Проблемы репродукции
2023, Т. 29, №1, с. 39-47
https://doi.org/10.17116/repro20232901139

Russian Journal of Human Reproduction =
Problemy Reproduktsii 2023, vol. 29, no.1, pp. 39-47
https://doi.org/10.17116/repro20232901139

Исследование полиморфизма генов фолатного цикла у женщин с бесплодием и невынашиванием беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий

© А.Т. СУГУРОВА[1], А.Г. ЯЩУК[1], А.А. ТЮРИНА[1], Б.И. ЯЛАЕВ[2], З.И. ХАРИСОВА[3], Р.И. ХУСАИНОВА[1, 2]

[1]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия;
[2]ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук Минобрнауки России, Уфа, Россия;
[3]ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», Уфа, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Выполнить поиск ассоциаций полиморфизма генов фолатного цикла (*MTHFR 677C/T* (rs1801133), *MTHFR 1298A/C* (rs1801131), *MTR A2756G* (rs1805087), *MTRR A66G* (rs1801394) при невынашивании беременности и бесплодии с вариантами ответа на контролируемую стимуляцию овуляции при выполнении вспомогательных репродуктивных технологий у женщин — жительниц Республики Башкортостан.

Материал и методы. Проведен поиск ассоциаций полиморфных локусов генов фолатного цикла у женщин с невынашиванием беременности, бесплодием и с вариантами ответа яичников на стимуляцию овуляции. На основании данных анамнеза выборка из 205 женщин разделена на три группы в зависимости от ответа яичников: 1-я группа — пациентки с «бедным» ответом на стимуляцию овуляции; 2-я группа — пациентки с нормальным ответом на стимуляцию овуляции; 3-я группа — пациентки с гиперответом на стимуляцию овуляции. Исследование проведено с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Статистический анализ выполнен с применением критериев Краскелла—Уоллеса, медианного теста, критерия χ^2 Пирсона.

Результаты. Выявлена ассоциация аллеля rs1801133*C и генотипа rs1801133*C/C гена *MTHFR* с невынашиванием беременности, обнаружена тенденция к ассоциации аллеля rs1805087*A и генотипа rs1805087*A/A локуса гена *MTR*, аллеля rs1801133*T гена *MTHFR* с бесплодием. Выявлена ассоциация аллеля rs1801133*T гена *MTHFR* и аллеля rs1805087*G гена *MTR* с повышением уровня гомоцистеина.

Выводы. Учитывая участие в фолликулогенезе фолиевой кислоты, гомоцистеина и вариаций генов, метаболизирующих фолиевую кислоту, следует отметить, что эти полиморфизмы являются интересными кандидатами в биомаркеры, и их значение в вариантах ответа контролируемой стимуляции овуляции должно быть изучено в дальнейшем.

Ключевые слова: *полиморфизм генов, гомоцистеин, бесплодие, генетика.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Сугурова А.Т. — https://orcid.org/0000-0003-0980-629X
Ящук А.Г. — https://orcid.org/0000-0003-2645-1662
Тюрина А.А. — https://orcid.org/0000-0001-6657-8081
Ялаев Б.И. — https://orcid.org/0000-0003-4337-1736
Харисова З.И. — https://orcid.org/0000-0002-3902-3459
Хусаинова Р.И. — https://orcid.org/0000-0002-8643-850X
Автор, ответственный за переписку: Сугурова А.Т. — e-mail: alf84@bk.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Сугурова А.Т., Ящук А.Г., Тюрина А.А., Ялаев Б.И., Харисова З.И., Хусаинова Р.И. Исследование полиморфизма генов фолатного цикла у женщин с бесплодием и невынашиванием беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Проблемы репродукции*. 2023;29(1):39–47. https://doi.org/10.17116/repro20232901139

Influence of polymorphism of folate cycle genes in assisted reproductive technologies programs in women with infertility and miscarriage

© A.T. SUGUROVA[1], A.G. YASHCHUK[1], A.A. TYRINA[1], B.I. YALAEV[2], Z.I. KHARISOVA[3], R.I. KHUSAINOVA[1, 2]

[1]Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;
[2]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia;
[3]Ufa State Aviation Technical University, Ufa, Russia

ABSTRACT

A search for associations of folate cycle gene polymorphic loci in women with pregnancy failure, infertility and different ovarian responses to ovulation stimulation was performed. Based on history, a sample of 205 women is divided into three groups according to ovarian response: group 1 — women with a poor response to stimulation; group 2 — women with a normal response. The third group included patients with a hyperresponse to controlled stimulation. The study was conducted using real-time polymerase chain

reaction. Statistical analysis in article was performed by Kruskell-Wallace criteria, median and χ^2 Pearson's methods. An association of the allele *MTHFR* rs1801133*C and the *MTHFR* rs1801133*C/C with miscarriage was revealed, as well as a tendency to associate the allele *MTR* rs1805087*A, the genotype *MTR* rs1805087*A/A and allele *MTHFR* rs1801133*T with infertility. The allele *MTHFR* rs1801133*T and the allele *MTR* rs1805087*G associated with an increase in the level of homocysteine. Like this. Thus, given the involvement of folic acid, homocysteine, and folic acid-metabolizing gene variations in folliculogenesis, these polymorphisms are interesting biomarker candidates, and their significance in variation in the response to controlled ovulation stimulation requires further study.

