

УДК 575.174.577.21

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ПРЕЭКЛАМПСИИ ПУТЕМ АНАЛИЗА РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ В ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ

© 2016 г. В. Н. Сереброва^{a, *}, Е. А. Трифонова^{a, b}, Т. В. Габидуллина^c, И. Ю. Бухарина^c, Т. А. Агаркова^c, И. Д. Евтушенко^d, Н. Р. Максимова^e, В. А. Степанов^{a, b}

^aНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск, 634050

^bНациональный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050

^cНаучно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и перинатологии, Томск, 634063

^dОбластной перинатальный центр, Томск, 634063

^eЛаборатория геномной медицины, Клиники Медицинского института Северо-Восточного федерального университета, Якутск, 677019

*e-mail: vika.serebrova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 14.12.2015 г.

Принята к печати 18.03.2016 г.

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), расположенные в регуляторных участках генов, относятся к наименее изученной функциональной группе SNP. Однако, изменяя уровень экспрессии генов, они играют значимую роль в развитии различных патологических состояний человека. В представленной работе рассмотрены 29 регуляторных SNP (rSNP) в 17 генах, ассоциированных, по данным анализа транскриптома плацентарной ткани, с развитием преэклампсии. В исследовании, выполненном в трех этнических группах (русские, якуты и буряты), получены данные, свидетельствующие об ассоциации с преэклампсией восьми rSNP в шести дифференциально экспрессирующихся генах: rs10423795 гена *LHB*, rs3771787 гена *HK2*, rs72959687 гена *INHA*, rs34845949 гена *SASH1*, rs2227262, rs3802252, rs12678229 гена *NDRG1* и rs66707428 гена *PPP1R12C*. На примере преэклампсии проведен поиск генетических маркеров многофакторных заболеваний, основанный на комбинации геномных, транскриптомных и биоинформатических методов. Этот подход показал свою эффективность и может быть использован для обнаружения новых потенциальных патогенетических маркеров, уменьшая долю “упущенной наследуемости” при многофакторных болезнях.

Ключевые слова: регуляторный однонуклеотидный полиморфизм (rSNP), ассоциативное исследование, популяции человека, преэклампсия, плацента, транскриптом, дифференциально экспрессирующиеся гены

DOI: 10.7868/S0026898416050165

ВВЕДЕНИЕ

С целью определения молекулярных механизмов развития многофакторных заболеваний (МФЗ) в последнее время все чаще изучают влияние вариабельности регуляторных участков генома на экспрессию генов. Необходимо отметить, что регуляторные однонуклеотидные полиморфизмы (rSNP) представляют наибольший интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения, однако они относятся к наименее изученной функционально значимой группе SNP [1]. Известно, что изменяя уровень экспрессии генов, rSNP могут играть значимую роль в разви-

тии различных патологических состояний человека [2].

В представленной работе проведен поиск генетических маркеров такого МФЗ, как преэклампсия (ПЭ). ПЭ – синдром полиорганной недостаточности, который определяется по развитию протеинурии и артериальной гипертензии у женщин после 20-недельного срока гестации [3]. ПЭ признана одним из наиболее тяжелых осложнений беременности и ведущей причиной материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Частота ПЭ достаточно высока и составляет от 7 до 22%, а также диагностируется в

Принятые сокращения: ПЭ – преэклампсия, SNP – однонуклеотидный полиморфизм, rSNP – регуляторный SNP, ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены, МФЗ – многофакторные заболевания, РХВ – равновесие Харди–Вайнберга.

70% случаев гипертензивных расстройств у беременных [4–6]. Несмотря на множество теорий этиопатогенеза ПЭ, единого мнения о возникновении данной патологии не существует. Основной причиной ПЭ считается нарушение формирования плаценты в самые ранние сроки гестации. При этом нарушение ремоделирования спиральных артерий рассматривается как главный патогенетически значимый процесс, приводящий к развитию ПЭ [7, 8]. Предполагается, что вследствие аномальной плацентации и нарушения перфузии в плаценте высвобождаются факторы, вызывающие распространенную эндотелиальную дисфункцию и синдром системного воспалительного ответа, приводящие к полиорганной недостаточности [8, 9].

