

ВОРОЖИЩЕВА

Анна Юрьевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ В
ПОПУЛЯЦИЯХ РАЗЛИЧНОГО ЭТНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

03.02.07-генетика

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск - 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, **Степанов Вадим Анатольевич**

Официальные оппоненты:

Назаренко Людмила Павловна, доктор медицинских наук, профессор;
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, руководитель лаборатории наследственной патологии

Евтушенко Ирина Дмитриевна, доктор медицинских наук, профессор;
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук

Защита состоится «_____» _____ 2014 года в _____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10.

Автореферат разослан «_____» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

И.Ю. Хитринская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема изучения генетических механизмов предрасположенности к многофакторным заболеваниям (МФЗ) остается одной из наиболее актуальных в генетике человека (Баранов, 2011). Важность этого вопроса определяется огромным значением полигенных болезней для современной медицины. Одним из направлений для понимания роли генетических маркеров в развитии МФЗ является эволюционный подход к изучению их генетической архитектуры (Пузырев, Кучер, 2011).

Генетические особенности индивида в значительной мере определяются его принадлежностью к определенной этнической группе. В глобальном масштабе популяции по любым системам маркеров, включая и генетические, объединяются в расово-континентальные группы, однако, данная закономерность проявляется и на меньших масштабах – для континентальных и субконтинентальных групп популяций (Cavalli-Sforza, 1998; Li et al., 2008). Причина такой картины заключается в эволюционной истории генетического разнообразия, формировавшегося в процессе расселения современного человека, в основном, под действием миграций и дрейфа генов (Степанов, 2010; Боринская, 2008).

Ряд современных исследований демонстрирует существенную генетическую дифференциацию популяций по генам, ассоциированным с комплексными болезнями (Ioannidis et al., 2004; Adeyemo, Rotimi, 2010; Marigorta et al., 2011; Ding, Kullo, 2011; Chang et al., 2011). Показано, что различия в частотах генов подверженности к МФЗ могут быть одной из причин межэтнических различий в распространенности этих болезней (Ioannidis et al., 2004; Fu et al., 2011). В рамках представленной работы проблема популяционной специфичности генетической компоненты сложнаследуемых признаков и МФЗ конкретизирована в отношении одного из наиболее тяжелых осложнений беременности - преэклампсии и связанных с ним количественных признаков в нескольких этнических группах населения России (русские, буряты, якуты).

Преэклампсия (ПЭ), являющаяся одним из основных факторов перинатальной заболеваемости в мире, стабильно занимает 3–4 место в структуре причин материнской заболеваемости и смертности в Российской Федерации в течение последнего десятилетия (Айламазян, Мозговая, 2008; Сяндюкова и др., 2013). По данным ВОЗ, эта патология значительно повышает уровень заболеваемости в младенческом и раннем детском возрасте (Polsani et al., 2013). В нашей стране среди здоровых первобеременных ПЭ выявляется в 6-12% случаев, а при наличии экстрагенитальной патологии — в 20-40%, причем за последние годы частота тяжелых форм возросла более чем на 6% (Серов, 2009; Макаров и др., 2010).

Результаты зарубежных и отечественных исследований свидетельствуют о наличии связи эпидемиологии и течения ПЭ с этнической и расовой принадлежностью. Так, Brown и соавторами установлены этнические различия в частотах встречаемости данной патологии среди афроамериканок, белых и испаноязычных американок (Brown et al., 2007). Аналогичные результаты были

получены в работе японских ученых (Tanaka et al., 2007). Отечественные исследования, посвященные данной проблеме, весьма немногочисленны. Показано, что для беременных женщин бурятской популяции характерно ранее развитие ПЭ и ее более тяжелое течение по сравнению с русскими (Фаткуллина и др., 2011).

Что касается изучения генетических факторов развития данной патологии, то к настоящему времени показаны ассоциации с ПЭ более 100 полиморфных вариантов генов (HuGENet.org). Однако следует отметить, что большинство данных работ выполнено за рубежом, а отечественные исследования проведены преимущественно в русской этнической группе (Мозговая, 2003; Радьков и др., 2011; Добродомова, 2012 и др.). В литературе обнаружены только две работы, посвященные анализу наследственной предрасположенности к ПЭ в монголоидных популяциях России (Еремина, 1999; Павлова, 2011).

Несмотря на некоторые успехи в изучении молекулярных механизмов ПЭ, следует отметить, что результаты, полученные разными исследователями при изучении генетической предрасположенности к этому заболеванию, зачастую противоречивы для отдельных этнических групп. Некоторые авторы в качестве основной причины такого рода противоречий рассматривают вариабельность структуры наследственной компоненты ПЭ между различными популяционными выборками, формирующуюся в результате демографической истории конкретной популяции (Хуснутдинова, Боринская, 2002; Lokki et al., 2011; Anderson et al., 2012).

Таким образом, представляется чрезвычайно актуальным изучение структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии с учетом этнической принадлежности и поиск общих и этноспецифичных генетических маркеров данной патологии.

Цель работы: Оценить общность и специфичность генетической компоненты подверженности к преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать генетическое разнообразие и дифференциацию по полиморфным вариантам генов *MTHFR*, *F2*, *F5*, *SERPINE1*, *NOS3*, *ACE*, *LEP*, *VEGF*, *AGT* и *ACVR2A* в выборках здоровых индивидов и у больных из русской, якутской и бурятской этнических групп.
2. Провести анализ ассоциаций выбранных аллельных вариантов генов с преэклампсией в популяциях различного этнического происхождения (русские, якуты, буряты).
3. Изучить ассоциации выбранных полиморфных вариантов генов с патогенетически значимыми для преэклампсии количественными признаками (антропометрические показатели, уровень САД, ДАД, показатели коагулограммы) в обследованных группах.
4. Оценить прогностическую значимость комплекса исследованных генетических маркеров и параклинических показателей в изученных этнических группах.

Научная новизна исследования: Получены новые знания об особенностях структуры генофонда населения Сибири по генам *LEP*, *VEGF* и *ACVR2A*. Впервые показана ассоциация с ПЭ у якутов и русских tagSNP гена *LEP* (rs11763517, rs2071045 и rs2167270) и гена *ACVR2A* (rs17742342). В группах больных ПЭ из якутской и бурятской популяций впервые продемонстрирована связь наследственной вариабельности генов *VEGF* и *MTHFR* с антропометрическими показателями. Установлена ассоциация аллельных вариантов гена *ACVR2A* с показателями коагулограммы и уровнем артериального давления у русских и якутов. Впервые в России проведена оценка общности и этноспецифичности генетической компоненты подверженности к ПЭ в якутской, русской и бурятской популяциях.

Теоретическая и практическая значимость: Новые данные, касающиеся ассоциации с ПЭ полиморфных вариантов изученных генов дополняют фундаментальные знания о генетической компоненте данной патологии, могут служить основой для дальнейшего исследования ее молекулярных механизмов и быть использованы в учебном процессе на факультетах вузов биологического и медицинского профиля.

Полученные данные об ассоциации полиморфных вариантов генов *VEGF*, *LEP*, *ACVR2A*, *SERPINE1*, *MTHFR*, *NOS3*, *F5* с преэклампсией и вариабельностью ряда патогенетически значимых для данной патологии признаков могут быть учтены при организации профилактических мероприятий и формировании групп риска развития данной патологии с учетом межэтнических различий.

Положения, выносимые на защиту:

1. Структура предрасположенности к преэклампсии по системе полиморфных вариантов генов, вовлеченных в ангиогенез, регуляцию функционирования системы гемостаза и формирование эндотелиальной дисфункции, имеет как общие (гены *SERPINE1* и *NOS3*) так и этноспецифичные (гены *MTHFR*, *VEGF* и *LEP*) компоненты у русских, якутов и бурят.
2. Распределение частот гаплотипов генов *VEGF*, *ACVR2A* и *LEP* в изученных выборках и их ассоциации с ПЭ характеризуются расовой и/или этнической специфичностью. В этнической выборке русских наблюдаются отличия в структуре неравновесия по сцеплению локусов *VEGF* и *LEP* между группами, дифференцирующимися по наличию/отсутствию болезни.
3. Аллельные варианты генов *VEGF*, *SERPINE1*, *MTHFR* и *ACE* ассоциированы с антропометрическими параметрами в группах больных ПЭ из якутской и бурятской популяций. Полиморфные маркеры генов *ACVR2A*, *SERPINE1*, *NOS3* и *ACE* связаны с вариабельностью показателей коагулограммы у русских и бурят. С уровнем артериального давления ассоциированы генетический маркер rs17742342 локуса *ACVR2A* в контрольной выборке из якутской популяции и полиморфные варианты G894T и VNTR гена *NOS3* в группе пациенток с ПЭ и в контроле у русских.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на ежегодной конференции Европейского общества генетиков человека (Париж, Франция, июнь 2013 г.), на международной конференции «Высокопроизводительное

секвенирование в геномике» (Новосибирск, июль 2013 г.), на научно-практической конференции «Актуальные вопросы лабораторной медицины» (Новокузнецк, декабрь 2013 г.), на межлабораторном семинаре ФГБУ «НИИМГ» СО РАМН (декабрь 2013).