Keywords: *gene polymorphism, homocysteine, infertility, genetics.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Sugurova A.T. — https://orcid.org/0000-0003-0980-629X
Yashchuk A.G. — https://orcid.org/0000-0003-2645-1662
Tyrina A.A. — https://orcid.org/0000-0001-6657-8081
Yalaev B.I. — https://orcid.org/0000-0003-4337-1736
Kharisova Z.I. — https://orcid.org/0000-0002-3902-3459
Khusainova R.I. — https://orcid.org/0000-0002-8643-850X
Corresponding author: Sugurova A.T. — e-mail: alf84@bk.ru

TO CITE THIS ARTICLE:
Sugurova AT, Yashchuk AG, Tyurina AA, Yalaev BI, Kharisova ZI, Khusainova RI. Study of polymorphism of folate cycle genes in women with infertility and miscarriage in assisted reproductive technology programs. *Problemy Reproduktsii (Russian Journal of Human Reproduction).* 2023;29(1):39–47. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/repro20232901139

ВВЕДЕНИЕ

Одной из труднорешаемых задач в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является раскрытие молекулярно-генетических механизмов широкого диапазона чувствительности яичников в ответ на гормональную стимуляцию, от «бедного» ответа до гиперответа.

Частота «бедного» ответа яичников составляет 9—24%, а это означает, что для каждой четвертой пациентки спрогнозирован неблагоприятный репродуктивный прогноз. Согласно Болонским критериям, «бедный» ответ яичников означает: возраст матери (⩾40 лет), «бедный» овариальный ответ в предыдущих циклах ВРТ с получением ⩽3 ооцитов и/или аномальный тест на овариальный резерв, что соответствует количеству антральных фолликулов (КАФ) <7, или уровень антимюллерова гормона (АМГ) <1,1 нг/мл. Если поздний репродуктивный возраст или аномальный тест на овариальный резерв исключены, пациентка может рассматриваться как пациент с «бедным» ответом после двух эпизодов «бедного» ответа яичников на стимуляцию суперовуляции [1, 2]. Важно спрогнозировать гиперответ яичников на контролируемую стимуляцию овуляции, поскольку это является основным фактором риска развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) [3]. СГЯ является опасным для жизни состоянием и характеризуется кистозным увеличением яичников, резким и быстрым перемещением внутрисосудистой жидкости в третье пространство, нарушением функции печени и почек, кровотечением из яичников и тромбоэмболией. Как и в случае «бедного» ответа, прогнозирование гиперответа в настоящее время основывается на клинических критериях и анамнестических характеристиках, таких как молодой возраст, длинные менструальные циклы, признаки синдрома поликистозных яичников и гиперреакция в предыдущем цикле [4]. В этой связи идентификация прогностических предикторов ответа яичников и модификация протоколов стимуляции позволяют разработать эффективные подходы к реализации ВРТ [5]. Однако следует отметить, что зачастую ответ яичников при гормональной стимуляции предсказать сложно, поскольку имеется зависимость от индивидуального генетического профиля пациентки. Установлено, что ряд маркеров, локализованных в генах фолатного цикла, обладает большей предсказательной ценностью, что позволяет улучшить существующие протоколы стимуляции яичников в программах ВРТ [6].

Фермент метаболизма фолиевой кислоты (метилентетрагидрофолатредуктаза — MTHFR) участвует в процессе синтеза ДНК и регуляции уровня гомоцистеина, выполняет главенствующую роль в регуляции репродуктивной функции женщин [7]. Известно, что полиморфизм гена *MTHFR* связан с женским репродуктивным здоровьем, в частности, речь идет о мутации A1298C (Glu429Ala) [8], которая ассоциирована с бесплодием и влияет на эффективность ВРТ. Пациентки с генотипом *MTHFR* C677T T/T, связанным с изменением метаболизма метионина, при высоком уровне гомоцистеина имеют крайне негативные последствия при вынашивании беременности с высоким риском неудачной имплантации в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) /интрацитоплазматической инъекции сперматозоида [9]. Кроме того, исследователи указывают на то, что в совокупности гипергомоцистеинемия, полиморфизм гена *MTHFR* и других генов фолатного цикла, дефицит витамина В-комплекса, наследственные тромбофилии и выработка аутоиммунных антител могут быть причиной бесплодия неясного генеза [10, 11]. Высо-

кий уровень гомоцистеина может быть связан с дефицитом определенных витаминов (фолиевой кислоты, витамина В6 и др.) и/или полиморфизмом гена *MTHFR* [12]. При этом снижение активности *MTHFR* из-за мутации A1298C может способствовать изменению регуляции статуса метилирования ДНК, что требуется для нормального развития эмбриона [13]. Выполнены исследования, в которых проведена оценка взаимосвязи мутации гена *MTHFR* A1298C и нарушений репродуктивной функции, но с результатами, требующими валидации, а также противоречащими изначальным гипотезам. Сообщалось, что концентрация гомоцистеина в фолликулярной жидкости связана с резервом яичников, реакцией на стимуляцию яичников и качеством яйцеклеток и эмбрионов у женщин, получающих лечение методами ВРТ [14]. Группа исследователей из Южной Кореи продемонстрировала, что мутация гена *MTHFR* 677T способна повышать риск идиопатического «бедного» ответа яичников и может быть новым генетическим маркером для прогнозирования риска получения «бедного» ответа яичников [15]. Женщины с дефицитом фолиевой кислоты, перенесшие контролируемую стимуляцию яичников, имеют более низкое качество ооцитов, низкую частоту наступления беременности и нарушение функции яичников [16]. Дефицит фолиевой кислоты увеличивает неправильное встраивание дезоксиуридинмонофосфата в ДНК, нарушает целостность ДНК и замедляет репликацию ДНК, вызывает апоптоз пораженных клеток. Известно, что мутация 677C/T вызывает дефекты метилирования ДНК, которые могут изменить экспрессию генов [14].