В связи с этим одним из наиболее перспективных подходов к пониманию молекулярных механизмов ПЭ считается изучение варибельности уровня экспрессии генов плацентарной ткани и механизмов регуляции данных изменений. К настоящему времени более чем в 20 исследованиях проведен полногеномный анализ экспрессии генов плацентарной ткани при ПЭ и физиологической беременности. В различных этнических группах выявлен ряд новых генов предрасположенности к этому заболеванию [10], в том числе и в нашей работе [11]. Цель представленной работы состояла в изучении генетической архитектуры ПЭ по системе rSNP генов, которые, как показал анализ транскриптома, дифференциально экспрессируются в плацентарной ткани.

В большинстве случаев роль rSNP в формировании патологических состояний анализируют без учета степени межпопуляционной варибельности регуляторных мутаций [12]. Наряду с этим получены результаты, свидетельствующие о популяционных различиях в частотах аллелей rSNP, связанных с уровнем экспрессии генов в лимфоцитах [13]. Кроме того, обнаружены значительные межпопуляционные различия в полногеномных паттернах экспрессии генов [14].

Интересно, что результаты некоторых работ указывают на межрасовые и этнические различия в частотах ПЭ в современных популяциях человека. Так, частота данной патологии минимальна у представителей монголоидной расы: китайцев — 1.44%, японцев — 1.84%, в то время как у европеоидов и негроидов данный показатель достигает 3.71 и 3.97% соответственно [15]. Можно предположить, что определенный вклад в эти отличия вносит и межэтническая варибельность частот аллелей rSNP генов предрасположенности к ПЭ. Следует отметить, что по данным Федеральной службы государственной статистики (за период 2000–2012 гг) в различных регионах Российской Федерации наблюдается существенная варибельность частоты гипертензивных расстройств

во время беременности, связанных, возможно, с социально-экономическими факторами, а также с генетической дифференциацией популяций, проживающих в данных регионах [16]. В связи с этим весьма актуальным представляется изучение роли rSNP в развитии ПЭ с учетом межпопуляционных различий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика обследованных групп. В ходе работы обследовано 1235 женщин, принадлежащих к трем этническим выборкам: якуты из г. Якутск ($N = 427$), буряты из г. Улан-Удэ ($N = 344$), русские из г. Томск ($N = 464$). В группу с ПЭ вошли 517 женщин (217 якуток, 161 русская и 139 буряток) с умеренной и тяжелой степенью ПЭ. Диагноз ПЭ установлен врачами-акушерами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Контрольная группа представлена 718 женщинами (210 якуток, 303 русские и 205 буряток) с физиологично протекавшей беременностью и родами, а также с отсутствием неблагоприятного акушерского анамнеза. Материал собран на базе Родильного дома № 4 и Областного перинатального центра г. Томска, Перинатального центра РБ № 4 г. Якутска и Республиканского перинатального центра г. Улан-Удэ.

Выбор дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ). ДЭГ плацентарной ткани при ПЭ и физиологическом течении беременности выбирали, сопоставляя данные, полученные ранее с использованием микрочипов в лаборатории эволюционной генетики НИИМГ [11], с опубликованными результатами анализа транскриптома, выполненными с аналогичным дизайном. Всего проанализировано 28 статей (за период с 2002 по 2013 год) [17–44]. Выявлена дифференциальная экспрессия 165 генов плацентарной ткани (FC — fold change — кратность изменения уровня экспрессии гена больше 2, уровень значимости с поправкой на множественные сравнения менее 0.01), показавших ассоциацию с ПЭ в двух и более работах. Из них отобрано 23 гена, уровень транскрипции которых в плацентарной ткани русских статистически значимо различался, как показано нами ранее [11].

Выбор rSNP. В отобранных 23 ДЭГ с использованием он-лайн ресурса “RegulomeDB” проведен поиск наиболее значимых rSNP, влияющих на регуляцию экспрессии гена на уровне транскрипции. Известно, что значительная часть rSNP располагается в эволюционно высококонсервативных районах внутри некодирующих последовательностей [45], поэтому при поиске rSNP учитывали расстояния —5000 п.н. от начала и +5000 п.н. от конца гена, в которых находятся энхансеры и инсуляторы [13, 46]. Критерием отбора служили значения

“score”, равные 1, 2 и 3, определяющие степень доказательности регуляторности каждого полиморфного варианта анализируемого гена. В результате выявлен 481 rSNP. Для подбора мультиплекса использовали только те rSNP, у которых согласно проекту “1000 геномов” частота редкого аллеля превышала 5%. Среди выявленных rSNP такому критерию соответствовали только 202 rSNP в 23 ДЭГ, из которых в состав мультиплекса вошли 29 rSNP из 17 ДЭГ (табл. 1).

