

© М. А. Уварова, А. В. Иванов, 2016  
УДК 618.17

М. А. Уварова<sup>1</sup>

А. В. Иванов<sup>1,2</sup>  
канд. биол. наук

<sup>1</sup> Северо-Западный центр доказательной медицины, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Университетская клиника Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербургский многопрофильный центр Минздрава России)

## Влияние трех одиночных нуклеотидных полиморфизмов генов цикла фолиевой кислоты на развитие нарушений женской репродуктивной системы

В настоящее время значительную часть репродуктивных нарушений, таких как привычное невынашивание беременности (ПНБ), бесплодие, отсутствие успеха экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), связывают с различными генетическими факторами. Одним из основных наследственных факторов риска развития акушерской патологии является наличие полиморфных аллелей в нескольких генах цикла фолиевой кислоты. Настоящее исследование посвящено изучению влияния полиморфных вариантов генов цикла фолиевой кислоты *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* и *MTRR A66G* на развитие ПНБ и неудачи ЭКО. Были исследованы образцы периферической крови у 138 женщин, в результате показано статистически значимое увеличение частоты патологических аллелей генов *MTRR A66G* и *MTHFR C677T* в двух группах с репродуктивными проблемами ПНБ и неудачами ЭКО по сравнению с контрольной группой. Также показано преимущество одновременного анализа сразу трех полиморфизмов генов фолатного цикла у женщин с нарушением репродуктивной функции по сравнению с анализом изолированного полиморфизма *MTHFR C677T*. Сочетание полиморфных аллелей имеет большее влияние на развитие патологии и во много раз повышает риск развития ПНБ и частоту неудач ЭКО.

**Ключевые слова:** невынашивание беременности, неудачи экстракорпорального оплодотворения, SNP, цикл фолиевой кислоты

За последнее время неоднократно было отмечено значительное увеличение риска развития акушерских патологий, связанных с повышенным уровнем гомоцистеина в крови, при наличии патологических полиморфных аллелей в нескольких генах цикла фолиевой кислоты [1]. Для полиморфизма генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR* показана ассоциация с репродуктивной патологией, и в частности с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и неудачами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

Целью настоящего исследования стало определение влияния полиморфных вариантов генов цикла фолиевой кислоты *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* и *MTRR A66G* на развитие ПНБ и неудачи ЭКО.

Задачи исследования:

1) определение частот аллелей и генотипов генов цикла фолиевой кислоты *MTR A2756G*, *MTRR A66G* и *MTHFR C677T* у здоровых жен-

щин и у женщин с репродуктивными проблемами (ПНБ и неудачи ЭКО);

2) сравнение частоты аллелей и генотипов генов цикла фолиевой кислоты *MTR A2756G*, *MTRR A66G* и *MTHFR C677T* у двух групп женщин — с ПНБ, с неудачами ЭКО и у контрольной группы женщин, имевших одну и более нормально протекающую беременность;

3) оценка совместного влияния комбинаций полиморфных аллелей генов *MTR A2756G*, *MTRR A66G* и *MTHFR C677T* на риск развития невынашивания беременности и исход ЭКО.

Для реализации поставленных задач в рамках данного исследования всем пациенткам были определены частоты аллелей и генотипов трех полиморфизмов в трех генах фолатного цикла: *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756 A>G*, *MTRR 66 A>G*.

### Материалы и методы

Всего были обследованы 138 женщин, у которых получено добровольное согласие. Материалом для анализа служили образцы венозной крови, полученные путем пункции локтевой вены в вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА.

Андрей Владимирович Иванов  
e-mail: anivanov@omrb.pnpi.spb.ru

Были сформированы три группы:

- 1-я — 37 пациенток с ПНБ, имевших в анамнезе не менее двух случаев спонтанного аборта или неразвивающейся беременности в I триместре;

- 2-я — 55 женщин с неудачной попыткой ЭКО, в результате которой не регистрировали имплантации эмбриона или происходило прерывание беременности на раннем сроке после переноса эмбрионов; критерии исключения — анатомические аномалии половой системы, тяжелые нарушения эндокринной системы, острый инфекционный процесс;

- контрольная группа — 46 фертильных женщин 22–42 лет с практически здоровой репродуктивной системой, имеющих как минимум одного здорового ребенка.

