

УДК 575.224.22

Роль полиморфизма генов микроРНК и фолатного цикла в невынашивании беременности

Строкова К.А., Гутникова Л.В., Машкина Е.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, Академия биологии и биотехнологии

им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, lenmash@mail.ru

10.18522/2308-9709-2023-43-3

Аннотация

Патологии функционирования генов фолатного цикла вносят значимый вклад в развитие невынашивания беременности. Полиморфизм генов микроРНК может быть связан с нарушением экспрессии генов фолатного цикла. Статус фолатов, как доноров метильных групп, в свою очередь, может влиять на профили экспрессии микроРНК через изменение уровня метилирования ДНК. Актуальным является исследование сочетанных эффектов белок-кодирующих и регуляторных полиморфных локусов генома человека. Целью данного исследования было выявление роли полиморфных вариантов гена *miRNA27a* и генов фолатного цикла в невынашивании беременности первого триместра. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 48 женщин контрольной группы и 60 женщин с невынашиванием беременности в первом триместре. Показано, что однонуклеотидные замены *677C>T* и *1298A>C* в гене *MTHFR*, *2756A>G* в гене

MTR, 66A>G в гене *MTRR* и A>G (*rs895819*) в гене *miRNA-27a* не ассоциированы с риском невынашивания беременности. Анализ частот гаплотипов для полиморфных локусов (677C>T и 1298A>C) гена *MTHFR* выявил ассоциацию гаплотипа TA с повышением риска невынашивания беременности. Выявлена зависимость между уровнем гомоцистеина и генотипом по полиморфизму гена *MTRR* 66A>G ($r=0.38$; $p=0,007$). У женщин с генотипом GG уровень гомоцистеина выше, по сравнению с теми, кто является гомозиготой по аллели 66A *MTRR*. Двухлокусный генотип 677CC гена *MTHFR* и AA (*rs895819*) гена *miRNA27a* ассоциирован со снижением уровня гомоцистеина в крови женщин и снижением риска невынашивания беременности в первом триместре.

Ключевые слова: полиморфизм генов; *MTHFR*; *MTRR*; *MTR*; *miRNA27A*; фолатный цикл; гомоцистеин

The role of miRNA and folate cycle genes polymorphisms in miscarriage

Stroikova K.A., Gutnikova L.V., Mashkina E.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia; lenmash@mail.ru

Abstract

Pathologies of the functioning of the folate cycle genes make a significant contribution to the development of miscarriage. The polymorphism of miRNA genes may be associated with impaired gene expression of folate cycle. The status of folates as donors of methyl groups, in turn, can affect the expression profiles of miRNAs through changes

in the level of DNA methylation. The study of the combined effects of protein-coding and regulatory polymorphic loci of the human genome is actual. The aim of this study was to identify the role of polymorphic variants of the *miRNA27a* gene and folate cycle genes in miscarriage. DNA samples of 48 women in the control group and 60 women with miscarriage in the first trimester served as material for the study. SNPs *677C>T* and *1298A>C* in the *MTHFR*, *2756A>G* in the *MTR*, *66A>G* in the *MTRR*, and *A>G* (rs895819) in the *miRNA-27a* are not associated with the risk of miscarriage. Analysis of haplotype frequencies for polymorphic loci (*677C>T* and *1298A>C*) of the *MTHFR* gene revealed an association of the *TA* haplotype with an increased risk of miscarriage. A relationship was found between the level of homocysteine and the SNP of the *MTRR* *66A>G* ($r=0.38$; $p=0.007$). The two-locus genotype *677CC MTHFR* gene and *AA* (rs895819) *miRNA27a* gene is associated with a decrease in the level of homocysteine in the blood of women and a decrease in the risk of miscarriage in the first trimester.

Keywords: gene polymorphism; *MTHFR*, *MTRR*; *MTR*; *miRNA27A*; folate cycle; homocysteine

Введение

МикроРНК, короткие некодирующие РНК, участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов посредством комплементарного связывания с мРНК. Однонуклеотидные мутации в генах микроРНК могут изменять экспрессию и/или созревание транскриптов, а также влиять на регуляторную способность микроРНК (Li et al., 2016; Li et al., 2017). Показано, что мутации в генах микроРНК связаны с патологиями эндометрия,

преэклампсией, дефектами нервной трубки, бесплодием и рецидивирующими потерями беременности (Rah et al., 2017; Shaker et al., 2019).