Мультиплексное генотипирование. Праймеры подбирали с помощью программного обеспечения Sequenom Assay Design (“Sequenom,” США),

нуклеотидные последовательности праймеров доступны по запросу у авторов. В работе использовали образцы ДНК, выделенные стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из цельной венозной крови. Мультиплексное генотипирование проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (“Sequenom”), как описано ранее [47].

Статистический анализ. Соответствие распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди–Вайнберга (ПХВ) проверяли по критерию χ^2 . Парное сравнение частот аллелей и геноти-

Таблица 1. Характеристика rSNP, входящих в мультиплекс для масс-спектрометрии

rSNP	Значение “score”	Локализация rSNP в гене	Ген	Локализация гена на хромосоме	Аллель
rs10423795	2b	Вблизи 5'-UTR	<i>LHB</i>	19q13.33	C/T
rs1523469	2b	Вблизи 5'-UTR	<i>BCL6</i>	3q27.3	A/C/G/T
rs3774298	2b	Вблизи 5'-UTR	<i>BCL6</i>	3q27.3	C/T
rs3821817	2b	5'-UTR	<i>BCL6</i>	3q27.3	C/G/T
rs7577727	3a	5'-UTR	<i>BCL6</i>	3q27.3	A/G
rs6779816	2b	Интрон	<i>BHLHE40</i>	3p26.1	A/G
rs7635972	2a	Вблизи 3'-UTR	<i>BHLHE40</i>	3p26.1	C/T
rs12691	2b	3'-UTR	<i>CEBPA</i>	19q13.11	C/T
rs11545664	1f	5'-UTR	<i>ENG</i>	9q34.11	A/G
rs9370165	3a	Вблизи 3'-UTR	<i>GSTA3</i>	6p12.2	C/T
rs10496196	2b	Вблизи 3'-UTR	<i>HK2</i>	2p13	A/C
rs3771787	2a	Интрон	<i>HK2</i>	2p13	G/T
rs72959687	2b	Вблизи 3'-UTR	<i>INHA</i>	2q35	A/C
rs56051972	2b	5'-UTR	<i>KRT19</i>	17q21.2	C/G
rs12678229	1f	Интрон	<i>NDRG1</i>	8q24.22	A/G
rs2227262	2b	Интрон	<i>NDRG1</i>	8q24.22	C/T
rs2977559	1f	Интрон	<i>NDRG1</i>	8q24.22	A/G
rs3802252	1f	Интрон	<i>NDRG1</i>	8q24.22	C/T
rs2142218	2b	Интрон	<i>NRIP1</i>	21q21.1	C/T
rs12083094	2b	Интрон	<i>PAPPA2</i>	1q25.2	G/T
rs10753141	2a	Вблизи 3'-UTR	<i>PAPPA2</i>	1q25.2	C/T
rs2532058	2b	Интрон	<i>PPP1R12C</i>	19q13.42	A/C
rs66707428	2b	5'-UTR	<i>PPP1R12C</i>	19q13.42	A/G
rs1671215	1b	Вблизи 3'-UTR	<i>RDH13</i>	19q13.42	A/C
rs1654439	1f	Вблизи 3'-UTR	<i>RDH13</i>	19q13.42	G/T
rs34845949	2b	Интрон	<i>SASH1</i>	6q24.3	C/T
rs2493911	2b	Интрон	<i>SASH1</i>	6q24.3	C/T
rs12609771	2b	Вблизи 5'-UTR	<i>SIGLEC6</i>	19q13.41	A/C
rs36011588	2b	Интрон	<i>TMEM136</i>	11q23.3	C/G

Примечание. Значение “score” базы данных “RegulomeDB”, характеризующее степень доказательности регуляторности SNP, обозначено цифровыми и буквенными символами. Наибольшими регуляторными свойствами обладают rSNP со значением “score”, равным 1a (регуляторные свойства уменьшаются с увеличением цифрового значения и в алфавитном порядке). Локализация rSNP в гене определена согласно данным базы NCBI.

пов между группами проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса или точного критерия Фишера. Для оценки ассоциации rSNP с ПЭ вычисляли отношение шансов (*OR*) и его 95%-ный доверительный интервал (95% CI).