Публикации. По теме исследования опубликовано 6 работ, из них 2 статьи в журналах перечня ВАК.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 204 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Библиографический указатель включает 283 источника, из них 221 зарубежный. Диссертация иллюстрирована 23 таблицами и 45 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен анализ клинико-анамнестических данных течения и исходов беременности у 1141 женщины. Обращалось внимание на возраст, течение и исходы предыдущих беременностей, сопутствующие заболевания, осложнения в родах; антропометрические признаки и показатели коагулограммы, измеренные в первом триместре беременности (табл. 1). Материал собирался на базе МАУЗ «Родильный дом №4» и ОГБУЗ «Родильный дом им. Н.А. Семашко» г. Томска, Перинатального центра РБ№1 г. Якутска и ГБУЗ «Республиканский перинатальный центр» г. Улан-Удэ. Образцы ДНК женщин из бурятской популяции были предоставлены для исследования канд. мед. наук Е.Р. Ереминой, индивидов из якутской популяции – доктором мед. наук Н.Р. Максимовой. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН.

Таблица 1

Краткая характеристика обследуемых групп

Показатель	Пациентки с ПЭ			Контрольная группа		
	Русские	Буряты	Якуты	Русские	Буряты	Якуты
Количество индивидов	157	140	217	210	207	210
Средний возраст, лет	28,6±5,7	29,1±5,2	30,4±7,7	27,5±4,6	47,5±4,8	32,5±7,2
Умеренная ПЭ, %	53	50	54	-	-	-
Тяжелая ПЭ, %	47	50	46	-	-	-
Наличие хронических заболеваний, %	76	86	83	23	25	39

Диагноз ПЭ был установлен в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Степень тяжести ПЭ оценивалась по критериям Федеральных клинических рекомендаций «Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия» (Сухих и др., 2013). Группа пациенток с ПЭ во всех трех популяционных выборках была неоднородной как по степени тяжести, так и по наличию ранее предшествовавших и сопутствующих фоновых заболеваний. Контрольную группу составили женщины с физиологической беременностью и отсутствием

неблагоприятного акушерского анамнеза. По показателю среднего возраста все группы были сопоставимы, за исключением контрольной выборки бурят, данные для которой были собраны ретроспективно.

В работе изучено 20 полиморфных вариантов 10-ти генов-кандидатов подверженности к ПЭ (Табл. 2): фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), лептина (*LEP*), метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), пятого фактора свертывания крови (*F5*), рецептора активина второго типа (*ACVR2A*), протромбина (*F2*), ингибитора активатора плазминогена (*SERPINE1*), эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*), ангиотензиногена (*AGT*) и ангиотензин конвертирующего фермента (*ACE*). В генах *ACVR2A*, *LEP* и *VEGF* для исследования были выбраны tagSNP, идентифицированные с помощью алгоритма «Aggressive tagging» (Barret et al., 2009).

Таблица 2

Краткая характеристика исследованных SNPs

№	Ген	Полиморфные варианты	Хромосома	Аллели	Предковый аллель	Локализация в гене	Тип исследования*
1	<i>LEP</i>	rs2167270 (G19A)	7	A/G	G	5'-UTR	ПГАЭ
2	<i>LEP</i>	rs2278815	7	A/G	G	интрон	ПГАЭ
3	<i>LEP</i>	rs11763517	7	C/T	T	интрон	ПГАЭ
4	<i>LEP</i>	rs2071045	7	C/T	T	интрон	ПГАЭ
5	<i>LEP</i>	rs3828942	7	A/G	G	интрон	ПГАЭ
6	<i>VEGF</i>	rs3025000	6	C/T	C	интрон	ПГАЭ
7	<i>VEGF</i>	rs3025010	6	C/T	C	интрон	ПГАЭ
8	<i>VEGF</i>	rs10434 (G1612A)	6	A/G	G	3'-UTR	ПГАЭ
9	<i>ACVR2A</i>	rs1014064	2	A/G	A	интрон	ПГАС
10	<i>ACVR2A</i>	rs17742342	2	A/C	A	интрон	ПГАС
11	<i>ACVR2A</i>	rs2161984	2	A/G	G	интрон	ПГАС
12	<i>ACVR2A</i>	rs10497025	2	C/G	C	интрон	ПГАС
13	<i>MTHFR</i>	rs1801133 (C677T)	1	C/T	C	экзон	МА
14	<i>F5</i>	rs6025 (G1691A)	1	G/A	G	экзон	МА
15	<i>F2</i>	rs1799963 (G20210A)	11	A/G	G	3'-UTR	МА
16	<i>SERPINE1</i>	rs1799889 (-675 4G/5G)	7	4G/5G	5G	5'-UTR	МА
17	<i>NOS3</i>	rs1799983 (G894T)	7	G/T	G	экзон	МА
18	<i>NOS3</i>	VNTR	7	A/B	-	интрон	МА
19	<i>AGT</i>	rs699 (M235T)	1	C/T	C	экзон	МА
20	<i>ACE</i>	rs4646994	17	I/D	-	интрон	МА

Примечание: * - ассоциация локуса с ПЭ показана при проведении полногеномного анализ экспрессии генов (ПГАЭ) или полногеномного анализа сцепления в семьях (ПГАС) либо нескольких мета-анализов (МА).

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки (Johns, Paulus-Thomas, 1989). Генотипирование осуществляли с помощью амплификации соответствующих

участков генома методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и ПЦР в режиме реального времени, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе (Jeunemaitre, 1998; Karvonen et al., 1998; Kupferminc et al., 1999; Novoradovsky et al., 1999; Basiak, Smolarz, 2000; Sazci et al., 2004) или подобранных в рамках настоящей работы.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов программ «SPSS 13», «Statistica 7.0», «ARLEQUIN» и «Haploview 4.2». Распределение генотипов исследованных полиморфных вариантов проверяли на соответствие ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера (Вейр, 1995). Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса или точный тест Фишера. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель «отношение шансов» - OR. Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Шапиро-Уилка. Для анализа количественных признаков при сравнении двух независимых выборок с нормальным распределением использовали дисперсионный анализ, при отклонении от нормального распределения - критерий Манна-Уитни для двух и критерий Крускала-Уоллиса для трех и более независимых выборок (Гланц, 1999). Статистически значимыми считали различия для $p < 0,05$ после коррекции на множественные сравнения. Структура неравновесия по сцеплению (LD) и частоты гаплотипов оценивались с помощью коэффициентов Левонтина (D') и корреляции Пирсона (r^2), EM-алгоритма и алгоритма «Solid spine LD» (Lewontin, 1964; Barret et al., 2005). Оценка прогностических качеств панели генетических полиморфных маркеров ПЭ проводилась с помощью ROC (Receiver Operator Characteristic) -анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика генетического разнообразия и ассоциации с преэклампсией аллелей и генотипов исследованных локусов в этнических выборках русских, якутов и бурят

Из 20-ти изученных локусов полиморфными в обследованных группах оказались все, кроме rs6025 гена *F5* и rs1799963 гена *F2* у якутов и бурят (табл. 3). Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга было зафиксировано для локусов rs10497025 в группе больных ПЭ якутов; rs17742342 и rs2071045 в контрольной выборке из бурятской популяции, а также rs2167270, rs11763517, rs3025010, -675 4G/5G, C677T и G894T у русских больных ПЭ, что обусловлено, вероятно, спецификой популяционно-генетических процессов, либо связано с функциональной значимостью локуса (Хедрик, 2003). Анализ генетического разнообразия в контрольных выборках показал статистически значимые различия в распределении частот генотипов шести SNP (rs17742342 гена *ACVR2A*, rs11763517 гена *LEP*, M235T гена *AGT*, C677T гена *MTHFR*, I/D-полиморфизма гена *ACE*, VNTR-полиморфизма гена *NOS3*), которые выявлялись при сравнении не только русских с монголоидными популяциями, но и последних между собой.