МикроРНК могут оказывать значительное влияние на течение беременности посредством контроля таких процессов как формирование и развитие эндометрия (микроРНК-200), клеточная дифференцировка, ангиогенез во время формирования плаценты (микроРНК-25, микроРНК-32, микроРНК-125), имплантация бластоцисты (*микроРНК-605*), а также участие в различных биохимических процессах в клетках, в том числе и в фолатном обмене (микроРНК 27а, микроРНК-22-3р, микроРНК-149-5р) [Li C. et al., 2017; Zhao et al., 2017; Wang, Chang, Zhang, 2020; Wang et al., 2018, 2020). МикроРНК 27а может оказывать влияние на течение беременности, принимая участие в различных биохимических процессах в клетках, в том числе, и в фолатном обмене (Wang et al., 2016; Baker et al., 2017).

Полиморфизм генов микроРНК может быть связан с нарушением экспрессии генов фолатного цикла. Статус фолатов, в свою очередь, может влиять на профили микроРНК непосредственно изменением метилирования ДНК генов, кодирующих микроРНК, либо посредством модулирования экспрессии генов восходящих сигнальных путей микроРНК из-за изменений в гомеостазе клеток. Таким образом, существуют двунаправленные ассоциации между статусом фолатов и профилями микроРНК (Beckett, Veysey, Lucock, 2017).

Целью данного исследования является выявление роли полиморфных вариантов гена *miRNA27a* и генов фолатного цикла в невынашивании беременности первого триместра.

Материал и методы

В работе были исследованы образцы ДНК женщин двух групп. Контрольную группу составили 48 образцов ДНК женщин, у которых не зафиксировано случаев прерывания беременности в первом триместре гестации. Группу сравнения составили образцы ДНК женщин со случаями спонтанного аборта (29 образцов) и/или неразвивающейся беременности (31 образец). Средний возраст женщин контрольной группы был 29 лет, тогда как в группе сравнения – 30 лет. Все женщины подписали информированное согласие об участии в исследовании. ДНК выделяли из клеток крови, которую забирали утром натощак из локтевой вены.

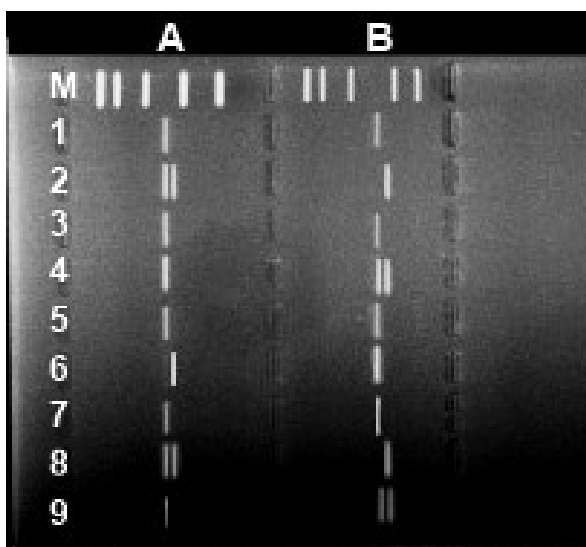
В исследуемые группы не включали женщин с гипертонией, сахарным диабетом, аутоиммунными заболеваниями и рядом других соматических патологий.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, Россия). Аллельные варианты 677C>T (*rs1801133*), 1298A>C гена *MTHFR*, 66A>G (*rs1801394*) гена *MTRR*, 2756A>G (*rs1805087*) гена *MTR* исследовали с использованием наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия).