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В обследованных группах из 29 изученных rSNP полиморфными оказались все, за исключением rs2493911 гена *SASH1* и rs7635972 гена *BHLHE40*. Анализ PXB по критерию χ^2 показал отклонение соответствия распределения частот генотипов ря-

да rSNP как в контрольной группе (русские – один rSNP, якуты – три, буряты – два), так и в группе с ПЭ (русские – четыре rSNP, якуты – четыре, буряты – один). Мы не наблюдали накопления отклонений от PXB по отдельным маркерам или популяциям. С учетом поправки Бонферрони ни одно из отклонений от PXB не достигало порогового уровня значимости ($p = 0.0017$). В целом, частоты аллелей и генотипов находились в диапазоне, наблюдаемом в мировых популяциях по данным проекта “1000 геномов” [48]. В табл. 2 представлено распределение частот аллелей rSNP в контрольных группах и у больных ПЭ, принадлежащих к трем этническим выборкам.

Анализ распределения частот генотипов и аллелей 29 rSNP у женщин с ПЭ из различных этниче-

Таблица 2. Распределение частот аллелей rSNP в анализируемых группах, %

rSNP	Предковый аллель	Преэклампсия			Контрольная группа		
		Русские, N = 161	Якуты, N = 217	Буряты, N = 139	Русские, N = 303	Якуты, N = 210	Буряты, N = 205
rs10423795	C	48	60	58	40	59	58
rs10496196	C	81	88	82	81	87	84
rs10753141	T	51	45	37	50	40	35
rs11545664	C	87	94	94	89	96	96
rs12083094	T	30	8	10	29	5	9
rs12609771	C	11	17	11	12	19	10
rs12678229	G	58	44	50	49	48	41
rs12691	A	10	4	1	12	2	2
rs1523469	T	92	90	87	94	89	90
rs1654439	T	13	8	7	9	9	6
rs1671215	C	76	71	64	74	67	62
rs2142218	C	20	61	57	17	57	56
rs2227262	G	87	89	86	84	84	86
rs2532058	C	59	77	76	61	77	79
rs2977559	A	44	41	40	45	38	40
rs34845949	T	67	76	65	71	78	70
rs36011588	C	57	45	60	61	46	54
rs3771787	A	76	68	72	81	73	73
rs3774298	A	66	55	59	64	58	58
rs3802252	A	45	60	48	45	52	48
rs3821817	C	76	80	77	77	83	75
rs56051972	C	63	96	92	65	93	93
rs66707428	A	93	91	93	91	91	86
rs6779816	A	81	86	80	83	87	82
rs72959687	A	75	87	77	81	88	82
rs75777727	A	95	96	92	95	97	94
rs9370165	T	95	65	62	95	69	61

Примечание. Представлены только те rSNP, частота редкого аллеля которых в популяции составила $\geq 5\%$.

ских выборок выявил статистически значимые отличия у восьми rSNP: rs10423795 гена *LHB*, rs3771787 гена *HK2*, rs72959687 гена *INHA*, rs34845949 гена *SASH1*, rs2227262, rs3802252, rs12678229 гена *NDRG1* и rs66707428 гена *PPP1R12C*. Примечательно, что только для гена *NDRG1* характерна ассоциация с ПЭ нескольких rSNP, выявленная в популяциях якутов и бурят. В табл. 3 представлено распределение частот генотипов и аллелей rSNP, значимо отличающихся в контрольной группе и в группе больных ПЭ в изученных популяциях.

В популяции русских в результате сравнения группы с ПЭ и контрольной группы выявлены статистически значимые различия в частотах трех rSNP: rs10423795 гена *LHB*, rs3771787 гена *HK2* и rs72959687 гена *INHA*. Отмечено значимое повышение частоты встречаемости генотипа CC маркера rs10423795 гена *LHB* ($p = 0.05$; $OR = 1.68$; $CI - 1.01-2.8$), аллеля C ($p = 0.02$; $OR = 1.39$; $CI - 1.05-1.84$) и снижение частоты аллеля T ($p = 0.02$; $OR = 0.72$; $CI - 0.54-0.95$) в группе с ПЭ. Установлена ассоциация генотипа GG полиморфного варианта rs3771787 гена *HK2* с развитием ПЭ ($p = 0.02$; $OR = 3.26$; $CI: 1.38-7.72$). Показана ассоциация полиморфного варианта rs72959687 гена *INHA* (генотип CC ($p = 0.02$; $OR = 2.6$; $CI - 1.2-5.6$) и аллель C ($p = 0.02$; $OR = 1.48$; $CI - 1.07-2.06$)) с развитием ПЭ, а также повышение частоты встречаемости аллеля A в контрольной группе ($p = 0.02$; $OR = 0.67$; $CI - 0.49-0.93$), что, вероятно, свидетельствует о протективных свойствах этого аллеля.