Таблица 3

Распределения частот (в %) генотипов изученных SNP в обследованных группах

Ген	SNP	Генотип	Обследованные группы								
			Якуты			Буряты			Русские		
			ПЭ	Конг- роль	χ^2 (p)*	ПЭ	Конг- роль	χ^2 (p)*	ПЭ	Конг- роль	χ^2 (p)*
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ACVR2A	rs1014064	AA	39	39	0.79 (0.67)	34	35	0.10 (0.95)	38	44	1.73 (0.42)
		AG	50	47		49	48		45	43	
		GG	12	14		17	18		17	13	
	rs17742342	AA	92	93	0.11 (0.94)	84	83	0.68	66	76	0.09
		AC	8	7		13	15		33	23	
		CC	0	0		3	2		1	1	
	rs2161984	GG	41	41	0.33 (0.85)	36	42	1.65 (0.44)	40	44	0.79 (0.67)
		GA	48	46		46	42		45	44	
		AA	12	13		19	16		15	12	
	rs10497025	CC	86	83	0.06 (0.80)	82	87	1.83 (0.18)	51	53	0.77 (0.38)
		CG	12	17		17	12		39	40	
		GG	2	1		1	1		10	6	
LEP	rs2167270	GG	60	56	3.57 (0.17)	66	60	1.28 (0.53)	46	48	9.27 (0.01)
		GA	36	35		30	34		38	45	
		AA	4	9		5	7		17	7	
	rs2278815	GG	15	12	1.89 (0.39)	7	12	5.03 (0.08)	26	22	1.09 (0.58)
		GA	41	37		35	40		45	47	
		AA	45	51		58	48		29	32	
	rs11763517	TT	73	55	15.79 (.001)	68	68	0.01 (0.99)	34	34	1.81 (0.4)
		TC	23	36		29	29		40	46	
		CC	4	9		4	4		26	20	
	rs2071045	TT	15	21	10.36 (.006)	23	22	1.43 (0.49)	63	60	0.28
		TC	42	51		47	42		36	35	
		CC	43	28		30	36		2	5	
	rs3828942	GG	7	5	2.51 (0.29)	6	4	0.72 (0.7)	29	31	1.06 (0.59)
		GA	37	44		37	38		46	48	
		AA	56	51		56	57		26	21	
VEGF	rs3025000	CC	46	53	3.02 (0.22)	52	49	0.43 (0.81)	54	59	2.16 (0.34)
		CT	47	38		38	41		39	37	
		TT	7	9		10	11		8	4	
	rs3025010	CC	8	8	0.18 (0.91)	13	10	1.38 (0.51)	16	27	16.87 (.001)
		CT	37	35		31	36		34	43	
		TT	55	57		56	54		50	30	
	rs10434	GG	63	65	1.58 (0.45)	59	56	0.42 (0.81)	38	49	5.13 (0.08)
		GA	33	33		36	39		43	40	
		AA	5	2		4	5		19	12	
AGT	C704T	CC	38	34	1.54 (0.46)	47	53	1.94 (0.38)	28	23	1.11 (0.57)
		CT	44	50		44	36		43	44	
		TT	18	16		9	11		29	32	

Окончание таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SERPINE1	-675 4G/5G	G/G	8	14	5.57 (0.06)	17	27	11.93 (.003)	17	21	10.22 (.006)
		-/G	40	45		41	48		35	47	
		-/-	51	42		42	25		48	32	
MTHFR	C677T	CC	76	71	2.87 (0.24)	57	56	1.82 (0.4)	52	59	6.97 (0.03)
		CT	24	27		38	35		35	36	
		TT	1	3		5	9		13	5	
F5	G1691A	GG	100	99	0.24	99	100	0.39	95	98	0.14
		GA	0	1		1	0		5	2	
		AA	0	0		0	0		0	0	
F2	G20210A	GG	100	100	-	100	100	-	98	99	0.70
		GA	0	0		0	0		2	2	
		AA	0	0		0	0		0	0	
ACE	I/D	II	33	29	2.85 (0.24)	15	13	2.43 (0.3)	22	28	1.81 (0.41)
		ID	48	46		48	41		50	50	
		DD	19	26		37	46		27	23	
NOS3	VNTR	AA	1	0	0.93	0	1	0.01	5	5	3.18 (0.2)
		AB	7	8		7	17		34	26	
		BB	92	92		93	83		61	70	
NOS3	G894T	GG	50	63	8.52 (0.01)	60	69	0.15	40	48	14.04 (.001)
		GT	45	34		37	28		57	40	
		TT	5	3		3	2		3	12	

Примечание: * - значение критерия χ^2 с поправкой Йейтса и/или точный критерий Фишера и уровень значимости (p) получены при сравнении частот аллелей и генотипов контрольной группы и группы больных ПЭ внутри популяционной выборки. Жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

При сравнении частот генотипов между пациентками с ПЭ из различных этнических выборок статистически значимые отличия между всеми изученными группами были зафиксированы для локусов rs17742342 гена *ACVR2A*, rs2278815 и rs2071045 гена *LEP*, между русскими и одной или двумя из монголоидных выборок – для маркеров rs10497025 гена *ACVR2A*, rs2167270, rs11763517 и rs3828942 гена *LEP*, rs10434 гена *VEGF*, M235T гена *AGT*, C677T гена *MTHFR*, G1691A гена *F5*, I/D-полиморфизма гена *ACE*, VNTR-полиморфизма и маркера G894T гена *NOS3*.

Полученные оценки частот аллелей изученных SNP для исследованных этнических групп находятся в пределах вариаций частот аллелей данных маркеров в европеоидных и монголоидных популяциях, представленных в базе данных международного проекта «1000 геномов» (рис. 1). Показано, что для трех tagSNP гена *LEP* (rs3828942, rs2278815, rs2071045) частоты предковых аллелей были максимальны у представителей негроидной расы (85-95%) и минимальны – у монголоидов (23-34%). Максимальная средняя гетерозиготность (H_e) по совокупности локусов зафиксирована в контрольной выборке русских (0,37), минимальная – в контрольной группе бурятов (0,31). У якутов данный показатель составил 0,32. Среднее значение коэффициента генетической дифференциации (F_{st}) изученных

групп по всем исследованным маркерам составило 0,043. Следует отметить, что как для сибирских, так и для зарубежных популяций, характерен широкий разброс частот рассматриваемых аллельных вариантов между представителями различных рас и этнических групп, что наряду с результатами проведенных ранее работ (Малярчук и др., 2009; Кучер и др., 2010) подтверждает важность учета популяционной принадлежности индивидов при проведении ассоциативных исследований.

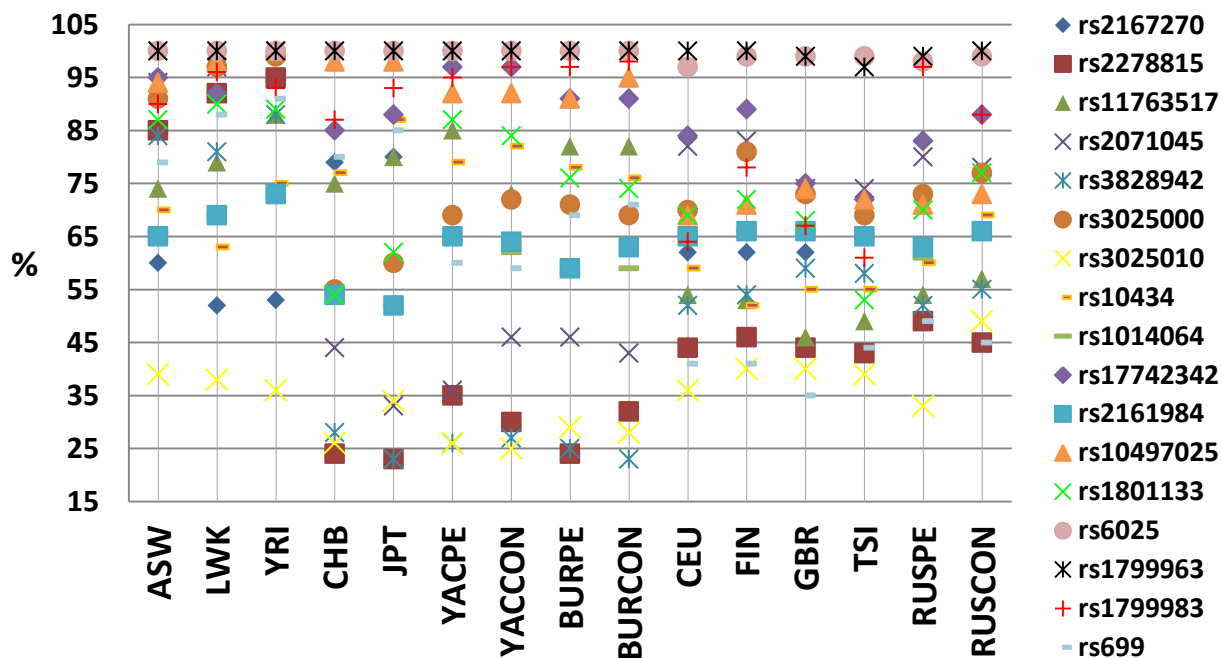


Рис. 1. Частоты предковых аллелей изученных SNP в исследованных в настоящей работе группах и популяциях из проекта «1000 геномов». Принято следующее обозначение популяций: ASW – афроамериканцы, LWK – лухья, YRI – йоруба, CHB – китайцы, JPT – японцы, YACPE и YACCON – якуты (ПЭ и контроль), BURPE и BURCON – буряты (ПЭ и контроль), CEU – европеоиды из штата Юта, FIN – финны, GBR – англичане, TSI – итальянцы, RUSPE и RUSCON – русские (ПЭ и контроль).