SNP (*rs895819*) гена *miRNA27a* исследовали путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Для амплификации участка гена *miRNA27a* использовали праймеры: прямой 5` - GAACTTAGCCACTGTGAACACCACTTGG, обратный 5` - TTGCTTCCTGTCACAAATCACATTG. Программа амплификации: 95°C 5 минут; 40 циклов 95°C 25 сек, 60°C 30 сек, 72°C 30 сек.; заключительная элонгация 72°C 5 минут.

После амплификации проводили рестрикционный анализ полученного продукта длиной 182 п.н. с использованием рестриктазы *DraIII*. После рестрикции

возможно получение следующих продуктов: один фрагмент длиной 182 п.н. – характерен для генотипа *GG*, два продукта длиной 155 и 27 п.н. – характерны для генотипа *AA* и три фрагмента длиной 182, 155 и 27 п.н. – характерны для генотипа *AG* (Cao et al., 2014) (рис. 1). Детекцию продуктов ПЦР и рестрикции проводили методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле.



*Рисунок 1 – Результат электрофоретического разделения продуктов рестрикции для гена *miRNA27a* (*rs895819*). Цифрами обозначены лунки: нечетными – ПЦР-продукты, четными – продукты после рестрикции; М – маркер (слева направо: 766; 500; 300; 150; 50; п.н.); в лунках 2 и 8 (часть А) и 4 и 9 (часть В) – выявлены фрагменты ДНК размером 182 и 155 п.н (генотип *AG*). В лунках 4,7,9 (часть А) и в лунке 6 (часть В) выявлены фрагменты ДНК размером 182 п.н. (генотип *GG*). В лунке 6 (часть А) и в лунках 2 и 8 (часть В) выявлены фрагменты ДНК размером 155 п.н (генотип *AA*).*

Определение концентрации гомоцистеина проводили иммуноферментным методом с использованием реагентов «AxisHomocysteineEIA» (производство «Axis-Shield», Норвегия).

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга определяли с использованием Hardy-Weinberg equilibrium calculator в программе <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg>. Оценку различий в распределении аллельных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 .

Анализ гаплотипов проводили в программе «Haploview» (<https://www.broadinstitute.org/haploview/downloads>).

Оценку роли взаимодействий между исследуемыми генетическими локусами проводили с использованием программы Multifactor Dimensionality Reduction (MDR).

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена рассчитывали в программе «GraphPad InStat».

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты анализа частот аллелей по полиморфизму $677C>T$, $1298A>C$ гена *MTHFR*, $66A>G$ гена *MTRR*, $2756A>G$ гена *MTR* свидетельствуют об отсутствии ассоциации данных однонуклеотидных замен с риском невынашивания беременности в первом триместре (табл. 1). Частоты генотипов по исследуемым SNP генов соответствуют равновесию Харди-Вайнберга в обеих группах женщин.

Таблица 1 – Частоты аллелей по SNP генов фолатного цикла в группе женщин с невынашиванием беременности и контрольной группы

Ген, SNP	Аллель	НБ	Контроль	χ^2	p
<i>MTHFR</i> $677C>T$	C	0,62	0,73	2,55	0,11
	T	0,38	0,27		
<i>MTHFR</i> $1298A>C$	A	0,72	0,66	0,65	0,42
	C	0,28	0,34		
<i>MTRR</i>	A	0,475	0,51	0,14	0,7

	<i>G</i>	0,525	0,49		
<i>MTR</i>	<i>A</i>	0,74	0,84	2,7	0,09
	<i>G</i>	0,26	0,16		

Частота встречаемости гаплотипов для гена *MTHFR* в исследуемых нами группах женщин представлена в таблице 2. Гаплотип *TA* в группе женщин с невынашиванием беременности регистрируется в 1,6 раз чаще по сравнению с контролем.