В якутской популяции с подверженностью к ПЭ связаны три rSNP в двух ДЭГ плацентарной ткани: *SASH1* (rs34845949) и *NDRG1* (rs2227262, rs3802252). Так, частота встречаемости генотипа CC полиморфного варианта rs34845949 гена *SASH1* в группе ПЭ статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p = 0.04$; $OR = 2.58$; $CI - 1.11-5.99$). С развитием ПЭ ассоциированы два полиморфных варианта, rs2227262 и rs3802252, гена *NDRG1*. Так, аллель C маркера rs2227262 статистически значимо чаще встречался в группе больных ПЭ ($p = 0.01$; $OR = 1.65$; $CI - 1.11-2.46$), в то же время значимое повышение частоты генотипа TT ($p = 0.01$; $OR = 0.09$; $CI - 0.01-0.73$) и аллеля T ($p = 0.01$; $OR = 0.61$; $CI - 0.41-0.9$) в контрольной группе указывает на их протективные свойства. В группе больных ПЭ частота аллеля T маркера rs3802252 статистически значимо повышена ($p = 0.02$; $OR = 1.38$; $CI - 1.05-1.81$), а частота аллеля C снижена ($p = 0.02$; $OR = 0.73$; $CI - 0.55-0.95$) по сравнению с контрольной группой.

В группе бурят с развитием ПЭ статистически значимо ассоциированы два rSNP: rs12678229 гена *NDRG1* и rs66707428 гена *PPP1R12C*. Установлена связь генотипа GG ($p = 0.04$; $OR = 1.93$; $CI - 1.10-3.41$) и аллеля G ($p = 0.02$; $OR = 1.45$; $CI -$

1.06–1.97) rs12678229 гена *NDRG1* с подверженностью к ПЭ. В свою очередь, аллель A ($p = 0.02$; $OR = 0.69$; $CI - 0.51-0.94$) проявил протективные свойства при данной патологии. Показано статистически значимое повышение частоты встречаемости генотипа AA ($p = 0.008$; $OR = 2.43$; $CI - 1.35-4.38$) и аллеля A ($p = 0.006$; $OR = 2.13$; $CI - 1.23-3.69$) полиморфизма rs66707428 гена *PPP1R12C* в группе больных ПЭ, тогда как снижение частоты встречаемости генотипа AG ($p = 0.008$; $OR = 0.4$; $CI - 0.22-0.72$) и аллеля G ($p = 0.006$; $OR = 0.47$; $CI - 0.27-0.81$) в группе больных свидетельствует об их протективных свойствах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью изучения генетической архитектуры ПЭ по системе rSNP в ДЭГ проведен биоинформатический анализ 28 статей, опубликованных за период с 2002 по 2013 год [17–44], в которых изучали транскриптом плацентарной ткани. Всего выявлено 165 общих ДЭГ, ассоциированных с развитием ПЭ в различных этнических группах. Из этих генов отобрали 23, уровень транскрипции которых статистически значимо отличался в плацентарной ткани русских женщин с ПЭ, как показано нами ранее [11]. Мультиплекс для генотипирования rSNP методом масс-спектрометрии подбирали таким образом, чтобы он включал максимально возможное количество ДЭГ.

Мы оценили распределение частот генотипов и аллелей 29 мультиплексированных rSNP 17 новых генов, ассоциированных с ПЭ, согласно результатам анализа транскриптома плацентарной ткани. Полученные данные свидетельствуют об ассоциации с ПЭ следующих восьми rSNP в шести ДЭГ: трех rSNP в трех ДЭГ в группе русских (*LHB*, *HK2*, *INHA*); трех rSNP в двух ДЭГ (*SASH1*, *NDRG1*) в якутской популяции; двух rSNP в двух ДЭГ (*NDRG1*, *PPP1R12C*) в бурятской популяции. Примечательно, что у якутов и бурят, представитель монголоидной расы, с развитием ПЭ ассоциированы несколько rSNP гена *NDRG1*, тогда как у русских (европеоиды) данная ассоциация отсутствует, что, вероятно, отражает расовую специфичность наследственной компоненты ПЭ. Однако эта гипотеза требует дальнейшего изучения с привлечением дополнительных этнических групп.