Всем пациенткам были определены частоты аллелей и генотипов трех полиморфизмов в трех генах фолатного цикла: *MTHFR 677C>T*, *MTR 2756 A>G*, *MTRR 66 A>G*.

Выделение ДНК проводили из лейкоцитов периферической крови с помощью набора реагентов и протокола для выделения ДНК «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ «Литех», Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация геномной ДНК, полученной в ходе выделения вышеописанным методом, составляла 20–100 нг.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», Москва).

Амплификацию анализируемых проб проводили в 96-луночных планшетах (Hard-Shell, Bio-Rad) на циклере T100 Thermal Cycler, Bio-Rad по следующей программе: первичная денатурация 94° — 1 мин, затем 35 циклов — денатурация 94° — 10 с, отжиг праймеров 68° — 30 с, синтез ДНК 20 с, в заключение следовал синтез ДНК 72° — 1 мин.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3 % агарозном геле («Хеликон», Москва) с 0,1 % этидием бромидом в электрофоретической камере (Sub-Cell GT Cell, Bio-Rad) при напряжении 130 В. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляли по движению полосы красителя от старта на 1,5–2 см.

Результаты электрофореза визуализированы при УФ-облучении (длина волны 310 нм) в трансиллюминаторе (ESX-F15.C, Vilber Lourmat). Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Statistica 10, Microsoft Excel и Калькулятора для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль», предоставляемым сайтом ГНЦРФ «ГосНИИ генетика» (<http://www.gen-expert.ru>).

Статистическую оценку достоверности различий в распределении частот полиморфных аллелей и генотипов между исследованными выборками, выявление ассоциаций генотипа с развитием заболевания проводили стандартным методом  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность (при  $p < 0,05$  результаты считали статистически значимыми).

Для описания относительного риска развития заболевания рассчитывали *OR*.

### Результаты и обсуждение

Выявлено, что доля полиморфного аллеля 677T гена *MTHFR* достоверно выше у женщин с неудачей ЭКО и с ПНБ — 40 % ( $p=0,0003$ ,  $OR=3,55$  (1,77–7,14)) и 44,6 % ( $p=0,0009$ ,  $OR=2,94$  (1,54–5,63)) против 18,5 % в контрольной группе (табл. 1).

При анализе частоты полиморфных аллелей в других генах цикла фолиевой кислоты выявлены достоверные различия в частоте аллеля 66G гена *MTRR* между группами: в группах ПНБ и неудачи ЭКО — 59,5 % ( $p=0,03$ ,  $OR=1,99$  (1,07–3,7)) и 59,1 % ( $p=0,02$ ,  $OR=1,96$  (1,12–3,44)), соответственно; в контрольной группе — 42,4 % (см. табл. 1).

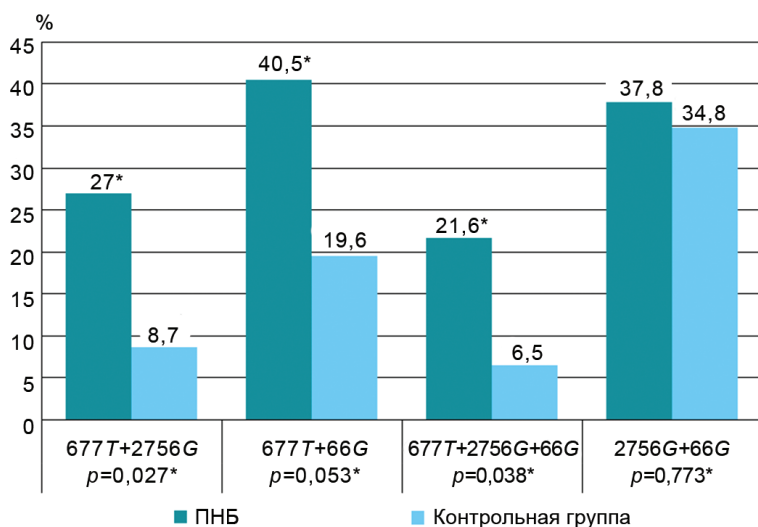
Из представленных результатов видно, что в контрольной группе частота встречаемости благоприятного аллеля C гена *MTHFR* превалирует над частотой аллеля T (81,5 % — в контрольной группе; 55,4 и 60 % — в группах ПНБ и неудачи ЭКО, соответственно).