Имеются данные об отрицательной корреляции между высоким уровнем гомоцистеина и зрелостью ооцитов в программах ВРТ, а также качеством эмбрионов в протоколах ЭКО, имплантацией эмбрионов и частотой наступления беременности [17]. Так, к повышению концентрации гомоцистеина в сыворотке крови может привести генетически обусловленный дефицит фолиевой кислоты, кроме того, это может быть связано с рядом патологических состояний, в том числе с осложнениями беременности [18]. Эти результаты не только вызывают ряд интересных с точки зрения биологии вопросов, но и доказывают, что типирование гена *MTHFR* может иметь большое клиническое значение для выявления пациентов с высоким риском неудачи имплантации и выбора наиболее жизнеспособных эмбрионов во время циклов ЭКО [19].

Цель исследования — выполнить поиск ассоциаций полиморфизма генов фолатного цикла (*MTHFR 677C/T* (rs1801133), *MTHFR 1298A/C* (rs1801131), *MTR A2756G* (rs1805087), *MTRR A66G* (rs1801394) при невынашивании беременности и бесплодии с вариантами ответа на контролируемую стимуляцию овуляции при вспомогательных репродуктивных технологиях у женщин из Республики Башкортостан.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование одобрено комиссией локального этического комитета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол №9 от 05.12.18). До включения в исследование у всех участников получено письменное информированное добровольное согласие.

Группа исследования состояла из 205 женщин с бесплодием и невынашиванием беременности, которые находились под наблюдением в отделении вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр (Уфа) с 2018 по 2021 г. Диагноз бесплодия устанавливали после того, как супружеская пара прошла стандартный набор диагностических процедур и анализов, в том числе исследование гормонального фона.

На основании данных анамнеза выборка из 205 женщин разделена на три группы в зависимости от ответа яичников: 1-я группа — пациентки с «бедным» ответом на стимуляцию овуляции; 2-я группа — пациентки с нормальным ответом на стимуляцию овуляции; 3-я группа —пациентки с гиперответом на стимуляцию овуляции.

«Бедный» ответ яичников наблюдался у пациенток в возрасте от 32 до 46 лет (Me 41 год), ростом от 151 до 170 см (Me 161 см). Масса тела пациенток составляла от 41,9 до 84 кг (Me 59,5 кг), индекс массы тела (ИМТ) от 16 до 31 кг/м^2 (Me 23,25 кг/м^2). Продолжительность бесплодия составляла от 1 до 21 года (Me 8 лет). В ответ на контролируемую стимуляцию яичников получено от 1 до 4 фолликулов (Me 3,5). Лабораторное исследование крови выявило следующие показатели гормонов: фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) — от 5,89 до 12,6 мМЕ/мл; лютеинизирующий гормон (ЛГ) — от 2,9 до 11,43 мМЕ/мл, эстрадиол — от 0,3 до 226 Пг/мл; прогестерон — от 2,2 до 27,4 нг/мл; АМГ — от 0,42 до 3,17 пмоль/л; пролактин — от 10,9 до 474 мЕд/л; общий тестостерон — от 0,25 до 5,8 нмоль/л; тиреотропный гормон (ТТГ) — от 0,28 до 3,7 мЕд/л.

Пациентки с нормальным ответом яичников на стимуляцию суперовуляции находились в возрасте от 25 до 44 лет (Me 35 лет); ростом от 149 до 176 см (Me 161 см); масса тела составляла от 43 кг до 97 кг (Me 65 кг); ИМТ от 20 до 36 кг/м^2 (Me 27 кг/м^2). Время отсутствия беременности составило от 1 до 23 лет (Me 6 лет). В протоколе гормональной стимуляции яичников получено от 5 до 15 фолликулов (Me 8,5). В результате лабораторного обследования отмечены следующие уровни гормонов: ФСГ от 0,1 до 15,38 мМЕ/мл; ЛГ от 0,6 до 43,7 мМЕ/мл, эстрадиол от 0,24 до 362 Пг/мл; прогестерон от 0,3 до 68,13 нг/мл; АМГ от 0,33 до 30 пмоль/л; пролактин от 3,6 до 477,5 мЕд/л; общий тестостерон от 0,15 до 3,1 нмоль/л; ТТГ от 0,6 до 3,8 мЕд/л.

Группу женщин с гиперответом на стимуляцию овуляции составили пациентки в возрасте от 30 до 42 лет (Me 36,5 года); ростом от 153 до 165 см (Me 156,5 см). Масса тела составляла от 43 до 80 кг (Me 63,5 кг), ИМТ от 16,5 до 31,6 кг/м^2 (Me 28 кг/м^2). Период отсутствия беременности составил от 1 до 13 лет (Me 5 лет). Во время гормональной стимуляции яичников получено от 16 до 25 фолликулов (Me 19). Гормональный фон представлен следующими показателями: ФСГ от 2,8 до 9,9 мМЕ/мл; ЛГ от 2,0 до 20,3 мМЕ/мл, эстрадиол от 0,24 до 228 Пг/мл; прогестерон от 0,29 до 46,57 нг/мл; АМГ от 2,12 до 20 пмоль/л; пролактин от 8,9 до 479,0 мЕд/л; общий тестостерон от 0,34 до 9,96 нмоль/л; ТТГ от 0,47 до 2,8 мЕд/л.