В табл. 4 представлена краткая функциональная характеристика ДЭГ плацентарной ткани, rSNP которых, как показано нами, ассоциированы с развитием ПЭ. Эти гены принадлежат к различным функциональным группам, для большинства из них характерно повышение уровня экспрессии при ПЭ.

Гены, ассоциация которых с риском развития ПЭ показана в нашей работе, являются новыми генами, предрасполагающими к данной патоло-

Таблица 3. Распределение частот генотипов и аллелей rSNP, ассоциированных с развитием ПЭ, в изученных популяциях

Популяция	Полиморфизм			Женщины с ПЭ	Контрольная группа	<i>p</i> *
Русские	<i>LHB</i> rs10423795	Частоты генотипов, %	CC	22	14	0.05
			CT	53	52	
			TT	25	34	
		Частота аллеля, %	T	52	60	0.02
	<i>HK2</i> rs3771787	Частоты генотипов, %	GG	9	3	0.02
			GT	30	33	
			TT	61	64	
		Частота аллеля, %	G	24	19	0.1
	<i>INHA</i> rs72959687	Частоты генотипов, %	CC	10	4	0.03
			CA	30	29	
			AA	60	67	
		Частота аллеля, %	C	25	19	0.02
Якуты	<i>NDRG1</i> rs2227262	Частоты генотипов, %	CC	79	72	0.01
			CT	20	23	
			TT	1	5	
		Частота аллеля, %	T	11	16	0.01
	<i>SASH1</i> rs34845949	Частоты генотипов, %	CC	9	4	0.04
			CT	29	36	
			TT	62	60	
		Частота аллеля, %	C	24	22	0.45
	<i>NDRG1</i> rs3802252	Частоты генотипов, %	CC	17	26	0.06
			CT	46	43	
			TT	37	31	
		Частота аллеля, %	C	40	48	0.02
Буряты	<i>NDRG1</i> rs12678229	Частоты генотипов, %	GG	23	14	0.04
			GA	53	54	
			AA	24	32	
		Частота аллеля, %	A	50	59	0.02
		<i>p</i> **		0.5	0.09	
	<i>PPP1R12C</i> rs66707428	Частоты генотипов, %	GG	1	1	0.008
			AG	12	26	
AA			87	73		
	Частота аллеля, %	A	93	86	0.006	

* – Уровень значимости *p* для критерия χ^2 с поправкой Йейтса или критерия Фишера получен при сравнении частот аллелей или генотипов в группе с ПЭ и в контрольной группе. Примечание. Представлены только те rSNP, частоты аллелей или генотипов которых статистически значимо различаются в контрольной группе и у больных с ПЭ в исследуемых популяциях. Полу жирным выделены статистически значимые отличия ($p \leq 0.05$).

гии беременности, впервые выявленными благодаря анализу транскриптома плацентарной ткани. Функции большинства из этих генов не определены однозначно, отсутствуют и сведения о роли их полиморфных вариантов в развитии ПЭ. Однако в ряде публикаций охарактеризованы молекулярные механизмы и функции продуктов некоторых генов, что позволяет предположительно установить их роль в развитии данной патологии [10, 36, 49–56].

Так, повышение уровня продукта гена *LHB* – β -полипептида лютеинизирующего гормона, в материнском кровотоке характерно для ПЭ, а по-

вышение уровня экспрессии гена может быть результатом физиологических изменений в трофобласте [36].

Изоформа *NDRG1* белков семейства *NDRG* наиболее активно экспрессируется в плаценте во втором и третьем триместре беременности, преимущественно в синцитиотрофобласте [49]. Активация экспрессии гена *NDRG1* в клетках трофобласта осуществляется при индуцированной форсколином дифференцировке и в условиях гипоксии [49, 50]. Показано, что повышенный уровень экспрессии гена *NDRG1* способствует дифференцировке и уменьшению повреждения клеток

Таблица 4. Характеристика генов, дифференциально экспрессирующихся в плацентарной ткани, гSNP в которых ассоциированы с развитием преэклампсии

