных взаимодействий аллельных вариантов генов-кандидатов при невынашивании беременности первого триместра.

Анализ межгенных взаимодействий показал, что максимальный синергетический эффект для двух локусов характерен для комбинации *NOS3* и

GPX4. Данная двухлокусная модель взаимодействия генов имеет воспроизводимость 90% и точность предсказания 62%. Генотип –786CC *NOS3*/718CC *GPX4* с возможным протективным эффектом статистически значимо чаще регистрируется в контрольной группе женщин ($\chi^2 = 4.51$, $p = 0.034$ (OR = 0.078, 95% CI 0.004–1.34)).

Модель трехлокусной комбинации *NOS3* × *GPX4* × *EDN1* характеризуется воспроизводимостью 80% и точностью предсказания 61%. Женщины с генотипом 198*LysLys* *EDN1*/–786TT *NOS3*/718CC *GPX4* имеют повышенный риск спонтанного прерывания беременности в первом триместре (OR = 3.92, $p = 0.013$, 95% CI 1.4–10.9).

При анализе четырехлокусной модели взаимодействия исследуемых локусов (*NOS3*, *GPX4*, *EDN1*, *SOD1*) выявлен генотип низкого риска спонтанного прерывания беременности в первом триместре: 198*LysLys* *EDN1*/–786TC *NOS3*/718CC *GPX4*/7958GG *SOD1* (OR = 0.11, 95% CI 0.014–0.82 $p = 0.021$).

Значимые модели взаимодействия исследуемых генов при неразвивающейся беременности в первом триместре следующие: *NOS3*, *SOD2*, *EDN1* × *SOD1* (воспроизводимость модели 80%, точность предсказания 58%); а также *NOS3*, *SOD2*, *EDN1*, *SOD1*, *GPX4* (воспроизводимость модели 100%, точность предсказания 63%). При этом выявлены генотипы высокого риска неразвивающейся беременности (табл. 4).

Таблица 4. Генотипы по исследуемым аллельным вариантам генов с высоким риском неразвивающейся беременности в первом триместре

Генотип	Частота, %		OR (95% CI)	p
	К	НБ		
–786TT NOS3/16AlaVal SOD2/198LysLys EDN1/7958GG SOD1	5.6	17.5	3.56 (1.28–9.83)	0.023
–786TT NOS3/16ValVal SOD2/198LysLys EDN1/7958GG SOD1	8.1	22.8	3.37 (1.38–8.24)	0.01
–786TC NOS3/16AlaVal SOD2/198LysLys EDN1/7958GG SOD1/718CT GPX4	5.6	19.3	3.99 (1.46–10.95)	0.009

Примечание. К – контроль; НБ – неразвивающаяся беременность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Запрограммированный “окислительный взрыв” в конце первого триместра беременности предполагает наличие хорошо развитой антиоксидантной системы в зародышевых клетках. Показана высокая концентрация ряда антиоксидантов в экстра-эмбриональной жидкости на пятой неделе развития [20]. Другое исследование показало связанное с гестацией увеличение экспрессии каталазы, Cu/Zn-SOD и Mn-SOD в ворсинках плаценты на 12-й нед. беременности. В этом же исследовании выявлен быстрый рост уровня кислорода в плаценте между 10–13 нед. беременности, который при нормальных условиях компенсируется повышением антиоксидантной емкости тканей [9]. Таким образом, в процессе нормального формирования плаценты повышение уровня кислорода в плацентарном ложе сопровождается ростом уровня мРНК и активности антиоксидантных ферментов.

В исследовании плацентарного кровотока при нормальной беременности и при невынашивании беременности первого триместра Jauniaux с коллегами [21] обнаружили, что в группе женщин с потерей беременности плацентарный кровоток часто формировался раньше по сравнению с контрольной группой. При этом в образцах плаценты, полученных после спонтанного прерывания беременности, выявлены маркеры развития окислительного стресса. Sugino с коллегами [22] определяли содержание малонового диальдегида и простагландина F2α в децидуальной ткани после спонтанного аборта. Выявлено повышенное содержание обоих соединений, а также повышение активности Mn-SOD, что может отражать реакцию на окислительный стресс (хотя активность Cu/Zn-SOD была значительно снижена) [22].