Генотипирование проводилось посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Геномную ДНК для анализа полиморфизма экстрагировали из периферической крови, собранной с этилендиаминтетрауксусной кислотой, с использованием набора «Проба-Рапид-Генетика» (ООО «Научно-производственное объединение ДНК-Технология», Россия) на основе ПЦР в реальном времени и использовали для генотипирования полиморфизмов *MTHFR* 677C/T (rs1801133), *MTHFR* 1298A/C (rs1801131), *MTR* A2756G (rs1805087), *MTRR* A66G (rs1801394). Анализ статистических данных выполнен с применением критериев Краскелла—Уоллеса, медианного теста и критерия χ^2 Пирсона. Использованы инструменты программного обеспечения Statistica 12, таблицы сопряженности 2×2. Показатель статистической значимости составил $p<0,05$ при малом размере эффекта $d=0,2$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявлена ассоциация аллеля rs1801133*C и генотипа rs1801133*C/C гена *MTHFR* с невынашиванием беременности ($\chi^2=3,3$; $p=0,03$ (OR 1,69; 95% ДИ 0,99—2,87). Обнаружена тенденция к ассоциации аллеля rs1805087*A и генотипа rs1805087*A/A гена *MTR* с бесплодием ($p=0,06$). Необходимо увеличение выборок в группах исследования и контроля для достижения статистической значимости **(табл. 1, 2)**.

Проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* между пациентками с бесплодием, имеющими «бедный» ответ на стимуляцию

Таблица 1. **Анализ распределения частот аллелей и генотипов изученных локусов кандидатных генов у женщин с бесплодием, невынашиванием беременности и другой патологией**

Table 1. **Analysis of the distribution of allele and genotype frequencies of the studied candidate gene loci in women with infertility, miscarriage and other pathologies**

Популяция	*n*	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
			MTHFR.rs1801133			
Выборка	*n*	C	T	C/C	C/T	T/T
Бесплодие	66	86 (0,652)	46 (0,348)	30 (0,455)	26 (0,394)	10 (0,151)
*Невынашивание беременности	53	78 (0,736)	28 (0,264)	29 (0,547)	20 (0,377)	4 (0,076)
Все остальные	86	107 (0,622)	65 (0,378)	34 (0,395)	39 (0,453)	13 (0,152)
		$\chi^2=3,33$; $p=0,03$ (OR 1,69; 95% ДИ 0,99—2,87)		$\chi^2=3,05$; $p=0,04$ (OR 1,85; 95% ДИ 0,92—3,69)		
			MTHFR.rs1801131			
Выборка	*n*	C	A	C/C	A/C	A/A
Бесплодие	52	32 (0,308)	72 (0,692)	6 (0,115)	20 (0,385)	26 (0,5)
Невынашивание беременности	37	24 (0,324)	50 (0,676)	2 (0,054)	20 (0,541)	15 (0,405)
Все остальные	57	34 (0,298)	80 (0,702)	5 (0,088)	24 (0,421)	28 (0,491)
			MTR.rs1805087			
Выборка	*n*	A	G	A/A	A/G	G/G
Бесплодие $p=0,06$	50	67 (0,67)	33 (0,33)	21 (0,42)	25 (0,5)	4 (0,08)
Невынашивание беременности	34	52 (0,765)	16 (0,235)	20 (0,588)	12 (0,353)	2 (0,059)
Все остальные	52	80 (0,769)	24 (0,231)	30 (0,577)	20 (0,385)	2 (0,038)
			MTRR.rs1801394			
Выборка	*n*	G	A	G/G	G/A	A/A
Бесплодие	48	54 (0,563)	42 (0,437)	16 (0,333)	22 (0,458)	10 (0,208)
Невынашивание беременности	32	37 (0,578)	27 (0,422)	11 (0,343)	15 (0,469)	6 (0,188)
Все остальные	50	51 (0,51)	49 (0,49)	14 (0,280)	23 (0,460)	13 (0,260)

Примечание. Частоты аллелей и генотипов представлены в абсолютных числах и в относительных долях (%). *n* — количество индивидов; χ^2 — критерий хи-квадрат Пирсона; *p* — достигаемый уровень значимости (статистически значимый при $p<0,05$); OR — относительный риск.

Таблица 2. **Анализ распределения частот аллелей и генотипов изученных локусов кандидатных генов у женщин с различным ответом на стимуляцию овуляции**

Table 2. **Analysis of the frequency distribution of alleles and genotypes of the studied loci of candidate genes in women with different responses to ovulation stimulation**