Для гена *MTR* значительных различий в частоте аллелей 2756A и 2756G в исследуемых группах не выявлено.

Следующим шагом стала оценка распределения генотипов по изучаемым полиморфизмам (табл. 2). Было выявлено, какая форма мутации (гомозиготная или гетерозиготная) и в какой степени может влиять на развитие ПНБ и неудачи ЭКО.

Полученные результаты показали, что у женщин с неудачей ЭКО и с ПНБ достоверно реже встречался благоприятный гомозиготный генотип (C/C) — 36,4 и 32,4 % по сравнению с контрольной группой (67,4 %).

Полиморфизм гена *MTHFR* C677T достоверно чаще встречался у женщин с ПНБ и с неуда-

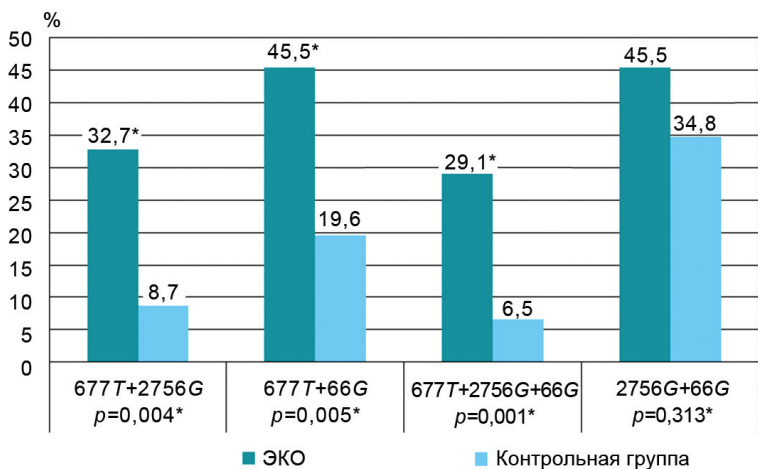


**Рис. 1. Комбинации полиморфных аллелей генов фолатного цикла MTR A2756G, MTRR A66G и MTHFR C677T у женщин с ПНБ и в контрольной группе; здесь и на рис. 2: \* статистически достоверная разница в частоте генотипов у исследованных групп ( $p < 0,05$ )**

чей ЭКО по сравнению с контрольной группой. В выборке пациенток с неудачей ЭКО эти различия характерны были как для гомозиготной формы данного полиморфизма, так и для гетерозиготной.

Доля гетерозиготной формы составила 47,3 % в группе с неудачей ЭКО ( $p=0,049$ ,  $OR=2,28$  (0,99–5,23)) и 28,3 % — в контрольной группе. Гомозиготная форма была определена у 21,6 % женщин с ПНБ ( $p=0,016$ ,  $OR=5,9$  (1,2–30,6)) и у 16,4 % женщин с неудачей ЭКО ( $p=0,051$ ,  $OR=4,3$  (0,88–21,04)) против 4,3 % — в контрольной группе.

При сравнительном анализе частоты генотипов A66G полиморфизма гена MTRR в об-



**Рис. 2. Комбинации полиморфных аллелей генов фолатного цикла MTR A2756G, MTRR A66G и MTHFR C677T у женщин с неудачей ЭКО и в контрольной группе**

разцах крови у здоровых женщин и у пациенток с репродуктивными нарушениями было показано, что у последних достоверно реже встречался благоприятный гомозиготный генотип (A/A). Частота встречаемости генотипа A66G в группе с ПНБ составила 16,2 % ( $p=0,029$ ), в группе неудачи ЭКО — 16,4 % ( $p=0,013$ ), в то время как в контрольной — 39,1 %. Частота гетерозигот A/G в группах обследуемых достоверных отличий не имела.

Достоверных различий между группами с ПНБ и с неудачей ЭКО в частоте аллелей гена MTRR не выявлено. Что касается полиморфизма A2756G гена MTR, то статистически значимых различий в частоте генотипов в изучаемых группах обнаружено не было. Частота генотипов A/A и A/G встречалась примерно с одинаковой частотой во всех изучаемых группах. Генотип G/G встречался очень редко.