Ген *SOD1* локализуется на хромосоме 21. Полиморфизм 7958G>A (rs4998557) обуславливает снижение активности фермента SOD1 на 50%. Ген *SOD2* локализуется на хромосоме 6. Полиморфизм 47C>T (rs4880) (*Ala16Val*) влияет на вторичную структуру сигнального пептида. Поли-

морфная изоформа белка характеризуется нестабильным альфа-спиральным участком сигнального домена, что влияет на транспорт фермента из цитоплазмы в матрикс митохондрий. В результате данный полиморфизм может обуславливать дефицит фермента в митохондриях [23].

Данные литературы об ассоциации полиморфных вариантов генов супероксиддисмутаза с невынашиванием беременности первого триместра немногочисленны. Было проведено исследование ассоциации полиморфизма *Ala16Val* гена *SOD2* со спонтанным прерыванием беременности среди женщин Северного Ирана. По результатам исследования выявлено некоторое повышение частоты генотипа *ValVal* среди женщин со спонтанным прерыванием беременности по сравнению с контрольной группой ($p = 0.059$). Однако статистически значимой ассоциации исследуемого полиморфизма с повышением риска спонтанного прерывания беременности не выявлено [24]. В настоящей работе исследование полиморфизма 7958G>A гена *SOD1* выявило ассоциацию аллеля 7958A с повышенным риском спонтанного прерывания беременности. В то же время полиморфизм *Ala16Val* гена *SOD2* не ассоциирован с невынашиванием беременности.

В результате функционирования SOD образуется пероксид водорода, который относится к активным формам кислорода. Концентрация пероксида водорода в клетке поддерживается на физиологическом уровне благодаря функционированию таких антиоксидантов как каталаза и ферменты семейства глутатионпероксидаз. Показано, что ингибирование каталазы приводит к повреждению ДНК в ядре ооцита, нарушению расхождения хромосом в мейозе [25]. Каталаза кодируется геном, локализованным на хромосоме 11. Известны несколько аллельных вариантов гена *CAT*, обуславливающих снижение каталитической активности фермента. Одним из них является SNP –262C>T (rs1001179), который изменяет экспрессию гена каталазы за счет модификации сайта связывания фактора транскрипции. Пока-

зано, что данная замена приводит к снижению уровня активности каталазы [26]. Анализ геномной ДНК 105 женщин со спонтанным абортотом из Северного Ирана и 90 здоровых женщин выявил ассоциацию SNP $-262C>T$ гена каталазы с риском потери беременности [27].

Глутатионпероксидазы наряду с каталазой обеспечивают детоксикацию перекисных радикалов. Существуют восемь изоформ глутатионпероксидаз (GPx1–GPx8), которые различаются локализацией в клетке и субстратной специфичностью. Генетическая изменчивость глутатионпероксидаз обуславливает индивидуальную вариабельность метаболизма продуктов свободно-радикального окисления. Фермент GPx4 имеет большое значение в метаболизме пероксидов липидов. GPx4 метаболизирует H_2O_2 и гидроперекиси липидов, т.е. защищает мембраны от окисления фосфолипидов и липопротеинов. Кроме того, данный фермент принимает участие в процессах апоптоза, модуляции реакций воспаления путем регуляции цитокиновых сигнальных путей [28, 29]. Ген данного фермента (GPX4) локализован на хромосоме 19 и экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих. Полиморфизм rs713041 локализован в 3'-UTR в позиции 718; может влиять на синтез фермента, изменяя афинность для молекул, взаимодействующих с 3'-UTR [30]. В настоящем исследовании не выявлено ассоциации SNPs $-262C>T$ гена CAT и $718C>T$ гена GPX4 с невынашиванием беременности первого триместра.

NO участвует в расслаблении гладкой мускулатуры сосудов, регуляции роста сосудов, передаче нервных импульсов, в иммунных реакциях и др. [31]. Оксид азота также защищает стенки сосудов за счет ингибирования окисления липидов и инактивации свободных радикалов кислорода [32]. Но известно, что эффект NO зависит от его концентрации, а также от наличия и концентрации кислорода, АФК, концентрации и активности антиоксидантов. Ферменты синтеза оксида азота, в частности NOS3, способны образовывать не только NO, но и активные формы кислорода, особенно в условиях недостатка коферментов или аргинина. Таким образом, система оксида азота в клетках тесно связана с наличием молекулярного кислорода и компонентов окислительного стресса.