Таблица 2 – Частота гаплотипов гена *MTHFR* в исследуемых группах женщин

<i>MTHFR</i> гаплотипы (677C>T / 1298A>C)	НБ (%)	Контроль (%)	p
<i>CA</i>	35,8	43,3	0,26
<i>TA</i>	35,4	22,3	0,037
<i>CC</i>	25,2	32,8	0,23
<i>TC</i>	3,6	1,6	0,38

Повышенной экспрессией во время беременности обладает *miRNA27a*. Данный ген расположен на 19 хромосоме и имеет полиморфизм *rs895819* (*A>G*) в положении 40 относительно первого нуклеотида (Rah et al., 2017; Shaker et al., 2019). Для микроРНК-27а известна мишень в мРНК гена *MTHFR* – сайт связывания 7mer-8m (база данных – <http://www.mirbase.org/>). Результаты анализа частот генотипов и аллелей по полиморфизму гена *miRNA27a* (*rs895819*) представлены на рисунке 2. Частоты генотипов по исследуемому аллельному варианту гена *miRNA27a* соответствуют равновесию Харди-Вайнберга (контроль: $\chi^2=2,37$, $p>0,05$; группа с НБ: $\chi^2=1,40$, $p>0,05$).

Аллель *A* является преобладающей для обеих групп. Наиболее часто встречающимся генотипом для обеих групп является генотип *AA*. Гетерозиготы встречаются в 1,5 раза чаще в группе с невынашиванием беременности по

сравнению с контрольной группой. В ходе исследования не выявлена статистически значимая разница в частотах генотипов ($\chi^2=0,55$, $p=0,76$) и аллелей ($\chi^2=0,596$, $p=0,28$) по полиморфизму $A>G$ гена *miRNA27a* (*rs895819*) между двумя группами обследуемых женщин.

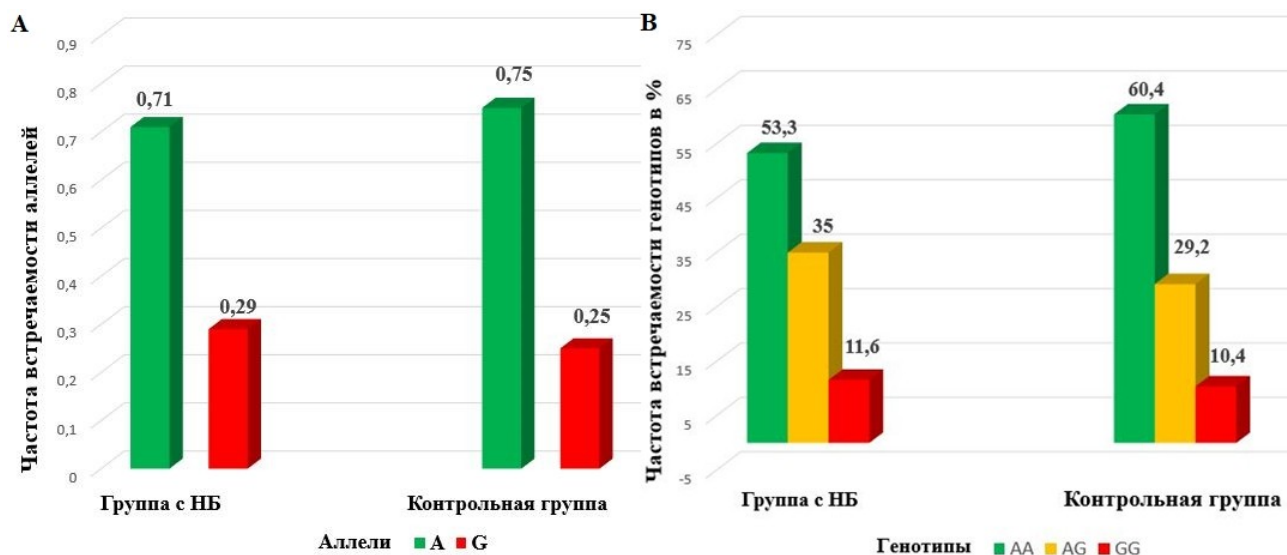


Рисунок 2 – Частоты генотипов (%) и аллелей по полиморфизму $A>G$ (*rs895819*) гена *miRNA27a* при невынашивании беременности и в контрольной группе

Для выявления сочетанного эффекта исследуемых SNP проводили анализ межгенных взаимодействий. Результаты представлены в таблице 3. Получена одна статистически значимая двухлокусная модель «*miRNA27a A>G*, *MTHFR 677C>T*» с воспроизводимостью – 8/10. Распределение двухлокусных генотипов представлено на рисунке 3.