Все исследованные ферменты MTR, MTRR и MTHFR вместе задействованы в цикле фолевой кислоты и поэтому высоко вероятно наличие генных взаимодействий. Для адекватной оценки сочетанного влияния нескольких мутаций на развитие ПНБ и исход ЭКО, мы проанализировали разные комбинации сочетания полиморфных аллелей генов MTHFR, MTR, MTRR (рис. 1, 2).

У женщин с ПНБ по сравнению с женщинами контрольной группы достоверно чаще встречалось сочетание двух низкофункциональных аллелей 677T и 2756G в генах MTHFR и MTR (27 % против 8,7 %, соответственно,  $p=0,027$ ,  $OR=3,89$  (1,11–13,66)), а также более частым оказалось сочетание аллелей 677T и 66G в генах MTHFR и MTRR (40,5 % против 19,6 %). Наличие этих мутаций примерно в 3,3 раза увеличивает риск развития ПНБ ( $OR=2,8$  (1,05–7,47)).

Сочетание трех неблагоприятных аллелей 66G, 677T и 2756G ( $p=0,038$ ) достоверно чаще встречается у женщин с ПНБ (21,6 и 6,5 %) и увеличивает риск развития невынашивания почти в 4 раза ( $OR=4,1$  (1–16,77)).

Таблица 1

## Частота аллелей у женщин обследованных групп

Алель	ПНБ, % (n=37)	Контрольная группа, % (n= 46)	p	OR	
				результат	95% CI
MTHFR 677C	55,4	81,5	0,0003	0,28	0,14–0,57
MTHFR 677T	44,6	18,5	—	3,55	1,77–7,14
MTR 2756A	66,2	72,8	0,36	0,73	0,38–1,42
MTR 2756G	33,8	27,2	—	1,37	0,7–2,66
MTRR 66A	40,5	57,6	0,03	0,5	0,27–0,93
MTRR 66G	59,5	42,4	—	1,99	1,07–3,71
Алель	ЭКО, % (n=55)	Контрольная группа, % (n= 46)	p	OR	
				результат	95% CI
MTHFR 677C	60	81,5	0,0009	0,34	0,18–0,65
MTHFR 677T	40	18,5	—	2,94	1,54–5,63
MTR 2756A	72,7	72,8	0,99	1	0,53–1,85
MTR 2756G	27,3	27,2	—	1,01	0,54–1,87
MTRR 66A	40,9	57,6	0,02	0,51	0,29–0,89
MTRR 66G	59,1	42,4	—	1,96	1,12–3,44

Таблица 2

## Распределение генотипов полиморфизмов генов MTHFR, MTR и MTRR у женщин обследованных групп

Алель	Генотип	ПНБ, n=37		Контрольная группа, n=46		p	OR	
		абс. число	%	абс. число	%		результат	95% CI
MTHFR C677T	C/C	12	32,4	31	67,4	0,002	0,2	0,09–0,59
	C/T	17	45,9	13	28,3	0,096	2,2	0,87–5,37
	T/T	8	21,6	2	4,3	0,016	5,9	1,2–30,6
	C/T+T/T	25	67,6	15	32,6	0,002	4,3	1,7–10,8
MTR A2756G	A/A	17	45,9	22	47,8	0,865	0,9	0,39–2,21
	A/G	15	40,5	23	50	0,266	0,7	0,28–1,64
	G/G	5	13,5	1	2,2	0,056	7	0,78–63,1
	A/G+G/G	20	54,1	24	52,2	0,687	1,1	0,45–2,57
MTRR A66G	A/A	6	16,2	18	39,1	0,029	0,3	0,11–0,87
	A/G	18	48,6	17	37	0,372	1,6	0,67–3,9
	G/G	13	35,1	11	23,9	0,332	1,7	0,66–4,49
	A/G+G/G	31	83,8	28	60,9	0,029	3,3	1,16–9,55
Алель	Генотип	ЭКО, n=55		Контрольная группа, n=46		p	OR	
		абс. число	%	абс. число	%		результат	95% CI
MTHFR C677T	C/C	20	36,4	31	67,4	0,003	0,28	0,12–0,63
	C/T	26	47,3	13	28,3	0,049	2,28	0,99–5,23
	T/T	9	16,4	2	4,3	0,051	4,3	0,88–21,04
	C/T+T/T	35	63,6	15	32,6	0,003	3,62	1,58–8,26
MTR A2756G	A/A	27	49,1	22	47,8	0,899	1,05	0,48–2,3
	A/G	26	47,3	23	50	0,843	0,9	0,41–1,96
	G/G	2	3,6	1	2,2	1,000	1,7	0,43–2,08
	A/G+G/G	28	50,9	24	52,2	0,899	0,95	0,43–2,08
MTRR A66G	A/A	9	16,4	18	39,1	0,013	0,3	0,12–0,77
	A/G	27	49,1	17	37	0,221	1,64	0,74–3,66
	G/G	19	34,5	11	23,9	0,280	1,68	0,7–4,03
	A/G+G/G	46	83,6	28	60,9	0,013	3,29	1,3–8,31