Ген NOS3 кодирует фермент эндотелиальную синтазу окиси азота 3. Нокаут гена оказывает негативное влияние на развитие и жизнеспособность эмбриона [33]. Известно несколько мутаций в гене NOS3, одна из них – SNP в промоторной части гена ($-786T>C$). Эта замена приводит к снижению синтеза эндотелиального NO, что может влиять на состояние гладкомышечных клеток сосудистой стенки. Некоторые данные указывают на то, что оптимальная концентрация оксида

азота формируется у гетерозиготных носителей по полиморфизму $-786T>C$ гена NOS3. В частности, показана более высокая эффективность имплантации яйцеклетки у женщин с таким генотипом [34].

Большая часть выявленных нами генотипов высокого риска невынашивания беременности в первом триместре характеризуется наличием аллеля $-786T$ гена NOS3 в гомозиготном состоянии. Такой генотип обуславливает высокий уровень транскрипции гена NOS3. Риск неразвивающейся беременности повышается при сочетании в генотипе аллеля $-786T$ гена NOS3 в гомозиготном состоянии с гетерозиготностью или гомозиготностью по аллелю $16Val$ гена SOD2. Наличие аллеля $16Val$ формирует условия для возникновения избытка супероксидных радикалов, который может быть результатом более низкой эффективности SOD2. Супероксид может реагировать с NO, образуя пероксинитрит, что приводит к разрушению клеточных мембран, повреждению ДНК, модификации различных белковых и липидных молекул. В результате развивается окислительно-нитратный стресс, индуцирующий гибель клеток.

Одним из факторов, стимулирующих eNOS для синтеза оксида азота, является эндотелин. С другой стороны, NO может ингибировать синтез и гемодинамические эффекты EDN1. Полиморфизм $5665G>T$ гена EDN1 приводит к замене в аминокислотной последовательности (*Lys198Asn*). Для лиц с генотипом *AsnAsn* характерен более высокий уровень эндотелина в плазме по сравнению с носителями генотипа *LysLys* [35]. Была показана ассоциация полиморфизма *Lys198Asn* с уровнем вазоконстрикции и артериальным давлением. Данные литературы об ассоциации полиморфных вариантов гена эндотелина 1 с невынашиванием беременности первого триместра практически отсутствуют. Показано, что уровень экспрессии гена EDN1 в плаценте у женщин с преэклампсией был существенно выше по сравнению с контрольной группой. Для полиморфизма rs5370 показано снижение частоты генотипа GG и увеличение частоты аллеля T для женщин с преэклампсией [36]. В другом исследовании не выявлено ассоциации rs5370 гена EDN1 с преэклампсией [37]. В настоящем исследовании установлено, что среди женщин с неразвивающейся беременностью частота гомозигот *Asn/Asn* гена EDN1 в 3 раза выше ожидаемой. Для женщин с данным генотипом выявлен повышенный риск остановки развития зародыша.

Таким образом, выявленные нами различия в частотах генотипов и аллелей по исследуемым аллельным вариантам генов антиоксидантов и белков, контролирующим функционирование эндотелия, а также данные, полученные MDR-методом, свидетельствуют о значимом вкладе SNP данных