Анализ ассоциации с ПЭ полиморфных вариантов генов SERPINE1, F2, F5, MTHFR, NOS3, AGT и ACE в обследованных группах

Из изученных полиморфных вариантов генов, вовлеченных в развитие эндотелиальной дисфункции и гиперкоагуляции, выявлен только один аллельный вариант – rs1799889 (-675 4G/5G) гена *SERPINE1*, ассоциированный с развитием ПЭ во всех трех этнических группах (табл. 3): частота генотипа 4G/4G и аллеля 4G была статистически значимо выше у больных ПЭ по сравнению с женщинами, формирующими контрольные группы, в бурятской, русской и якутской популяциях (OR=2,16, CI:1,46-3,42; OR=2,01; CI:1,30-3,07; OR=1,48; CI:1,01-2,17, для генотипа 4G/4G соответственно).

Другим SNP, значимо ассоциированным с ПЭ как в европеоидной так и в монголоидной популяциях, являлся аллельный вариант G894T гена *NOS3* (табл. 3): более высокая частота генотипа GT по сравнению с контрольной выборкой была зафиксирована в группе пациенток с ПЭ из якутской и русской популяций (OR=1,63,

CI:1,10-2,41; OR=1,78, CI:1,15-2,76). Однако, в данных этнических группах были выявлены различные генотипы, протективные в отношении развития ПЭ: GG для якутской популяции (OR=0,56, CI:0,58-0,83) и TT для русской (OR=0,26, CI:0,07-0,50). В то же время у бурят с повышенной предрасположенностью к ПЭ был ассоциирован другой вариант гена *NOS3* – полиморфизм VNTR (табл. 3): (OR=2,65; CI:1,26-5,54 для генотипа BB, OR=2,57; CI:1,25-5,07 для аллеля B).

В русской этнической выборке была установлена ассоциация с ПЭ полиморфного варианта C677T гена *MTHFR*: в группе больных отмечалось значимое повышение частоты генотипа TT (OR=2,69; CI:1,25 – 5,79) и аллеля T по сравнению с этими показателями в контроле (табл. 3). В якутской и бурятской этнических группах данный вариант не был связан с ПЭ.

Для более детального изучения роли исследованных SNP в подверженности к ПЭ был проведен анализ их ассоциации с отдельными клиническими формами данной патологии, классифицированными по степени тяжести. В бурятской популяции генотип 4G/4G и аллель 4G маркера -675 4G/5G гена *SERPINE1* был ассоциирован как с умеренной ($\chi^2=7,29$, $p=0,03$; OR=2,09; CI:1,18-3,70; $\chi^2=4,86$, $p=0,04$; OR=1,43; CI:0,97-2,10, соответственно для генотипа 4G/4G и аллеля 4G), так и с тяжелой ($\chi^2=13,52$, $p=0,001$; OR=2,22; CI:1,26-3,92; $\chi^2=13,79$, $p=0,0002$; OR=2,12; CI:1,42-3,18, соответственно для генотипа 4G/4G и аллеля 4G) формами ПЭ. В якутской популяции наблюдалась ассоциация аллеля 4G с умеренной ($\chi^2=4,79$, $p=0,028$; OR=1,51; CI:1,06-2,16) и тяжелой формами ($\chi^2=4,48$, $p=0,046$; OR=1,43; CI:1,01-2,37) данной патологии. Наряду с этим, в русской популяции выявлено, что повышенная частота генотипа 4G/4G и аллеля 4G в общей группе больных с ПЭ по сравнению с контролем, по-видимому, обусловлена еще более высокой частотой данного генотипа у больных с умеренной формой заболевания ($\chi^2=10,04$, $p=0,007$; OR=2,39; CI:1,38-4,12; $\chi^2=8,94$, $p=0,003$; OR=1,84; CI:1,23-2,76, соответственно для генотипа 4G/4G и аллеля 4G), тогда как у больных с тяжелой ПЭ значение данных показателей статистически значимо не отличалось от контрольной группы.

Подобная закономерность в распределении частот аллелей и генотипов у русских была обнаружена и для локуса C677T гена *MTHFR*: значимое повышение частоты генотипа 677TT и аллеля T по сравнению с контрольной выборкой было зафиксировано только в подгруппе с умеренной формой ПЭ ($\chi^2=11,92$, $p=0,003$; OR=4,11; CI:1,75-9,66 для генотипа 677TT; $\chi^2=7,55$, $p=0,006$; OR=1,78; CI:1,18-2,70 для аллеля T). Необходимо отметить, что ассоциации данного локуса с отдельными клиническими формами ПЭ в якутской и бурятской популяциях выявлено не было.

В бурятской этнической группе связь VNTR-полиморфизма гена *NOS3* с подверженностью к ПЭ также была показана только для умеренной формы данной патологии ($\chi^2=13,07$, $p=0,001$; OR=4,61; CI:1,89-11,29 для генотипа BB; $\chi^2=6,44$, $p=0,001$; OR=4,19; CI:1,27-13,84 для аллеля B).

В якутской и русской популяциях не было выявлено ассоциации VNTR-полиморфизма гена *NOS3* ни с одной из рассматриваемых клинических форм ПЭ,

однако была установлена связь с повышенной восприимчивостью к ПЭ другого изучаемого в настоящей работе аллельного варианта гена *NOS3* – G894T. Так, статистически значимое повышение генотипа GT отмечалось как при умеренной, так и при тяжелой форме ПЭ у русских ($\chi^2=6,05$, $p=0,013$; OR=2,03; CI:1,18-3,49; $\chi^2=5,55$, $p=0,018$; OR=1,91, CI:1,14-3,18 для умеренной и тяжелой форм соответственно), умеренной форме у бурят ($\chi^2=7,33$, $p=0,010$; OR=2,15; CI:1,23-3,76) и тяжелой форме у якутов ($\chi^2=4,67$, $p=0,03$; OR=1,74; CI:1,08-2,70) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, в якутской и бурятской популяциях была зафиксирована ассоциация аллеля T с умеренной формой ПЭ ($\chi^2=8,42$, $p=0,004$; OR=1,73; CI:1,19-2,52 и $\chi^2=9,67$, $p=0,002$; OR=2,02; CI:1,29-3,17 для якутов и бурят соответственно).

В популяции русских с тяжелой формой ПЭ была установлена также ассоциация генотипа GA и аллеля A полиморфного варианта G1691A гена *F5* (уровень значимости для критерия Фишера составил 0,015 для генотипа GA и 0,016 для аллеля A; OR=4,68; CI:1,33-16,44, OR=4,52; CI:1,31-15,66, соответственно).

По аллельным вариантам M235T гена *AGT*, G1691A и G20210A генов *F5* и *F2*, I/D-полиморфизму гена *ACE* во всех обследованных группах из якутской и бурятской популяций статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов выявлено не было.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли изученных полиморфных вариантов генов *NOS3*, *MTHFR* и *SERPINE1* в предрасположенности к развитию ПЭ. Известно, что при тяжелой форме ПЭ наблюдаются дисфункция эндотелия и изменения системы фибринолиза, проявляющиеся активацией внутрисосудистого свертывания. (Зайнулина, 2013). Основным фактором регуляции фибринолиза является ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1), кодируемый геном *SERPINE1* (Morgan et al., 2013). Необходимо отметить, что наряду с регуляцией фибринолиза, PAI-1 участвует в протеолитическом каскаде, вовлеченном в физиологические и патологические процессы инвазии и ремоделирования тканей в плаценте (Coolman et al., 2012). Наряду с этим, эндотелиальная дисфункция проявляется увеличением образования эндотелина, тромбоксана и супероксида, повышением «чувствительности» сосудистой стенки к прессорным влияниям медиаторов с одновременным уменьшением продукции вазодилататоров, таких как оксид азота и простациклин. Эти изменения ведут к увеличению общего периферического сосудистого сопротивления, вазоспазму и повышению артериального давления (Vural, 2002; Rodie et al., 2004).

Анализ ассоциации с ПЭ полиморфных вариантов генов ACVR2A, LEP и VEGFA в обследованных группах

Из всех изученных tagSNPs гена *VEGF* ассоциация с ПЭ была установлена только для полиморфного варианта rs3025010 в популяции русских: в группе больных отмечалось значимое повышение частоты генотипа TT (OR=2,39; CI:1,55 – 3,68) и аллеля T по сравнению с этими показателями у женщин с физиологической беременностью (табл. 3). Кроме того, у русских данный полиморфный вариант был

ассоциирован с тяжелой формой ПЭ ($\chi^2=15,38$, $p=0,0001$; OR=2,89, CI:1,71-4,87 – для генотипа ТТ; $\chi^2=19,52$, $p=0,00001$; OR=2,37; CI:1,61-3,50 для аллеля Т). Необходимо отметить, что нами был показан также протективный в отношении развития ПЭ эффект генотипа СС данного локуса: в группе пациенток с ПЭ и подгруппе с тяжелой формой выявлено значимое снижение частоты данного генотипа по сравнению с контролем ($\chi^2=7,08$, $p=0,008$; для подгруппы с тяжелой ПЭ). В популяции якутов и бурятов частоты аллелей и генотипов маркеров rs10434, rs3025000 и rs3025010 гена *VEGF* статистически значимо не отличались в контрольной выборке, группе с ПЭ и подгруппах с различной степенью тяжести данной патологии.