Популяция	*n*	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
			MTHFR.rs1801133			
Выборка	*n*	C	T	C/C	C/T	T/T
«Бедный» ответ	15	18 (0,6)	12 (0,4)	6 (0,4)	6 (0,4)	3 (0,2)
Норма	68	88 (0,647)	35 (0,353)	38 (0,559)	25 (0,368)	5 (0,073)
Гиперстимуляция	13	22 (0,846)	4 (0,154)	10 (0,769)	2 (0,154)	1 (0,077)
			MTHFR.rs1801131			
Выборка	*n*	C	A	C/C	C/A	A/A
«Бедный»	16	9 (0,281)	23 (0,719)	2 (0,125)	5 (0,313)	9 (0,562)
Норма	52	31 (0,298)	73 (0,702)	6 (0,115)	19 (0,365)	27 (0,52)
Гиперстимуляция	14	8 (0,286)	20 (0,714)	1 (0,071)	6 (0,429)	7 (0,5)
			MTR.rs1805087			
Выборка	*n*	A	G	A/A	A/G	G/G
«Бедный» ответ	15	21 (0,7)	9 (0,3)	6 (0,4)	9 (0,6)	0
Норма	50	73 (0,73)	27 (0,27)	25 (0,5)	23 (0,46)	2 (0,04)
Гиперстимуляция	13	21 (0,808)	5 (0,192)	9 (0,692)	3 (0,231)	1 (0,077)
			MTRR.rs1801394			
Выборка	*n*	A	G	A/A	A/G	G/G
«Бедный» ответ	13	9 (0,346)	17 (0,654)	1 (0,077)	7 (0,538)	5 (0,385)
Норма	50	49 (0,49)	51 (0,51)	12 (0,24)	25 (0,5)	13 (0,26)
Гиперстимуляция	13	12 (0,462)	14 (0,538)	4 (0,308)	4 (0,308)	5 (0,384)

Таблица 3. **Уровень гомоцистеина у пациенток в зависимости от варианта ответа на стимуляцию овуляции**

Table 3. **The level of homocysteine in patients depending on the response to ovulation stimulation**

Группа	M	Me	Min	Max	Q25	Q75	SD
Низкая чувствительность	9,418	8,54	5,4	19,1	6,39	10,4	3,82
Норма	8,429	7,665	3,3	19,0	6,64	9,85	3,182
Гиперстимуляция	9,046	8,49	5,9	15,9	6,987	10,33	2,584
H=1,883; p=0,39; χ^2=3,88; df=2; p=0,144							

овуляции, гиперответ на стимуляцию овуляции, и пациентками с бесплодием, имеющими нормальный ответ на стимуляцию овуляции. В группах женщин с бесплодием и разным ответом на стимуляцию овуляции статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* не выявлены. При исследовании уровня гомоцистеина в группах женщин с бесплодием и различным ответом на стимуляцию овуляции статистически значимых различий по уровню гомоцистеина не было **(табл. 3, рис. 1)**.

Проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* между пациентками с бесплодием, связанным с мужским и трубным факторами, а также с другими причинами бесплодия. Статистически значимых различий между группами не выявлено, однако отмечена тенденция к ассоциации аллеля rs1801133*T гена *MTHFR* (χ^2=1,68; p=0,09) **(табл. 4)**.

Проведен сравнительный анализ уровня гомоцистеина у женщин в исследуемых группах. Статисти-

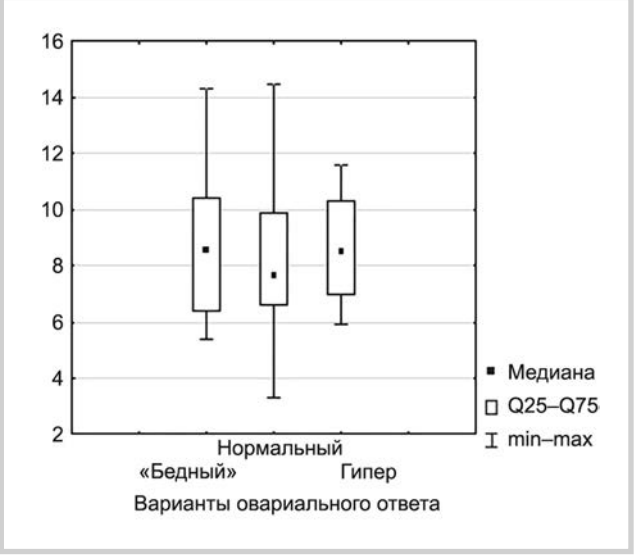

Рис. 1. **Уровень гомоцистеина у женщин с бесплодием и различным ответом яичников.**

Fig. 1. **Homocysteine levels in women with infertility and variable ovarian response.**

Таблица 4. **Анализ распределения частот аллелей и генотипов изученных локусов кандидатных генов у женщин с бесплодием различного генеза**

Table 4. **Analysis of the frequency distribution of alleles and genotypes of the studied loci of candidate genes in women with infertility of various origins**

Популяция	*n*	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
			MTHFR.rs1801133			
Выборка	*n*	C	T	C/C	C/T	T/T
Бесплодие, остальные виды	62	88 (0,709)	36 (0,291)	33 (0,532)	22 (0,355)	7 (0,113)
Трубное+мужской фактор	38	61 (0,803)	15 (0,197)	24 (0,632)	13 (0,342)	1 (0,026)
			MTHFR.rs1801131			
Выборка	*n*	C	A	C/C	C/A	A/A
Бесплодие, остальные виды	53	30 (0,291)	76 (0,709)	5 (0,094)	20 (0,377)	28 (0,529)
Трубное+мужской фактор	32	20 (0,323)	44 (0,677)	4(0,125)	12 (0,375)	16 (0,5)
			MTR.rs1805087			
Выборка	*n*	A	G	A/A	A/G	G/G
Бесплодие, остальные виды	52	75 (0,721)	29 (0,279)	26 (0,5)	23 (0,442)	3 (0,058)
Трубное+мужской фактор	30	45 (0,75)	15 (0,25)	16 (0,533)	13 (0,433)	1 (0,034)
			MTRR.rs1801394			
Выборка	*n*	A	G	A/A	A/G	G/G
Бесплодие, остальные виды	49	48 (0,489)	50 (0,511)	12 (0,245)	24 (0,489)	13 (0,266)
Трубное+мужской фактор	30	26 (0,433)	34 (0,567)	6 (0,2)	14 (0,467)	10 (0,333)

Таблица 5. **Уровень гомоцистеина у пациенток в зависимости от причин бесплодия**

Table 5. **The level of homocysteine in patients depending on the causes of infertility**

Группа	M	Me	Min	Max	Q25	Q75	SD
Бесплодие, остальные виды	8,95	8,1	3,4	19,0	7,052	9,9	3,09
Трубное+мужской фактор	8,499	7,9	3,3	19,1	5,7	10,4	3,5

чески значимых различий между группами по данному признаку не было (U=1130,5; Z=0,943; p=0,345) **(табл. 5, рис. 2)**.