Таблица 3

Комбинации полиморфных аллелей генов цикла фолиевой кислоты  
*MTR A2756G*, *MTRR A66G* и *MTHFR C677T* у женщин обследованных групп

Комбинация	ЭКО, n=55		ПНБ, n=37		P	OR	
	абс. число	%	абс. число	%		результат	95 % CI
677T+2756G	18	32,7	10	27	0,647	1,31	0,52–3,29
677T+66G	25	45,5	15	40,5	0,673	1,22	0,53–2,84
677T+2756G+66G	16	29,1	8	21,6	0,468	1,61	0,6–4,29
2756G+66G	25	45,5	14	37,8	0,523	1,37	0,58–3,2

У пациенток с неудачей ЭКО по отношению к контрольной группе выявлено достоверное увеличение частоты встречаемости тех же вариантов комбинаций, содержащих полиморфные аллели, что и в группе с ПНБ.

Между группами ЭКО и ПНБ достоверных различий по частоте встречаемости разных комбинаций полиморфных аллелей обнаружено не было (табл. 3).

В исследовании образцов периферической крови у женщин с ПНБ, с неудачей ЭКО и в контрольной выборке была определена частота аллелей в трех генах цикла фолиевой кислоты. В контрольной группе частота встречаемости аллеля 677C гена *MTHFR* превалировала над частотой аллеля 677T. Доля полиморфного аллеля 677T гена *MTHFR* была достоверно выше у женщин с неудачей ЭКО и с ПНБ.

Далее была проведена оценка распределения генотипов по изучаемым полиморфизмам у женщин с репродуктивными нарушениями и в контрольной группе. В группах с репродуктивными нарушениями достоверно реже встречался благоприятный гомозиготный генотип (C/C). Частота гомозигот по 677T аллелю (T/T) в группах с ПНБ и неудачей ЭКО намного превышала аналогичный показатель в контрольной группе. Частота гетерозигот (C/T) достоверно отличалась от контрольной группы только в группе с неудачей ЭКО. Совокупность генотипов, содержащих полиморфный аллель 677T в гомо- и гетерозиготном состоянии (C/T + T/T), также встречалась достоверно чаще у женщин с репродуктивными патологиями по сравнению с контрольной группой.

Полученные данные позволяют предположить, что наличие аллеля 677T повышает риск развития невынашивания беременности и неблагоприятного исхода ЭКО. Наблюдаемые тенденции согласуются с результатами предыдущих работ по изучению ассоциативных связей полиморфизмов генов фолатного обмена и развития нарушений эмбриогенеза человека. Согласно литературным данным, имеются явные противоречия в вопросе ассоциации носительства полиморфизма *C677T*

гена *MTHFR* с репродуктивными потерями. Некоторые из исследований обнаружили связь *MTHFR* с ПНБ [2–4], в то время как другие не показали никакой связи [5–7], что свидетельствует о роли некоторых факторов окружающей среды в проявлении действия *MTHFR*. В работах одних исследователей подтверждено, что наличие аллеля T гена *MTHFR* повышает риск привычной потери плода в 4–10 раз. В ряде исследований показана ассоциация полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* с бесплодием женщин неясного генеза [8].