Известно, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет важную роль в процессах васкулогенеза и ангиогенеза в плаценте человека (Shibuya, 2013). Низкие концентрации VEGF и высокие концентрации его ингибитора – растворимой формы FMS-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt1) ассоциированы с нарушениями инвазии цитотрофобласта и ангиогенеза в плаценте, что приводит к осложненному течению беременности (Staff et al., 2013). Особый интерес в контексте изучения роли полиморфных вариантов генов *VEGF* и *NOS3* в развитии ПЭ, проведенного в данной работе, представляют данные, свидетельствующие о способности VEGF вызывать дозозависимую вазодилатацию *in vitro* за счет стимулирования синтеза простагличина и NO (Krause et al., 2011).

В работе не было выявлено ассоциации с ПЭ ни одного из четырех изученных tagSNPs гена *ACVR2A*, тем не менее, была показана связь аллеля С и генотипа АС маркера rs17742342 с тяжелой формой ПЭ у русских ($\chi^2=8,41$, $p=0,004$; OR=2,30; CI:1,34-3,94 для генотипа АС; $\chi^2=7,38$, $p=0,007$; OR=1,90; CI:1,19-3,04 для аллеля С).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов пяти изученных полиморфных вариантов гена *LEP* в продемонстрировал значимую ассоциацию с ПЭ трех tagSNP данного локуса (табл. 3). Так у русских во всех обследованных группах наблюдалось достоверное повышение частоты генотипа АА аллельного варианта rs2167270 (OR=2,76; CI:1,39-5,49 – для общей группы с ПЭ; $\chi^2=4,52$, $p=0,033$; OR=2,55; CI:1,14-5,69 – для умеренной ПЭ; $\chi^2=7,16$, $p=0,007$; OR=3,03; CI:1,39-6,59 – для тяжелой ПЭ), а в подгруппе с тяжелой ПЭ и аллеля А ($\chi^2=5,79$, $p=0,021$; OR=1,58; CI:1,09-2,29). Наряду с этим в якутской популяции была установлена ассоциация с ПЭ двух других аллельных вариантов гена *LEP* – rs11763517 и rs2071045 (табл. 3). В группе пациенток с ПЭ и подгруппе с тяжелой формой данной патологии выявлено статистически значимое повышение частоты генотипа СС и аллеля С маркера rs2071045 по сравнению с контрольной группой (OR=1,92; CI:1,28-2,87 – для генотипа СС в общей группе с ПЭ; $\chi^2=9,91$, $p=0,001$; OR=2,24; CI:1,38-3,65; $\chi^2=9,14$, $p=0,003$ – для генотипа СС и аллеля С в подгруппе с тяжелой ПЭ). В тоже время показано, что у якутов полиморфный вариант rs11763517 ассоциирован с ПЭ как в общей группе так и подгруппах с умеренной и тяжелой формами (OR=2,26, CI:1,49-3,42 – для общей группы с ПЭ; OR=2,19, CI:1,33-3,61; OR=2,35, CI:1,37-4,01 – для умеренной и

тяжелой ПЭ соответственно). В бурятской этнической группе не было обнаружено ассоциации с ПЭ ни одного из изученных tagSNP генов *LEP*, *VEGF* и *ACVR2A*.

Большинство исследователей отводят лептину, кодируемому геном *LEP*, главную роль в развитии ожирения, однако известно, что плацентарный лептин обеспечивает приток питательных веществ к фетоплацентарному комплексу и индуцирует пролиферацию трофобласта путем ингибирования апоптоза (Laivuori et al., 2006; Li et al., 2007; Vaskú et al., 2008). Гиперэкспрессия гена *LEP* в плацентарной ткани при ПЭ была продемонстрирована в работах многих авторов, кроме того лептин является одним из хорошо известных сывороточных маркеров ПЭ (Sitrás et al., 2009; Nishizawa et al., 2007; Winn et al., 2009; Lapaire et al., 2012). Таким образом, увеличение производства лептина в плаценте может являться компенсаторным механизмом против эндотелиальной дисфункции наблюдаемой при данной патологии. В то же время, показано, что лептин участвует в активации симпатoadреналовой системы, что способствует возникновению артериальной гипертензии (Aizawa-Abe, 2000).

Таким образом, из всех изученных SNP обнаружено 13 полиморфных вариантов 8-ми генов, ассоциированных с ПЭ различной степени тяжести в выборках русских, якутов и бурят. При оценке общности и популяционной специфичности генетической компоненты подверженности к ПЭ в этих этнических группах нами были исключены генетические маркеры, ассоциированные только с отдельными клиническими формами данной патологии (рис. 3).

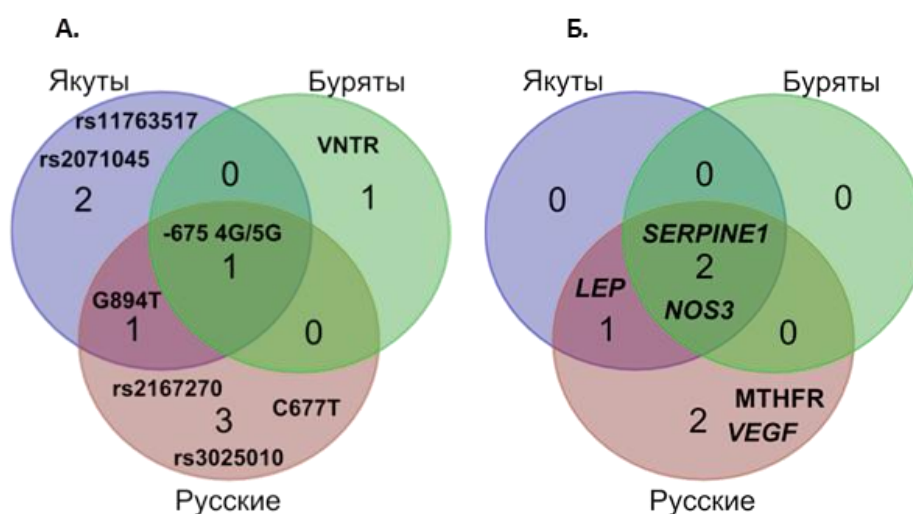


Рис. 3. Графическое представление общности и специфичности структуры наследственной предрасположенности к ПЭ. **А.** Анализ ассоциированных с ПЭ SNP, **Б.** анализ ассоциированных с ПЭ генов.

Как видно, к этноспецифическим генетическим макерам развития ПЭ можно отнести следующие однонуклеотидные варианты: VNTR-полиморфизм гена *NOS3* – для бурят; rs11763517, rs2071045 гена *LEP* – для якутов и rs2167270 гена *LEP*, rs3025010 гена *VEGF* и C677T гена *MTHFR* – для выборки русских. В то же время, несмотря на значительное количество этноспецифичных генетических маркеров, число генов, которые также можно обозначить как «этноспецифичные» в отношении

подверженности к ПЭ существенно ниже. Нами выявлено только два гена, ассоциированных с ПЭ исключительно в одной этнической выборке – это локусы *VEGF* и гена *MTHFR*, аллельные варианты которых связаны с развитием ПЭ в популяции русских. В качестве общих генов структуры наследственной предрасположенности к ПЭ в трех исследованных популяциях можно выделить локус *SERPINE1*, кодирующий ключевой фактор системы фибринолиза - ингибитор активатора плазминогена 1-го типа, и ген *NOS3*, белковый продукт которого – эндотелиальная синтаза оксида азота играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов (вазодилатации) и тромбогенезе.

Анализ структуры неравновесия по сцеплению и распределения частот гаплотипов генов LEP, VEGF и ACVR2A в изученных группах

Минимальное количество гаплотипов гена *VEGF* было обнаружено у якутов (7), в русской и бурятской группах их количество составило 8. В якутской и бурятской популяциях наиболее распространенным был гаплотип CTG (порядок аллелей SNP слева направо: rs3025000, rs3025010 и rs 10434), частота которого статистически значимо ($p < 10^{-5}$) была выше в контрольной группе якутов (37,3%) и бурятов (30,5%) по сравнению с русскими (16%). В тоже время в контрольной выборке русских преобладала частота гаплотипа CCG - 37% ($p < 10^{-5}$ при сравнении с контрольными группами бурятов (22,8%) и якутов (19,3%)).