Проведен поиск ассоциаций исследованных локусов с гипергомоцистеинемией. Выявлена ассоциация аллеля rs1801133*T гена *MTHFR* с повышенным уровнем гомоцистеина (χ^2=3,81; p=0,025; OR 2,696; 95% ДИ 1,09—6,65). Выявлена ассоциация аллеля rs1805087*G гена *MTR* с повышением уровня гомоцистеина (χ^2=4,07; p=0,02; OR 2,76; 95% ДИ 1,12—6,81). Генотип A/A данного локуса оказался протективным в отношении гипергомоцистеинемии (χ^2=2,798; p=0,047; OR 0,259; 95% ДИ 0,064—1,048) **(табл. 6, 7)**.

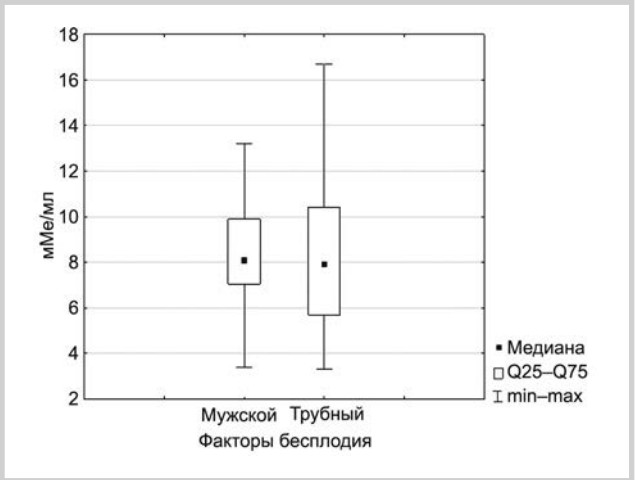

Рис. 2. **Уровень гомоцистеина у женщин с мужским и трубным факторами бесплодия.**

Fig. 2. **The level of homocysteine in women with male and tubal factors of infertility.**

Появляется все больше доказательств того, что статус фолиевой кислоты и вариации в генах, метаболизирующих фолиевую кислоту, участвуют в репродуктивной функции женщин [20]. Есть исследования, в которых показано, что у женщин, прошедших процедуру ЭКО, эффект фолиевой кислоты наиболее заметен во время раннего развития фолликулов, отмечено воздействие на незрелые фолликулы [21].

Нами проведено исследование взаимной связи полиморфизма генов фолатного цикла у пациенток с невынашиванием беременности и бесплодием, получавших лечение методом ЭКО в ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр (Уфа). Полученные результаты показали ассоциацию гена *MTHFR* с невынашиванием беременности и бесплодием. Выявлена ассоциация гена MTR с гипергомоцистеинемией, что подтверждает связь фолатного цикла с репродуктивными расстройствами. Необходимо отметить, что влияние полиморфизма *MTHFR* C677T на качество эмбрионов и частоту наступления беременности после циклов ВРТ остается неясным.

Таблица 6. **Оценка распределения частот аллелей и генотипов изученных локусов кандидатных генов у женщин в зависимости от уровня гомоцистеина**

Table 6. **Estimation of the distribution of allele and genotype frequencies of the studied loci of candidate genes in women depending on the level of homocysteine**

Популяция	*n*	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
			MTHFR.rs1801133			
Выборка	*n*	C	T	C/C	C/T	T/T
Гипергомоцистеинемия	12	14 (0,583)	10 (0,417)	5 (0,417)	4 (0,333)	3 (0,25)
Норма	74	117 (0,791)	31 (0,209)	46 (0,622)	25 (0,338)	3 (0,04)
—	—	χ^2=3,81; *p*=0,025; (OR 2,696; 95% ДИ 1,09—6,65)		—	—	χ^2=4,126; *p*=0,02; (OR 7,89; 95% ДИ 1,38—45,13)
			MTHFR.rs1801131			
Выборка	*n*	C	A	C/C	C/A	A/A
Гипергомоцистеинемия	12	6 (0,25)	18 (0,75)	1 (0,083)	4 (0,333)	7 (0,584)
Норма	66	39 (0,295)	93 (0,705)	7 (0,106)	25 (0,379)	34 (0,515)
			MTR.rs1805087			
Выборка	*n*	A	G	A/A	A/G	G/G
Гипергомоцистеинемия	12	13 (0,542)	11 (0,458)	3 (0,25)	7 (0,583)	2 (0,167)
Норма	64	98 (0,766)	30 (0,234)	36 (0,563)	26 (0,406)	2 (0,031)
—	—	χ^2=4,07; *p*=0,02; (OR 2,76; 95% ДИ 1,12—6,81)		χ^2=2,798; *p*=0,047; (OR 0,259; 95% ДИ 0,064—1,048) протективный	—	—
			MTRR.rs1801394			
Выборка		A	G	AA	AG	GG
Гипергомоцистеинемия	11	9 (0,409)	13 (0,591)	2 (0,182)	5 (0,455)	4 (0,363)
Норма	62	57 (0,459)	67 (0,541)	14 (0,226)	29 (0,468)	19 (0,306)