Таблица 3 – Характеристика модели межгенного взаимодействия исследуемых локусов

Модель	CVC	χ^2 (p)	OR (95 % CI)
<i>miRNA27a A>G, MTHFR 677C>T</i>	8/10	8,76 (0,003)	3,27 (1,47-7,24)

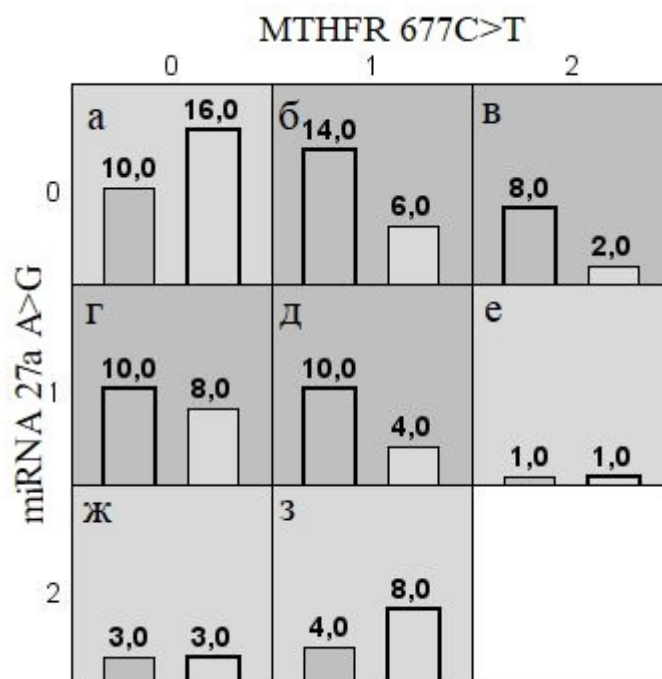


Рисунок 3 – Распределение частот двухлокусных сочетаний генотипов по полиморфизму генов *MTHFR* и *miRNA27a*: левые столбики в ячейках – НБ, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по частому аллелю, 1 – гетерозиготы, 2 – гомозиготы по редкому аллелю

Статистический анализ выявил один двухлокусный генотип, ассоциированный с понижением риска НБ (рис. 3, ячейка «а») – для гомозигот по аллелю 677C гена *MTHFR* и гомозигот по аллелю А гена *miRNA27a*. Вариант двухлокусного генотипа «а» ассоциирован со снижением риска развития

невынашивания беременности (OR = 0,04 (95% CI 0,016-0,99)). Это объясняется тем, что генотип *CC* по полиморфизму *677C>T* в гене *MTHFR* обеспечивает синтез в клетках функционально активной формы фермента 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктазы. Данные литературы о роли полиморфизма *A>G* гена *miRNA27a* различны. В частности установлено, что аллель *G* полиморфизма *rs895819 miRNA27a* ассоциирована со сниженным риском развития невынашивания беременности (Rah et al., 2017). При этом показана статистически значимая связь между генотипами *miRNA27a* и уровнем фолиевой кислоты в плазме крови. Функциональный анализ показал, что генотипы *AG* и *GG* могут быть ответственны за повышение уровня микроРНК-27а в плазме крови, что в свою очередь ведет к повышению уровня фолиевой кислоты и является защитным механизмом от невынашивания беременности, особенно в случае наличия полиморфизма в генах фолатного цикла, ведущих к снижению концентрации либо активности таких ферментов, как *MTHFR*, *MTRR* и *MTR* (Rah et al., 2017). В других исследованиях была выявлена ассоциация между генотипом *GG* гена *miRNA27a* и повышенным риском развития невынашивания беременности (Wang et al., 2016).

На рисунке 4 представлено графическое изображение модели взаимодействия между пятью исследуемыми локусами. Суммарная информационная ценность индивидуальных локусов составила 8,1 %. Максимальный эффект проявляет локус *MTHFR 677C>T*. Это связано с его функциями: он обеспечивает превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат. Однако при наличии мутантной аллели *T*, активность фермента в значительной мере снижается, что в свою очередь может приводить к накоплению гомоцистеина и развитию гипергомоцистеинемии.