Сравнение частот гаплотипов между пациентками с ПЭ и контрольной группой в различных этнических выборках показало статистические различия только в популяции русских, где был выявлен один рисковый гаплотип CTG ($\chi^2 = 14,27$, $p = 0,0002$; OR 2,02; CI:1,41-2,89) и протективный гаплотип CCG, включающий только «предковые» аллели и встречающийся у женщин с физиологической беременностью в 2 раза чаще, чем у больных ПЭ ($\chi^2 = 44,41$, $p < 10^{-5}$, OR 0,29; CI:0,22-0,42). По остальным гаплотипам статистически значимых отличий не обнаружено. Поскольку протективный и рисковый гаплотипы отличаются только по одному аллелю Т, принадлежащему маркеру rs3025010, то можно допустить вовлеченность этого полиморфизма в структуру подверженности к ПЭ у русских.

Анализ гаплотипической структуры гена *ACVR2A* выявил один основной гаплотип – AAGC (порядок аллелей SNP слева направо: rs1014064, rs1774234, rs2161984 и rs10497025), встречающийся с частотой более 40% во всех изученных группах. Примечательно, что данный гаплотип является предковым. Наименьшее количество наблюдаемых с частотой более 1% гаплотипов гена *ACVR2A* было выявлено в популяции русских (4 у больных ПЭ и 5 в контрольной группе), а в выборках якутов и бурятов их количество составило 6. Частота гаплотипа GAAG (23,9%) была выше в контрольной группе русских по сравнению с якутами (6,2%; $p < 10^{-5}$ статистически значимо ($p < 10^{-5}$)) и бурятами (5,1%; $p < 10^{-5}$), в то время как частота гаплотипа GAAC преобладала у якутов (29,6%) и бурят (28,8%) (при сравнении с контролем из русской этнической группы (10,1%).

Наибольшее гаплотипическое разнообразие из всех изученных локусов наблюдалось для гена *LEP*: минимальное количество гаплотипов - 13, встречающихся

с частотой более 1 %, было выявлено в контрольной группе русских, максимальное (20) зафиксировано у больных ПЭ из якутской популяции. Поскольку большая часть редких гаплотипов, вероятнее всего, является статистическим артефактом, то в дальнейший анализ нами были включены только 12 гаплотипов, наблюдаемых с частотой более 5% хотя бы в одной из обследованных групп (рис. 2).

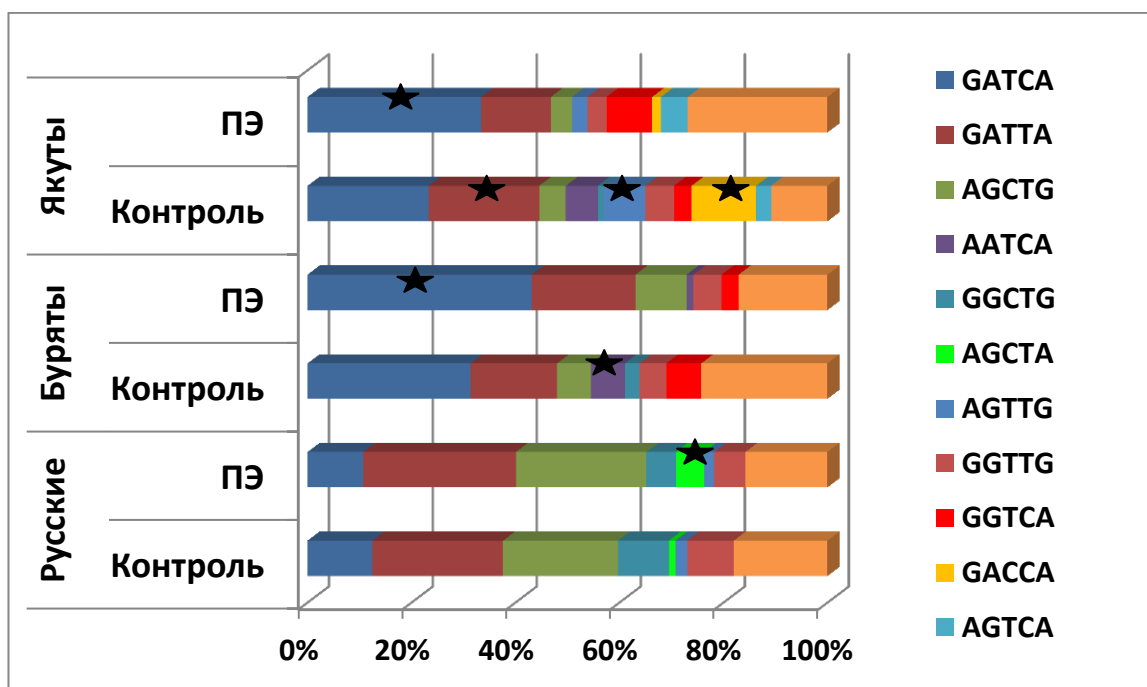


Рис. 2. Распределение частот гаплотипов гена *LEP* в изученных группах. Порядок аллель полиморфных вариантов в гаплотипе (слева направо): rs2167270, rs2278815, rs11763517, rs2071045, rs3828942. * - статистически значимые отличия ($p < 0,05$) при сравнении группы с ПЭ и контроля внутри этнической выборки с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса или критерия Фишера.

Необходимо отметить, что для данного локуса, в отличие от гена *ACVR2A*, «предковый» гаплотип GGTGG не является наиболее распространенным (его частота в обследованных группах варьирует от 5,1% до 8,4%). Распределение частот трех основных гаплотипов демонстрирует популяционную специфичность: так в якутской и бурятской популяциях по сравнению с русскими наиболее частым является гаплотип GATCA, в то время как в русской этнической группе наблюдается статистически значимо более высокая частота гаплотипа AGCTG.

При сравнении частот гаплотипов между группой больных и контрольной статистически значимые отличия были показаны для рискованных гаплотипов GATCA (в бурятской (OR=1,37; CI:1,26-2,38) и якутской (OR=1,85; CI:1,37-2,50) популяциях), AGCTA (OR=4,75; CI:1,73-13,50 у русских) и протективных гаплотипов GACCA, AGTTG (в якутской популяции OR=0,59; CI:0,41-0,85 и OR=0,34; CI:0,18-0,68, соответственно), AATCA (в якутской (OR=0,04; CI:0,01-0,27) и в бурятской (OR=0,23; CI:0,08-0,68) выборках).

Анализ структуры LD генов *LEP* и *VEGF* во всех группах из якутской и бурятской и контрольной выборке из русской популяций не выявил блоков сцепления. Наряду с этим в группе русских больных ПЭ в области 5' конца гена *LEP*

наблюдался небольшой блок сцепления (500 п.о.), включающий маркеры rs2167270 и rs2278815. Также в данной группе обнаружено сильное сцепление двух tagSNP гена *VEGF* - rs3025000 и rs3025010 ($D' = 1$). Необходимо отметить, что именно аллельные варианты rs2167270 и rs3025010 были ассоциированы с ПЭ у русских. Более выраженная архитектура LD была показана для локуса *ACVR2A*: в группах из бурятской и русской популяций все исследованные tagSNP гена формируют единый блок сцепления размером 50 т.п.о. В якутской этнической группе также наблюдается достаточно протяженный блок размером 36 т.п.о., включающий варианты - rs1014064, rs1774234 и rs2161984.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов с патогенетически значимыми для преэклампсии количественными признаками

В представленной работе во всех исследованных группах (за исключением контрольной выборки бурят) был проведен анализ ассоциации выбранных полиморфных вариантов с вариабельностью ряда патогенетически значимых для ПЭ количественных признаков (вес и индекс массы тела (ИМТ) беременных, протромбиновое время (ПТВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), содержание фибриногена (ФГ), количество тромбоцитов, уровень артериального давления (АД)).

Ассоциация изученных аллельных вариантов с антропометрическими показателями была зафиксирована только для больных ПЭ из якутской и бурятской популяций, где была обнаружена связь наследственной вариабельности генов *VEGF*, *SERPINE1*, *MTHFR* и *ACE* с изменчивостью веса и ИМТ беременных (табл. 4).