Таблица 7. **Уровень гомоцистеина у обследованных пациенток**

Table 7. **The level of homocysteine in the examined patients**

Группа	M	Me	Min	Max	Q25	Q75	SD
Гипергомоцистеинемия (*n*=14)	15,293	14,85	12,5	19,1	13,2	17,0	2,232
Норма (*n*=74)	7,72	7,6	3,4	11,9	6,7	8,6	1,76

Кроме того, известно, что не существует связи между мутацией *MTHFR* (C677T и A1298C) и результатами ЭКО, таким образом, авторы исследования не рекомендовали это исследование для первоначального скрининга [22]. Исследование S. Altmäe и соавт. показывает, что полиморфизм в генах метаболизма фолиевой кислоты может быть причиной бесплодия неясного генеза. В нашем исследовании у женщин с бесплодием и различным ответом на стимуляцию овуляции статистически значимые различия по аллелям и генотипам полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* не выявлены.

Кроме того, есть данные, которые показывают, что у пациенток старшего репродуктивного возраста мутация *MTHFR* 677C>T влияет на ответ яичников [23]; этим пациенткам требуется меньше рекомбинантного ФСГ и в ответ получается больше ооцитов. Однако в другом исследовании не выявлена корреляция между вариацией 677C/T и исходом гормональной стимуляции яичников, а вместо этого обнаружен полиморфизм *MTHFR* 1298A/C, где аллель A связана с лучшим ответом яичников на гормональную стимуляцию [24]. В исследовании M. Dulitzky и соавт. аллель варианта 677 T связана с СГЯ [24], исследование S. Machac и соавт. с большой выборкой, этот вывод не подтвердили [25]. Следует отметить, что большинство женщин, проходящих лечение от бесплодия, принимают добавки фолиевой кислоты. Известно, что люди, несущие аллель T MTHFR 677, имеют повышенные концентрации гомоцистеина в плазме, а при дополнительном введении фолиевой кислоты они могут достигать нормальных концентраций гомоцистеина, причем некоторые авторы показали, что полиморфизм *MTHFR* A1298C, но не полиморфизм C677T, связан с более высокими базальными уровнями ФСГ и может быть определяющим фактором ответа на стимуляцию яичников; эти результаты убедительно доказывают, что полиморфизм *MTHFR* A1298C модулирует фолликулогенез [23]. Учитывая участие в фолликулогенезе фолиевой кислоты, гомоцистеина и вариаций генов, метаболизирующих фолиевую кислоту, можно заключить,

что эти полиморфизмы являются интересными кандидатами в биомаркеры, и их значение в вариациях ответа контролируемой стимуляции овуляции требует дальнейшего изучения.

Таким образом, полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о необходимости детальной проработки проблем, связанных с гипергомоцистеинемией как маркера метаболических изменений, в частности гормональных нарушений, для оптимизации ведения пациентов с бесплодием перед проведением ВРТ.

ВЫВОДЫ

Полученные нами данные свидетельствуют о роли полиморфизма генов фолатного цикла у пациентов с бесплодием и невынашиванием беременности. Нами выявлена ассоциация аллеля rs1801133*C и генотипа rs1801133*C/C гена *MTHFR* с невынашиванием беременности. Обнаружена тенденция к ассоциации аллеля rs1805087*A и генотипа rs1805087*A/A гена *MTR* с бесплодием. Возможно, при увеличении выборок для групп исследования и контроля различия окажутся более значимыми. Отмечается тенденция к ассоциации аллеля rs1801133*T гена *MTHFR* с бесплодием различного генеза. Выявлена ассоциация аллеля rs1801133*T гена *MTHFR* и аллеля rs1805087*G гена *MTR* с повышением уровня гомоцистеина. Генотип rs1805087*A/A гена *MTR* оказался протективным в отношении гипергомоцистеинемии. В группах женщин с бесплодием и вариантами ответа на стимуляцию овуляции степень отклонения статистически значимых различий по распределению частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* не обнаружена, а также не выявлены статистически значимые различия при исследовании уровня гомоцистеина у женщин с бесплодием и с разным ответом на стимуляцию овуляции.