генов в формирование риска репродуктивных потерь у человека. Специфичная для стадии эмбрионального развития экспрессия и ткане-специфичная активация данных генов-кандидатов являются одними из ключевых компонентов на ранних этапах беременности. Однако характер экспрессии генов, особенно во взаимодействии с другими компонентами генной сети при нормально развивающейся беременности и невынашивании беременности требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 6.6762.2017).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Larsen E., Christiansen O., Kolte A. et al.* New insights into mechanisms behind miscarriage // *BMC Med.* 2013. V. 11. P. 154. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-154>
2. *Levy B., Sigurjonsson S., Pettersen B. et al.* Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis // *Obstet. Gynecol.* 2014. V. 124. P. 202–209. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000325>
3. *Bug S., Solfrank B., Schmitz F. et al.* Diagnostic utility of novel combined arrays for genome-wide simultaneous detection of aneuploidy and uniparental isodisomy in losses of pregnancy // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. P. 43. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-43>
4. *Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W. et al.* Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25(11). P. 2913–2922. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq202>
5. *Viaggi C., Cavani S., Malacarne M. et al.* First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH // *J. Appl. Genet.* 2013. V. 54(3). P. 353–359. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0157-x>
6. *Bagheri H., Mercier E., Qiao Y. et al.* Genomic characteristics of miscarriage copy number variants // *Mol. Hum. Reprod.* 2015. V. 21(8). P. 655–661. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav030>
7. *Sugino N.* Reactive oxygen species in ovarian physiology // *Reproductive Medicine and Biology.* 2005. V. 4. P. 31–44. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2005.00086.x>
8. *Agarwal S., Gupta L., Sekhon L. et al.* Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2008. V. 10. P. 1375–1403. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1964>
9. *Jauniaux E., Watson A., Hempstock J. et al.* Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure // *Am. J. Pathology.* 2000. V. 157. P. 2111–2122. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64849-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64849-3)
10. *Wang Y., Walsh S.* Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia // *Placenta.* 1998. V. 19. P. 581–586. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(98\)90018-2](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(98)90018-2)
11. *Myatt L., Cui X.* Oxidative stress in the placenta // *Histochemistry and Cell Biology.* 2004. V. 122. P. 369–382. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0677-x>
12. *Nozik-Grayck E., Suliman H., Piantadosi C.* Extracellular superoxide dismutase // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. V. 37. P. 2466–2471. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.012>
13. *Frendo J., Therond P., Bird T. et al.* Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation // *Endocrinology.* 2001. V. 142. P. 3638–3648. <https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8329>
14. *Suryanarayana V., Rao L., Kanakavalli M. et al.* Recurrent early pregnancy loss and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2006. V. 274. P. 119–124. <https://doi.org/10.1007/s00404-005-0107-x>
15. *Khalil A., Hardman L., Brien P.* The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy // *Amino Acids.* 2015. V. 47. P. 1715–1727. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2014-1>
16. *Pallares P., Gonzalez-Bulnes A.* Intrauterine growth retardation in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice is established from early stages of pregnancy // *Biol. Reprod.* 2008. V. 78. P. 1002–1006. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066159>
17. *Kawanabe Y., Nauli S.* Endothelin // *Cell Mol. Life Sci.* 2011. V. 68. P. 195–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0518-0>
18. *Davenport A., Hyndman K., Dhaun N. et al.* Endothelin // *Pharmacol. Rev.* 2016. V. 68. № 2. P. 357–418. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>
19. *Rodriguez S., Gaunt T., Day I.* Hardy–Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies // *Am. J. Epidemiol.* 2009. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn359>
20. *Jauniaux E., Hempstock J., Greenwold N. et al.* Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies // *Am. J. Pathol.* 2003. V. 162. P. 115–125. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63803-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63803-5)
21. *Jauniaux E., Greenwold N., Hempstock J. et al.* Comparison of ultrasonographic and Doppler mapping of the intervillous circulation in normal and abnormal early pregnancies // *Fertility and Sterility.* 2003. V. 79. P. 100–106. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04568-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04568-5)