№	Ген	Продукт гена	Основные функции	Изменение уровня экспрессии	Этнические выборки	Ссылка
1	<i>LHB</i>	β -Полипептид лютеинизирующего гормона	Способствует сперматогенезу и овуляции	N ↑ ↑ ↑	Жители США Европеоиды Европеоиды Европеоиды	[22] [23] [27] [36]
2	<i>HK2</i>	Гексокиназа 2	Участвует в метаболизме глюкозы	↑ ↑ ↑	Европеоиды Европеоиды Европеоиды	[11] [23] [26]
3	<i>INHA</i>	α -Субъединица белковых комплексов ингибина А и В	Регулирует многочисленные клеточные процессы, включая пролиферацию, апоптоз, иммунный ответ и секрецию гормонов	↑ N ↑ ↑ ↑	Жители США Жители США Европеоиды Монголоиды Европеоиды	[21] [22] [23] [31] [39]
4	<i>NDRG1</i>	Цитоплазматический белок суперсемейства гидролаз	Участвует в гормональном ответе, клеточном росте и дифференцировке. Опухолевый супрессор. Необходим для регуляции каспазы p53 и апоптоза	↑ ↑ ↑	Европеоиды Европеоиды Монголоиды	[11] [23] [31]
5	<i>PPP1R12C</i>	Регуляторная субъединица 12С фосфатазы 1	Регулирует каталитическую активность фосфатазы 1 дельта и сборку актинового цитоскелета	↑ ↑ ↓	Европеоиды Жители США Европеоиды	[11] [28] [38]
6	<i>SASH1</i>	SAM-SH3-домен-содержащий белок 1	Вероятно, играет роль в сигнальном пути. Выступает в качестве опухолевого супрессора	↑ N ↑ ↑	Европеоиды Жители США Европеоиды Европеоиды	[11] [22] [23] [26]

Примечание. Основные функции указаны по данным базы “GeneCards”. Уровень экспрессии считали измененным при кратности изменения FC > 2 и уровне значимости с поправкой на множественные сравнения менее 0.01. N – нет данных о характере изменений в уровне экспрессии. ↑ – Повышение, ↓ – снижение уровня экспрессии.

трофобласта, в то время как снижение приводит к уменьшению жизнеспособности клеток и увеличению апоптоза [50].

Продукт гена *INHА* – ингибин – фактор роста и дифференцировки, принадлежащий к суперсемейству TGF- β . Ранее показали что уровень ингибина А значительно повышается в сыворотке женщин с ПЭ [51, 52] преимущественно за счет клеток трофобласта [53], так как после удаления плаценты концентрация ингибина А в организме матери быстро достигает низкого уровня [54]. Увеличение уровня ингибина А в плацентарной ткани при ПЭ может быть индуцировано воспалительными цитокинами синцитиотрофобласта или окислительным стрессом [55]. Более вероятно, что увеличение уровня ингибина А является компенсаторным механизмом, вовлеченным в восстановление функций плаценты при ПЭ [10, 56].

Полученные в нашей работе данные показали значимую роль rSNP ДЭГ плацентарной ткани в развитии ПЭ в различных этнических группах, что, вероятно, свидетельствует о важной роли полиморфных сайтов в регуляторных участках генома в вариабельности уровня экспрессии плацентарной ткани при физиологично протекающей беременности и ПЭ. Для более углубленного понимания молекулярных механизмов, происходящих в плацентарной ткани, и установления роли выявленных нами rSNP в регуляции уровня экспрессии генов необходимо проанализировать основные биологические процессы, в которые вовлечены изучаемые гены, а также расширить список изучаемых rSNP.

На примере ПЭ нами применен новый способ поиска генетических маркеров МФЗ, основанный на комбинации геномных, транскриптомных и биоинформатических подходов. Он заключается в выборе ДЭГ на основании полногеномного анализа транскриптома плацентарной ткани по результатам собственного исследования и ранее опубликованных данных, биоинформатического поиска полиморфных маркеров в регуляторных участках этих ДЭГ, анализе ассоциаций с ПЭ методом случай-контроль. По нашему мнению, такой подход способен обнаружить новые потенциальные генетические маркеры в генах, предположительно вовлеченных в патогенез заболевания, которые, вероятно, входят в состав “упущенной наследуемости” при МФЗ и не могут быть выявлены при геномном анализе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-04-01467).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонцева Е.В., Брызгалов Л.О., Матвеева М.Ю., Кашина Е.В., Чердынцева Н.В., Меркулова Т.И. 2011. Поиск регуляторных SNPs, связанных с разви-