Участие авторов:
Концепция и дизайн исследования — Сугурова А.Т., Хусаинова Р.И.
Сбор и обработка материала — Сугурова А.Т., Тюрина А.А.
Статистический анализ данных — Сугурова А.Т., Тюрина А.А.
Написание текста — Сугурова А.Т., Хусаинова Р.И.
Редактирование — Хусаинова Р.И., Тюрина А.А., Ялаев Б.И., Харисова З.И., Ящук А.Г.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Drakopoulos P, Bardhi E, Boudry L, Vaiarelli A, Makrigiannakis A, Esteves SC, Tournaye H, Blockeel C. Update on the management of poor ovarian response in IVF: the shift from Bologna criteria to the Poseidon concept. *Therapeutic Advances in Reproductive Health*. 2020;14:2633494120941480. https://doi.org/10.1177/2633494120941480
2. Broer S, Dolleman M, Opmeer B, Fauser B, Mol B, Broekmans F. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Human Reproduction*. 2011;17(1):46-54. https://doi.org/10.1093/humupd/dmq034
3. Humaidan P, Ejdrup H, Westergaard G, Andersen C. 1,500 IU human chorionic gonadotropin administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase when gonadotropin-releasing hormone agonist is used for ovulation induction: a prospective, randomized, controlled study. *Fertility and Sterility*. 2010;93(3):847-854. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.042
4. Mfady DS, Sadiq MF, Khabour OF, Fararjeh AS, Abu-Awad A, Khader Y. Associations of variants in MTHFR and MTRR genes with male infertility in the Jordanian population. *Gene*. 2014; 536(1):4-40. https://doi.org/10.1016/j.gene. 2013.12.001
5. Singh N, Malik E, Banerjee A, Chosdol K. Anti-Mullerian hormone: marker for ovarian response in controlled ovarian stimulation for IVF patients: A first pilot study in the Indian population. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*. 2013;63(4):268-272. https://doi.org/10.1007/s13224-012-0318-6
6. Shahrokhi S, Kazerouni F, Ghaffari F, Rahimipour A, Omrani M, Arabipoor A, Lak R, Ghane E. The relationship between the MTHFR C677T genotypes to serum Anti-Müllerian hormone concentrations and *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2017;63(5):927-934. https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.161104
7. Shahrokhi S, Kazerouni F, Ghaffari F. Anti-Müllerian hormone: genetic and environmental effects. *Clinica Chimica Acta*. 2018;476: 123-129. https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.027
8. Shahrokhi S, Kazerouni A, Hadizadeh M, Zolfaghary Z. The effect of A1298c polymorphism of the MTHFR gene on anti-Müllerian hormone levels: experimental and web-based analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(9):e23948. https://doi.org/10.1002/jcla.23948
9. Chen L, Chen H, Wang X, Wei B, Wu Z, Chen S, Wang B, Huang H, Jin L. Association of homocysteine with IVF/ICSI outcomes stratified by MTHFR C677T polymorphisms: a prospective cohort study. *Reproduction Biomedicine Online*. 2021;43(1):52-61. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.04.009
10. Deroux A, Dumestre-Perard C, Dunand-Faure C, Bouillet L, Hoffmann P. Female infertility and serum auto-antibodies: a systematic review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2017; 53(1):78-86. https://doi.org/10.1007/s12016-016-8586-z
11. Hou N, Chen S, Chen F, Jiang M, Zhang J, Yang Y, Zhu B, Bai X, Hu Y, Huang H, Xu C. Association between premature ovarian failure, polymorphisms in MTHFR and MTRR genes and serum homocysteine concentration. *Reproductive Biomedicine Online*. 2016; 32(4):407-413. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.01.009
12. Das V, Misra D, Agrawal S, Agrawal A, Pandey A. Hyperhomocysteinemia and MTHFR gene 677 C>T polymorphism: questionable

role in female infertility. *The International Journal of Contraception, Obstetrics and Gynaecology*. 2015;4(3):683-689. https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20150074

13. Ebisch I, Thomas C, Peters W, Braat D, Steegers-Theunissen R. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction*. 2007;13(2): 163-174. https://doi.org/10.1093/humupd/dml054
14. Berker B, Kaya C, Aytac R, Satiroglu H. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2009; 24(9):2293-2302. https://doi.org/10.1093/humrep/dep069
15. Rah H, Jeon YJ, Choi Y, Shim SH, Yoon TK, Choi DH, Cha SH, Kim NK. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) and thymidylate synthase (TSER and TS 1494del6) polymorphisms with premature ovarian failure in Korean women. *Menopause*. 2012;19(11):1260-1266. https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3182556b08
16. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3290-3295. https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3290
17. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the framingham offspring cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;73(3):613-621. https://doi.org/10.1093/ ajcn/73.3.613
18. Enciso M, Sarasa J, Xanthopoulou L, Bristow S, Bowles M, Fragouli E, Delhanty J, Wells D. Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Human Genetics*. 2016;135(5):555-568. https://doi.org/10.1007/s00439-016-1652-z
19. Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutrition Reviews*. 2010; 68(2):99-113. https://doi.org/10.1111/j. 1753-4887. 2009.00266.x
20. Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, Beckers NG, Visser JA, Lindemans J, de Jong FH, Laven JS, Steegers-Theunissen RP. Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *The Journal of Clinical Endocrinology*. 2011; 96(2):322-329. https://doi.org/10.1210/jc.2010-1282
21. Shahrokhi SZ, Kazerouni F, Ghaffari F, Hadizadeh M, Zolfaghary Z. The effect of A1298c polymorphism of the MTHFR gene on anti-Müllerian hormone levels: experimental and web-based analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(9):120-122. https://doi.org/10.1002/jcla.23948
22. Altmäe S, Stavreus-Evers A, Ruiz JR, Laanpere M, Syvänen T, Yngve A, Salumets A, Nilsson TK. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertility and Sterility*. 2010;94(1):130-137. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.025
23. Rosen M, Shen S, McCulloch S, Rinaudo P, Cedars M, Dobson A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertility and Sterility*. 2007;88(3):632-638. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.165
24. Dulitzky M, Cohen S, Inbal A, Seidman D, Soriano D, Lidor A, Mashiach S, Rabinovici J. Increased prevalence of thrombophilia among women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*. 2002;77(3):463-467. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03218-6
25. Machac S, Lubusky M, Prochazka M, Streda R. Prevalence of inherited thrombophilia in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2006;150(2):289-292. https://doi.org/10.5507/bp.2006

Поступила 15.10.2022
Received 15.10.2022
Принята к печати 08.11.2022
Accepted 08.11.2022