22. *Sugino N., Nakata M., Kashida S. et al.* Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin F(2alpha) in the decidua of failed pregnancy // *Mol. Hum. Reprod.* 2000. V. 6. P. 642–647.
23. *Sutton A., Khoury H., Prip-Buus C. et al.* The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria // *Pharmacogenetics.* 2003. V. 13. P. 145–157.
<https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000054067.64000.8f>
24. *Sabet E., Salehi Z., Khodayari S. et al.* Spontaneous abortion and functional polymorphism (Val16Ala) in the manganese SOD gene // *J. Obstet. Gynaecol.* 2015. V. 35(2). P. 159–162.
<https://doi.org/10.3109/01443615.2014.937330>
25. *Park Y., You S., Cho S. et al.* Eccentric localization of catalase to protect chromosomes from oxidative damages during meiotic maturation in mouse oocytes // *Histochem. Cell Biology.* 2016. V. 146. P. 281–288.
<https://doi.org/10.1007/s00418-016-1446-3>
26. *Nadif R., Mintz M., Jedlicka A. et al.* Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli // *Free Radic. Res.* 2005. V. 39(12). P. 1345–1350.
<https://doi.org/10.1080/10715760500306711>
27. *Sabet E., Salehi Z., Khodayari S. et al.* Polymorphisms of glutathione peroxidase 1 (GPX1 Pro198Leu) and catalase (CAT C-262T) in women with spontaneous abortion // *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2014. V. 60(5). P. 304–307.
<https://doi.org/10.3109/19396368.2014.892651>
28. *Brigelius-Flohé R., Maiorino M.* Glutathione peroxidases // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1830(5). P. 3289–3303.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
29. *Crosley L., Bashir S., Nicol F. et al.* The single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene influences endothelial cell function: interaction with selenium and fatty acids // *Mol. Nutr. Food Res.* 2013. V. 57(12). P. 2185–2194.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300216>
30. *Du X., Dai X., Xia Song R. et al.* SNP and mRNA expression for glutathione peroxidase 4 in Kashin-Beck disease // *Br. J. Nutr.* 2012. V. 107(2). P. 164–169.
<https://doi.org/10.1017/S0007114511002704>
31. *Krause J., Hanson M., Casanello P.* Role of nitric oxide in placental vascular development and function // *Placenta.* 2011. V. 32. P. 797–805.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.025>
32. *Galluccio E., Cassina L., Russo I. et al.* A novel truncated form of eNOS associates with altered vascular function // *Cardiovasc. Res.* 2014. V. 101. P. 492–502.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt267>
33. *Pallares P., Gonzalez-Bulnes A.* The effect of embryo and maternal genotypes on prolificacy, intrauterine growth retardation and postnatal development of Nos3-knockout mice // *Reprod. Biol.* 2010. V. 10. P. 241–248.
[https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60044-8](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60044-8)
34. *Maul H., Longo M., Saade G. et al.* Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery // *Curr. Pharm. Des.* 2003. V. 9. P. 359–380.
<https://doi.org/10.2174/1381612033391784>
35. *Pousada G., Baloiira A., Vilarino C. et al.* Estudio del polimorfismo K198N en el gen EDN1 en pacientes afectados de hipertension arterial pulmonar // *Med. Clin. (Barc).* 2015. V. 144. № 8. P. 348–352.
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.11.037>
36. *Aggarwal P., Jain V., Srinivasan R. et al.* Maternal EDN1 G5665T polymorphism influences circulating endothelin-1 levels and plays a role in determination of preeclampsia phenotype // *J. Hypertens.* 2009. V. 27(10). P. 2044–2050.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32832f7f3f>
37. *Galaviz-Hernandez C., Arámbula-Meraz E., Medina-Bastidas D. et al.* The paternal polymorphism rs5370 in the EDN1 gene decreases the risk of preeclampsia // *Pregnancy Hypertens.* 2016. V. 6(4). P. 327–332.
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2016.07.002>

Association of Gene Polymorphisms of Antioxidants with Reproductive Losses

E. V. Mashkina^{a, *}, K. A. Kovalenko^a, A. V. Miktadova^a, and M. A. Shkurat^a

^a*Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

**e-mail: lenmash@mail.ru*

The frequency of genotypes and alleles for SNP of antioxidants genes (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX4*), *EDN1* and *NOS3* was investigated in women with pregnancy loss. The 7958A allele of the *SOD1* gene was associated with an increased risk of spontaneous abortion in the first trimester (OR = 2.17, 95% CI, 1.14–4.13). Women with the Asn/Asn genotype of the *EDN1* gene have an increased risk of missed abortion in the first trimester (OR = 7.18, 95% CI 1.4–36.75). An association with increased risk of pregnancy loss in the first trimester was found for the *NOS3* –786T allele (OR = 1.68, 95% CI 1.04–2.72). The significant models of gene-gene interaction changing risk of miscarriage were revealed.

Keywords: gene polymorphism, antioxidants, pregnancy loss, genes interaction, *SOD1*, *SOD2*, *NOS3*, *EDN1*.