Таблица 4

Ассоциации аллельных вариантов с вариабельностью антропометрических показателей*

SNP (ген)	Генотип	N	Среднее значение или медиана для веса	Значение критерия, р-уровень	Среднее значение или медиана для ИМТ	Значение критерия, р-уровень	Группа
rs10434 (<i>VEGF</i>)	AA	10	74,7±13,1	F=4,08 p=0,019	29,9±5,1	F=3,778 p=0,025	ПЭ якуты
	AG	62	75,2±14,1		30,2±5,0		
	GG	104	69,4±12,6		27,9±5,6		
4G/5G (<i>SERPINE1</i>)	-/-	94	69,3±10,4	F=3,59 p=0,03	27,9±5,1	F=3,392 p=0,036	ПЭ якуты
	-/G	69	74,3±14,6		29,9±5,2		
	G/G	13	75,8±11,4		30,2±7,4		
C677T (<i>MTHFR</i>)	TT	5	51,9 (51,1 - 52,1)	H=6,78 p=0,034	19,8 (18,9 - 21,4)	H=7,831 p=0,02	ПЭ буряты
	CT	42	58,2 (52,1 - 65,0)		22,3 (20,7 - 24,5)		
	CC	49	58,0 (54,0 - 66,6)		22,8 (21,6 - 25,9)		
I/D (<i>ACE</i>)	I/I	14	53,8 (51,1 - 57,7)	H=6,67 p=0,036	21,4 (20,4 - 22,2)	H=6,152 p=0,046	ПЭ буряты
	I/D	44	58,9 (54,5 - 67,3)		23,1 (21,2 - 25,1)		
	D/D	38	57,9 (53,7 - 63,2)		22,8 (21,4 - 25,1)		

Примечание: * - использованы следующие обозначения: N – количество человек, p – уровень статистической значимости с поправкой Бонферрони на множественные сравнения, ПЭ – преэклампсия, H – критерий Крускала-Уоллиса, F – критерий.

Также в настоящей работе показана ассоциация ряда исследованных SNP с вариабельностью показателей артериального давления (рис. 4). Так, в контрольной выборке якутов более высокий уровень систолического (САД) и диастолического АД (ДАД) наблюдался у носителей генотипа AC маркера rs17742342 гена *ACVR2A* по сравнению с женщинами с генотипом AA ($F=4,01$; $p=0,048$), в то время как у русских женщин с ПЭ ассоциация с АД была показана для полиморфного варианта G894T гена *NOS3*: у носителей генотипа TT наблюдался максимальный уровень САД ($H=8,16$; $p=0,017$) и ДАД ($H=6,56$; $p=0,038$) по сравнению с индивидами с генотипами GG и TG. С генотипом BB другого полиморфизма гена *NOS3* – VNTR был ассоциирован повышенный уровень САД в контроле у русских ($H=9,41$; $p=0,009$). Кроме того, в данной этнической выборке как у больных ПЭ ($H=7,95$; $p=0,019$), так и в контрольной группе ($H=12,66$; $p=0,002$) индивиды с генотипами AB и BB имели повышенный уровень ДАД по сравнению с носителями генотипа AA.

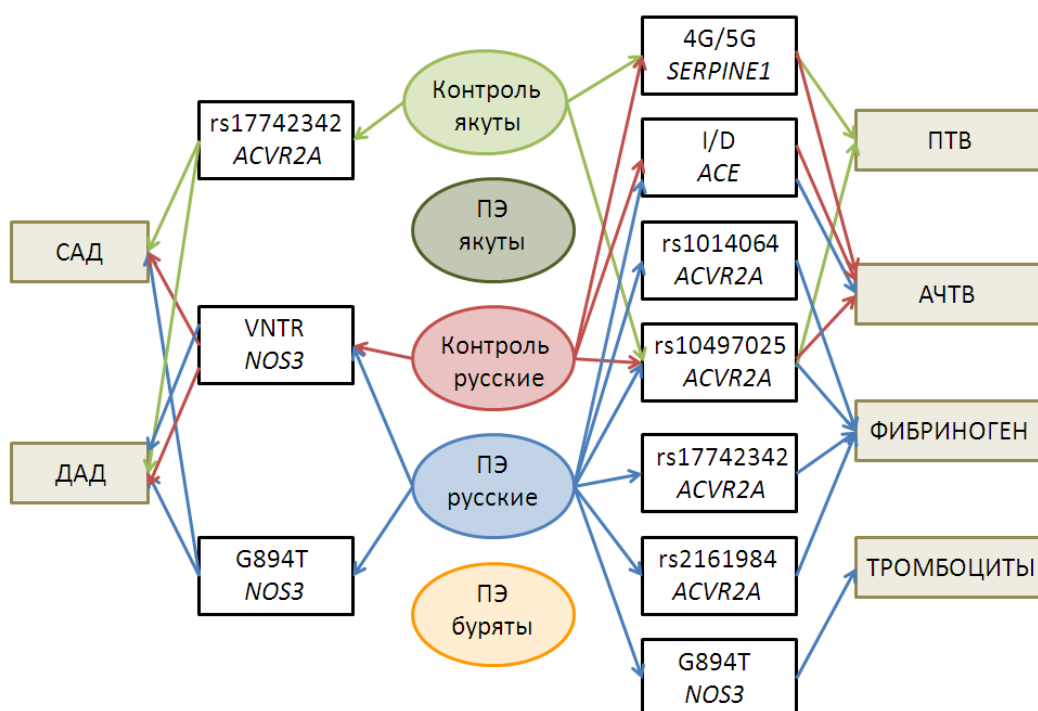


Рис. 4. Ассоциации наследственной вариабельности генов *NOS3*, *ACVR2A*, *VEGF*, *ACE* и *SERPINE1* с показателями артериального давления и параметрами коагулограммы в изученных группах.

В представленной работе лабораторные показатели оценки состояния системы гемостаза были получены только для женщин из якутской и русской популяций, в связи с чем, анализ ассоциации исследованных SNP с вариабельностью показателей коагулограммы был проведен только в данных этнических выборках. У якутов ассоциация с показателями коагулограммы была продемонстрирована только для rs10497025 гена *ACVR2A* и 4G/5G полиморфизма гена *SERPINE1*, которые были связаны с вариабельностью ПТВ ($F=4,51$; $p=0,016$; $F=7,44$; $p=0,001$).

Статистически значимо более высокий уровень АЧТВ отмечался у носителей гетерозиготного генотипа I/D-полиморфизма гена *ACE* в обеих обследованных

группах из русской популяции ($F=4,05$; $p=0,023$ – для контроля; $N=6,47$; $p=0,039$ – для больных ПЭ). Кроме того, в контрольной выборке русских достоверно более высокие значения АЧТВ наблюдались у носителей генотипов GG и 4G/4G полиморфных вариантов rs10497025 гена *ACVR2A* ($F=3,22$; $p=0,047$) и rs1799889 гена *SERPINE1* ($F=4,27$; $p=0,018$) по сравнению с альтернативными генотипами. Интересной представляется полученная в группе пациенток с ПЭ из русской популяции ассоциация всех четырех изученных tagSNP гена *ACVR2A* с вариабельностью концентрации фибриногена.

Оценка прогностической значимости комплекса исследованных генетических маркеров в изученных этнических группах

В таблице 5 представлены результаты оценки прогностических качеств выявленных генетических маркеров ПЭ с помощью ROC-анализа (Receiver Operator Characteristic analysis), полученные для обследованных популяций.

Таблица 5

Структура тест-систем, характеризующихся максимальной площадью под ROC-кривой (AUC)

Популяции	Тест-система, включающая только SNP	Тест-система, включающая SNP и количественные признаки
Русские	AUC=0,675 rs2167270 гена <i>LEP</i> rs3025010 гена <i>VEGF</i> -675 4G/5G гена <i>SERPINE1</i>	AUC=0,729 rs2167270 гена <i>LEP</i> rs3025010 гена <i>VEGF</i> ПТИ
Якуты	AUC=0,605 rs2071045 гена <i>LEP</i> G894T гена <i>NOS3</i>	AUC=0,708 rs2071045 гена <i>VEGF</i> АЧТВ, ПТИ, ИМТ
Буряты	AUC=0,629 C677T гена <i>MTHFR</i> -675 4G/5G гена <i>SERPINE1</i> VNTR гена <i>NOS3</i>	-

Как видно, максимальную площадь под ROC-кривой (AUC) дает сочетание двух или трех полиморфных вариантов, которые показали статистически значимую ассоциацию с ПЭ и/или патогенетически значимыми для этой патологии эндотипами. Тем не менее, данная AUC характеризует представленные модели как «средние» относительно прогностической значимости ($AUC < 0,7$). Наиболее высокие значения AUC (0,708; 0,729) наблюдаются только для тест-систем, включающих наряду с генетическими маркерами и количественные показатели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования был осуществлен анализ роли полиморфных вариантов генов, кодирующих протеины, вовлеченные в процессы ангиогенеза, гиперкоагуляции и функционирование эндотелия сосудов, в подверженности к преэклампсии с учетом этнической принадлежности и поиск общих и этноспецифических генетических маркеров данной патологии.

Показано, что в качестве генетических факторов, ассоциированных с повышенной предрасположенностью к ПЭ и вовлеченных в формирование гиперкоагуляции и эндотелиальной дисфункции при беременности, в якутской популяции можно выделить полиморфные варианты -675 4G/5G гена *SERPINE1* и G894T гена *NOS3*, в бурятской популяции – аллельный вариант -675 4G/5G гена *SERPINE1*, а также однонуклеотидную замену G894T и VNTR-полиморфизм гена *NOS3*, а в русской этнической группе – полиморфные маркеры -675 4G/5G гена *SERPINE1*, G894T гена *NOS3* и C677T гена *MTHFR*. Кроме того, в русской популяции установлена связь аллельного варианта G1691A гена *F5* с тяжелой формой ПЭ. Учитывая отсутствие различий по частотам аллелей и генотипов этого полиморфного маркера между контрольной группой и подгруппой пациенток с умеренной формой ПЭ, можно предположить, что однонуклеотидная замена G1691A гена *F5* определяет степень тяжести данной патологии в европеоидных популяциях.