Среди всех генов фолатного цикла взаимодействие локусов *MTRR 66A>G* и *MTHFR 1298A>C* более значимо, чем их индивидуальный эффект (показатель информационной ценности взаимодействия двух данных локусов в 5 раз выше суммы их индивидуальных эффектов) (рис. 4). Совместный эффект локусов *miRNA27a* и *MTHFR 677C>T* составляет 5,9 %, что превышает совместный эффект остальных генов фолатного цикла в сочетании с геном *miRNA27a*.

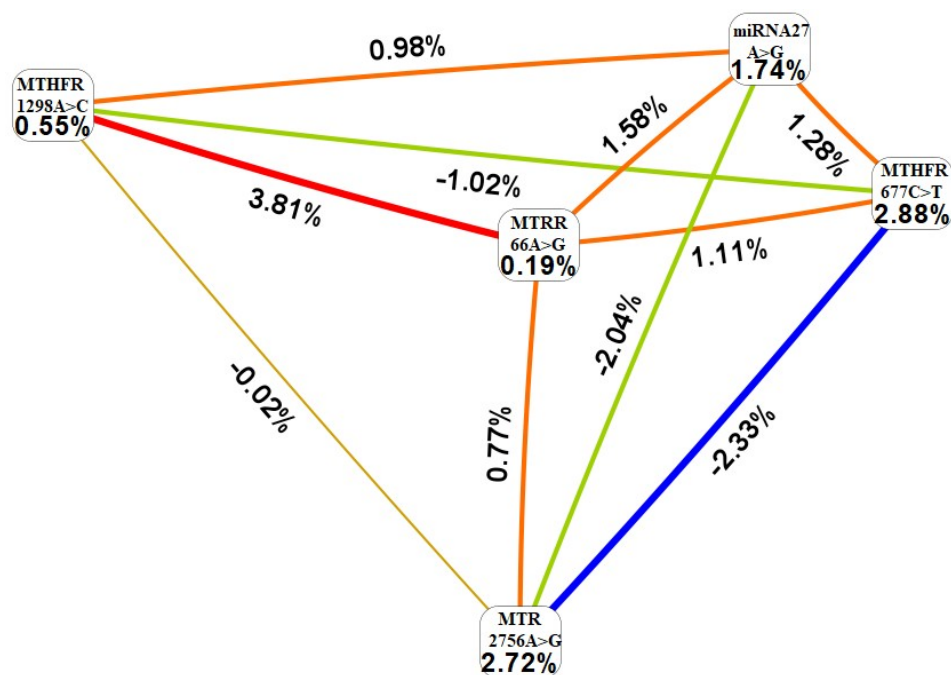


Рисунок 4 – Графическое изображение результатов анализа межгенных взаимодействий

Одновременное наличие в генотипе женщины полиморфных вариантов генов фолатного цикла и аллели *G* по гену *miRNA27a* (rs895819) может приводить к снижению экспрессии генов фолатного цикла, уменьшению активности и уровня ферментов и, вследствие этого, накоплению гомоцистеина и развитию гипергомоцистеинемии, что в свою очередь оказывает негативное влияние на течение и результаты беременности (Wang et al., 2016).

Далее для 48 образцов сыворотки женщин нами был проведен анализ уровня гомоцистеина. С использованием корреляционного анализа по методу Спирмена была обнаружена взаимосвязь между уровнем гомоцистеина и генотипом женщины по полиморфизму $66A>G$ гена *MTRR* ($r=0.38$; $p=0,007$). У женщин с генотипом *GG* уровень гомоцистеина выше по сравнению с теми, кто является гомозиготой по аллели *66A*. Это согласуется с данными литературы и объясняется тем, что аллель *66G* гена *MTRR* кодирует форму фермента со снижением активности до 30% от исходного. Функция фермента *MTRR* связана с активацией путем реметилирования метионинсинтазы. Именно метионинсинтаза катализирует реметилирование гомоцистеина в метионин. Поэтому снижение активности фермента *MTRR* приводит к повышению уровня гомоцистеина (Barbosa et al., 2008).