Согласно литературным данным [9], невынашивание беременности ассоциируется с наличием аллеля 677T гена *MTHFR* не только у матери, но и у плода. Как показали исследования абортного материала, аллели *MTHFR* 677T и/или 1298C в гомо- или гетерозиготном состоянии увеличивают риск невынашивания беременности почти в 14 раз. Повышение уровня гомоцистеина нередко сопровождается развитием вторичных аутоиммунных реакций и в настоящее время рассматривается как одна из возможных причин развития антифосфолипидного синдрома [1]. Так, в исследовании бразильских ученых [4] у женщин с ПНБ в анамнезе и наличием антифосфолипидного синдрома частота аллеля 677T (40,3 %) была достоверно выше, чем в контрольной группе. Именно этот аллель рассматривается в качестве фактора, предрасполагающего к тромбозам при привычном невынашивании беременности.

Как именно *SNP* в гене *MTHFR* могут вызывать осложнения беременности, до конца неизвестно. Существует гипотеза, что высокая концентрация гомоцистеина вызывает повреждение эндотелия, приводящее к венозной тромбоэмболии и плацентарной недостаточности. В процессе развития эмбрион стимулирует ангиогенез и улучшает собственное кровоснабжение. Хороший обмен между плодом и матерью необходим для обеспечения нормального роста плода, поэтому нарушение васкуляризации ворсинок хориона может привести к эмбриональной гибели и выкидышу.

Частота генотипов и аллелей по *A66G* полиморфизму гена *MTRR* у пациенток обеих групп и у женщин контрольной группы достоверно различалась по частоте благоприятного гомозиготного генотипа (*A/A*), который встречался гораздо реже в группах с репродуктивными проблемами. Также в группах ПНБ и неудачи ЭКО достоверно чаще встречалась совокупность генотипов с полиморфным аллелем *66G*.

Для гена *MTR* значительных различий в частоте аллелей *2756A* и *2756G* в исследуемых группах не выявлено. Статистически значимых различий в частоте генотипов в изучаемых группах также обнаружено не было.

Роль полиморфизма *MTR A2756G* пока изучается, и их причастность к репродуктивным нарушениям еще до конца не ясна. Показано увеличение частоты аллеля *66A* гена *MTRR* и аллеля *2756G* гена *MTR* у женщин с преждевременными родами в анамнезе (после 22-й недели беременности) [10].

У пациенток с нарушением репродуктивной системы мы наблюдали увеличение доли комбинаций генотипов *677T+2756G*, *677T+66G*, а также сочетание трех неблагоприятных аллелей *677T+2756G+66G*. Общей особенностью этих сочетаний является то, что они содержат полиморфный вариант гена *MTHFR*. Таким образом, было показано, что значимой мутацией в плане формирования бесплодия является полиморфизм гена *MTHFR C677T*, а также сочетание данного полиморфизма с полиморфным вариантом гена *MTRR A66G*.

Из полученных результатов выявлено наличие достоверных различий по частоте разных комбинаций между группами с ПНБ и неудачей ЭКО по сравнению с контрольной группой. Однако достоверных отличий в частоте встречаемости комбинации аллелей *2756G* и *66G* в генах *MTR* и *MTRR* у женщин с репродуктивными патологиями и в контрольной группе в исследовании не выявлено, что, скорее, указывает на незначительность негативного влияния этих

аллелей и их сочетания на работу фолатного цикла. Это согласуется с литературными данными. Американские исследователи изучали влияние присутствия генотипов *AA*, *AG* и *GG* генов *MTR* и *MTRR* на развитие умеренной гипергомоцистеинемии и установили, что наличие полиморфизмов *A2756G* и *A66G* соответствующих генов не оказывает какого-либо эффекта на концентрацию гомоцистеина [11].

### Заключение

В результате проведенного исследования можно предположить, что наличие гомозиготной или гетерозиготной формы мутации гена *MTHFR* (генотип *677C/T* и *677T/T*), а также сочетание любой формы данной мутации с мутациями генов *MTRR* и *MTR* четко ассоциировано с увеличением риска развития привычного невынашивания беременности и со снижением эффективности программы ЭКО, что также подтверждается литературными данными. При наличии «функционально неблагоприятных» полиморфных аллелей в нескольких генах цикла фолиевой кислоты существенно возрастает риск преждевременного прерывания беременности.