Результаты анализа роли изученных аллельных вариантов генов ангиогенеза и межклеточных коммуникаций в развитии ПЭ демонстрируют ассоциацию с данным осложнением беременности полиморфных вариантов rs3025010 гена *VEGF* и rs2167270 гена *LEP* в популяции русских и двух tagSNP (rs11763517, rs2071045) гена *LEP* в этнической выборке якутов. Наряду с этим, генетический маркер rs17742342 гена *ACVR2A* определяет степень тяжести данной патологии у русских. Свидетельством значимости полученных ассоциаций является факт наличия связи генов *VEGF*, *LEP* и *ACVR2A* с развитием ПЭ не только на уровне отдельных SNP, но и на уровне гаплотипов. Необходимо отметить, что выявленные ассоциации гаплотипов с ПЭ также характеризуются расовой и/или этнической специфичностью: так ассоциация гаплотипов CTG и CCG гена *VEGF*, а также ACGC гена *ACVR2A* и AGCTA гена *LEP* выявлена только в русской популяции, в то время как гаплотипы GATTA и AGTTG гена *LEP* демонстрируют протективный эффект лишь в якутской этнической выборке, а рисковый гаплотип GATCA и протективный AATCA ассоциированы с ПЭ как у якутов, так и у бурят.

Дополнительным доказательством важной роли генов *VEGF*, *ACVR2A*, *SERPINE1*, *NOS3* и *MTHFR* в наследственной предрасположенности к ПЭ являются полученные в настоящей работе ассоциации полиморфных вариантов данных локусов с вариабельностью ряда патогенетически значимых для ПЭ эндофенотипов (веса и ИМТ беременных, уровня АД и показателей коагулограммы).

В целом, полученные данные свидетельствуют, что структура наследственной предрасположенности к ПЭ по системе изученных генетических маркеров имеет как общие так и этноспецифичные аллельные варианты, комбинация которых, согласно проведенному ROC-анализу, обладает умеренной диагностической значимостью в отношении прогноза развития ПЭ во всех изученных популяциях. Результаты исследования расширяют представления о роли генетических факторов ангиогенеза, гиперкоагуляции и функционирования эндотелия сосудов в развитии ПЭ, а также на примере данной патологии демонстрируют вариабельность генетической компоненты МФЗ, связанную с особенностями структуры генофондов различных этнопопуляционных групп населения.

ВЫВОДЫ:

1. Популяции русских, якутов и бурятов характеризуются средним уровнем генетического разнообразия (H_e 0,31-0,37) по изученным полиморфным вариантам. Частоты аллелей исследованных SNP демонстрируют популяционную специфику, отражающую генетическую дифференциацию этнических групп ($F_{st}=0,043$), и находятся в пределах вариаций частот аллелей данных генетических маркеров, представленных в литературе и базах данных для европеоидных и монголоидных популяций.
2. Установлена ассоциация с ПЭ следующих аллельных вариантов генов: в якутской популяции – полиморфизмов -675 4G/5G гена *SERPINE1*, G894T гена *NOS3* и rs11763517, rs2071045 гена *LEP*; в бурятской популяции – VNTR-полиморфизма гена *NOS3* и аллельного варианта -675 4G/5G гена *SERPINE1*; в русской этнической группе – полиморфных маркеров -675 4G/5G гена *SERPINE1*, G894T гена *NOS3*, C677T гена *MTHFR*, rs3025010 гена *VEGF* и rs2167270 гена *LEP*. Полиморфные варианты G1691A гена *F5* и rs17742342 гена *ACVR2A* определяют степень тяжести ПЭ у русских.
3. В контрольных группах русских, якутов и бурятов установлена схожая архитектура неравновесия по сцеплению (LD) генов *ACVR2A*, *VEGF* и *LEP*. Результаты анализа структуры LD в изученных выборках свидетельствуют о внутривнутрипопуляционных отличиях в структуре LD локусов *VEGF* и *LEP* между группами, дифференцирующимися по наличию/отсутствию болезни, у русских.
4. Полученные ассоциации определенных гаплотипов с ПЭ характеризуются расовой и/или популяционной специфичностью: ассоциация гаплотипов CTG и CCG гена *VEGF*, а также ACGC гена *ACVR2A* и AGCTA гена *LEP* выявлена только в русской популяции, в то время как гаплотипы GATTA и AGTTG гена *LEP* демонстрируют протективный эффект лишь в якутской этнической выборке, а рискованный гаплотип GATCA и протективный AATCA ассоциированы с ПЭ как у якутов, так и у бурят.
5. В группах больных ПЭ из якутской и бурятской популяций показана связь наследственной вариабельности генов *VEGF*, *SERPINE1*, *MTHFR*, *ACE*, *LEP* и *NOS3* с антропометрическими параметрами (вес и ИМТ). Установлена ассоциация аллельных вариантов генов с вариабельностью показателей коагулограммы: rs10497025, -675 4G/5G, G894T и I/D-полиморфизма генов *ACVR2A*, *SERPINE1*, *NOS3* и *ACE* - с АЧТВ, общим фибриногеном и количеством тромбоцитов в этнической выборке русских; rs10497025 гена *ACVR2A* и -675 4G/5G гена *SERPINE1* с ПТВ в якутской популяции. С уровнем артериального давления определена связь полиморфных вариантов G894T и VNTR гена *NOS3* у больных и в контроле из русской выборки и rs17742342 гена *ACVR2A* в контрольной выборке из якутской популяции.
6. Во всех этнических группах установлена средняя прогностическая значимость (AUC 0,61-0,68) комплекса генетических маркеров, ассоциированных с ПЭ. Максимальная прогностическая значимость (0,73) зафиксирована для моделей, включающих наряду с генетическими маркерами патогенетически значимые для данной патологии количественные показатели (ПТИ, АЧТВ, ИМТ).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ворожищева А.Ю., Трифонова Е.А., Будко Ю.К., Сереброва В.Н., Максимова Н.Р., Павлова К.К., Габидулина Т.В., Степанов В.А. Роль генетической вариабельности локуса ACVR2A в формировании подверженности преэклампсии // Медицинская генетика, №10. – 2013. – С. 35-40.
2. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Агаркова Т.А., Сереброва В.Н., Бутко Ю.К., Ворожищева А.Ю., Юрьев С.Ю., Девятьярова Л.А., Минайчева Л.И., Степанов В.А. Анализ роли наследственной тромбофилии в развитии осложненного течения беременности // Фундаментальные исследования, №10. – 2012. - С. 337-344.
3. Trifonova E., Gabidulina T., Ershov N., Vorozhisheva A., Stepanov V. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with moderate and severe preeclampsia // Eur. J. Hum. Genet. 2013. Abstr. V. 21. Suppl. 2. P. 443.
4. Ворожищева А.Ю., Трифонова Е.А., Бутко Ю.К., Степанов В.А. Роль наследственной вариабельности генов ангиогенеза в развитии гестационных осложнений у русских // Материалы V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». Ростов-на-Дону, 2013. С. 229.
5. Трифонова Е.А., Сереброва В.Н., Чередниченко А.А., Вагайцева К.В., Ворожищева А.Ю., Степанов В.А. Дифференциация генетической компоненты репродуктивных заболеваний в популяциях различного этнического происхождения // Сборник тезисов молодёжной конференции «Популяционная генетика и геногеография: наука и практика». Москва, 2013. С. 31.
6. Трифонова Е.А., Ершов Н.И., Ворожищева А.Ю., Степанов В.А. Выявление патофизиологических механизмов преэклампсии методом полногеномного анализа экспрессии // Материалы международной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике». Новосибирск, 2013. С. 84.

Список сокращений

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ДАД – диастолическое артериальное давление

ИМТ – индекс массы тела

МФЗ – многофакторные заболевания

ПТВ – протромбиновое время

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПТИ – протромбиновый индекс

ПЭ – преэклампсия

САД – систолическое артериальное давление

т.п.о. – тысяч пар нуклеотидов

ФГ – фибриноген

Fst – коэффициент генетической дифференциации

H_e – ожидаемая гетерозиготность

LD – (linkage disequilibrium) неравновесие по сцеплению

SNP – (single nucleotide polymorphism) однонуклеотидный полиморфизм

tagSNP - (tagging single nucleotide polymorphism) таг-метки

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН

634050 г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10

ученому секретарю Диссертационного совета ДМ 001.045.01

канд. биол. наук Хитринской И.Ю. Факс +7(3822)513-744

E-mail: i.khitrinskaya@medgenetics.ru