Согласно результатам анализа межгенного взаимодействия было установлено сочетание генотипов со сниженным риском невынашивания беременности (*MTHFR 677CC* и *miRNA-27a AA*). Далее мы провели анализ уровня гомоцистеина с учетом наличия или отсутствия данного генотипа (табл. 4)

Таблица 4 – Уровень гомоцистеина в зависимости от генотипа по двум локусам (*MTHFR 677CC* и *miRNA27a AA*)

Параметры	НБ		p	Контроль	
	Генотип <i>MTHFR CC \ miRNA AA</i>	Общая группа		Генотип <i>MTHFR CC \ miRNA AA</i>	Общая группа
Гомоцистеин (мкМоль/л)	7,06±0,24	7,98±0,3	0,03	8,05±0,7	10,06±0,73

Примечание: p – сравнение между общей группой НБ и подгруппой женщин с НБ с генотипом *MTHFR CC \ miRNA AA*

При сравнении уровня гомоцистеина у женщин контрольной группы с генотипом *CC* для гена *MTHFR 677C>T* и *AA* для гена *miRNA-27a* с общим

контролем не выявлено статистически значимой разницы в концентрации гомоцистеина. Но при сравнении группы женщин с невынашиванием беременности с генотипом *CC* для гена *MTHFR 677C>T* и *AA* для гена *miRNA-27a A>G* и общей группы женщин с группы с НБ было показано, что женщины с выявленным «защитным» генотипом имеют сниженный уровень гомоцистеина.

Заключение

Особенности генотипа женщины по полиморфным локусам генов фолатного цикла и микроРНК могут влиять на риск невынашивания беременности первого триместра.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

Список литературы

Baker B. C. et al. Placental dysfunction is associated with altered microRNA expression in pregnant women with low folate status //Molecular nutrition & food research. – 2017. – Т. 61. – №. 8. – С. 1600646.

Barbosa P. R. et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women //European journal of clinical nutrition. – 2008. – Т. 62. – №. 8. – С. 1010-1021.

Beckett E. L., Veysey M., Lucock M. Folate and microRNA: bidirectional interactions //ClinicaChimicaActa. – 2017. – Т. 474. – С. 60-66.

Li C. et al. Response of MiRNA-22-3p and MiRNA-149-5p to folate deficiency and the differential regulation of MTHFR expression in normal and cancerous human hepatocytes //PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 1. – С. e0168049.

Li Y. et al. A SNP in pri-miR-10a is associated with recurrent spontaneous abortion in a Han-Chinese population //Oncotarget. – 2016. – Т. 7. – №. 7. – С. 8208.

Rah H. C. et al. miR-27a and miR-449b polymorphisms associated with a risk of idiopathic recurrent pregnancy loss //PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 5. – С. e0177160.

Shaker M. et al. Association of miRNA-27a and leptin polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Egyptian women //Meta Gene. – 2019. – С. 100617.

Wang C. Y. et al. Effect of miRNA-27a and leptin polymorphisms on risk of recurrent spontaneous abortion //Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. – 2016. – Т. 22. – С. 3514.

Wang L., Chang S. Y., Zhang T. MiR-324–5p Regulation in Disturbed Embryogenesis Induced by Folate Deficiency //Current Developments in Nutrition. – 2020. – Т. 4. – №. Supplement_2. – С. 1279-1279.

Wang X. et al. The polymorphism of rs11614913 T/T in pri-miR-196a-2 alters the miRNA expression and associates with recurrent spontaneous abortion in a Han-Chinese population //American Journal of Translational Research. – 2020. – Т. 12. – №. 5. – С. 1928.

Wang X. Q. et al. Haplotype-based association of two SNPs in miR-323b with unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population //Journal of cellular physiology. – 2018. – Т. 233. – №. 8. – С. 6001-6017.

Zhao W. et al. Novel mechanism of miRNA-365-regulated trophoblast apoptosis in recurrent miscarriage//Journal of cellular and molecular medicine. – 2017. – Т. 21. – №. 10. – С. 2412-2425.