Мутация гена *MTR* оказывает негативное влияние только в сочетании с мутациями в двух других генах. Это совпадает с данными литературы, что некоторые низкофункциональные аллели имеют большее влияние (*677T*, *66G*) по сравнению с другими (*2756G*) на развитие патологии, а их сочетание во много раз повышает риск привычного невынашивания беременности.

Всем пациенткам с осложнениями беременности, выкидышами на ранних сроках, а также пациенткам перед ЭКО необходимо проводить тестирование на генетические полиморфизмы генов цикла фолиевой кислоты. Своевременное выявление генетических дефектов на этапе подготовки к ЭКО способствует повышению эффективности методов вспомогательных репродуктивных технологий.

### Литература

1. Yamada H., Sata F., Saijo Y. et al. Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage // Sem. Thromb. Hemost. 2005. Vol. 31. P. 334–345.
2. Nelen W. L., Van der Molen E. F., Blom H. J. et al. Recurrent early pregnancy loss and genetic-related disturbances in folate and homocysteine metabolism // Brit. J. Hosp. Med. 1997. Vol. 58. P. 511–513.
3. Lissak A., Sharon A., Fruchter O. et al. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss // Amer. J. Obstet. Gynec. 1999. Vol. 181. P. 126–130.
4. Couto E., Barini R., Zaccaria R. et al. Association of anti-cardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate

- reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombo-philia? // *Hum. Genet.* 2005. Vol. 45. P. 138–141.
5. Kobashi G., Kato E., Morikawa M. et al. MTHFR C677T Polymorphism and factor V Leiden mutation are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women // *Sem. Thromb. Hemost.* 2005. Vol. 31. P. 266–271.
  6. Mukhopadhyay R., Saraswathy K., Ghosh P. MTHFR C677T and factor V Leiden in recurrent pregnancy loss: a study among an endogamous group in North India // *Genet. mest Molec. Biomarkers.* 2009. Vol. 13. P. 861–865.
  7. Settin A., Elshazli R., Salama A., Elbaz R. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in Egyptian women with unexplained recurrent pregnancy loss // *Genet. test Molec. Biomarkers.* 2011. Vol. 15. P. 887–892.
  8. Altmäe S., Stavreus-Evers A., Ruiz J. et al. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility // *Fertil Steril.* 2010. Vol. 94. P. 130–137.
  9. Callejón G., Mayor-Olea A., Jirnez A. et al. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss // *Hum. Reprod.* 2007. Vol. 22. P. 3249–3254.
  10. Engel S., Olshan A., Siega-Riz M. Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth // *Amer. J. Obstet. Gynec.* 2006. Vol. 195. P. 1231.
  11. Jacques P., Bostom A., Selhub J. et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study // *Atherosclerosis.* 2003. Vol. 166. P. 49–55.

M. A. Uvarova<sup>1</sup>, A. V. Ivanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>North-West Centre for Evidence-Based Medicine JSC, St. Petersburg

<sup>2</sup>University Hospital of Saint-Petersburg State University, St. Petersburg

### The effect of three single nucleotide polymorphisms of folic acid cycle genes for the development of disorders of the female reproductive system

Currently the significant part of reproductive disorders such as refractory pregnancy loss (RPL), infertility, unsuccessful in vitro fertilization (IVF) are thought to be connected with different genetic factors. One of the main hereditary risk factors for obstetrical pathology development is the presence of polymorph alleles in several genes of folic acid cycle. The present study is dedicated to investigation of the effect of folic acid cycle polymorph variants *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* and *MTRR A66G* on the RPL development and unsuccessful IVF. The samples of peripheral blood of 138 women were tested and showed a statistically significant increase of pathologic genetic alleles of *MTRR A66G* and *MTHFR C677T* frequency in two groups of patients with reproductive disorders, i.e. RPL and IVF, versus the control group. Also the advantage of simultaneous analysis of three folic cycle genetic polymorphisms at once in women with reproductive function disorder was demonstrated in comparison with the analysis of isolated polymorphism *MTHFR C677T*. The combination of polymorph alleles has a significant influence on the pathology development and by many times increases the risk of RPL development and unsuccessful IVF.

**Key words:** miscarriage, IVF failure, SNP, folic acid cycle