2. Jones B.L., Swallow D.M. 2011. The impact of cis-acting polymorphisms on the human phenotype. *Hugo J.* 5(1–4), 13–23. doi 10.1007/s11568-011-9155-4
3. Сидорова И.С. 2007. *Гестоз*. М.: Медицина.
4. Айламазян Э.К., Мозговая Е.В. 2008. *Гестоз: теория и практика*. М.: МЕДпресс-Информ. 272 с.
5. Ворожищева А.Ю., Трифонова Е.А., Будко Ю.К., Сереброва В.Н., Максимова Н.Р., Павлова К.К., Габидулина Т.В., Степанов В.А. 2013. Роль генетической вариабельности локуса ACVR2A в формировании подверженности к преэклампсии. *Мед. генетика*. 10, 35–40.
6. Duley L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.* 33(3), 130–137.
7. Steegers E., Daddelszen P., Duvekot J., Pijnenborg R. 2010. Pre-eclampsia. *Lancet*. 376, 631–644.
8. Проект “Мать и Дитя”. 2012. Гипертензия во время беременности. Преэклампсия. Эклампсия. Клинический протокол. М.: Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздравоохранения России, Институт здоровья семьи.
9. Pijnenborg R., Vercruyse L., Hanssens M., Brosens I. 2011. Endovascular trophoblast and preeclampsia: A reassessment. *Pregnancy Hypertension*. 1(1), 66–71.
10. Louwen F., Muschol-Steinmetz C., Reinhard J., Reitter A., Yuan J. 2012. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget*. 3(8), 759–773.
11. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И., Сереброва В.Н., Ворожищева А.Ю., Степанов В.А. 2014. Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией. *Acta Naturae*. 6, 2(21), 77–90.
12. Stranger B.E., Montgomery S.B., Dimas A.S., Parts L., Stagle O., Ingle C.E., Sekowska M., Smith G.D., Evans D., Gutierrez-Arcelus M., Price A., Raj T., Nisbett J., Nica A.C., Beazley C., Durbin R., Deloukas P., Dermitzakis E.T. 2012. Patterns of cis regulatory variation in diverse human populations. *PLoS Genet.* 8(4), e1002639. doi 10.1371/journal.pgen.1002639
13. Cheung V.G., Spielman R.S., Ewens K.G., Weber T.M., Morley M., Burdick J.T. 2005. Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association. *Nature*. 437, 1365–1369.
14. Stranger B.E., Nica A.C., Forrest M.S., Dimas A., Bird C.P., Beazley C., Ingle C.E., Dunning M., Flicek P., Koller D., Montgomery S., Tavaré S., Deloukas P., Dermitzakis E.T. 2007. Population genomics of human gene expression. *Nat. Genet.* 39, 1217–1224.
15. Goffinet F. 2010. *Epidemiology. Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 29(3), e7–e12. doi 10.1016/j.annfar.2010.02.010
16. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.gks.ru/>.
17. Jarvenpaa J., Vuoristo J.T., Savolainen E.R., Ukkola O., Vaskivuo T., Ryyanen M. 2007. Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol.* 23, 351–355.

18. Centlow M., Carninci P., Nemeth K., Mezey E., Brownstein M., Hansson S.R. 2008. Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertil. Steril.* **90**, 1834–1843.
19. Centlow M., Wingren C., Borrebaeck C., Brownstein M.J., Hansson S.R. 2011. Differential gene expression analysis of placentas with increased vascular resistance and pre-eclampsia using whole-genome microarrays. *J. Pregnancy.* **472354**. doi 10.1155/2011/472354
20. Toft J.H., Lian I.A., Tarca A.L., Erez O., Espinoza J., Eide I.P., Bjørge L., Draghici S., Romero R., Austgulen R. 2008. Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PIGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **21**, 267–273.
21. Enquobahrie D.A., Meller M., Rice K., Psaty B.M., Siscovick D.S., Williams M.A. 2008. Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **199**, 566–611.
22. Winn V.D., Gormley M., Paquet A.C., Kjaer-Sorensen K., Kramer A., Rumer K.K., Haimov-Kochman R., Yeh R.F., Overgaard M.T., Varki A., Oxvig C., Fisher S.J. 2009. Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. *Endocrinology.* **150**, 452–462.
23. Sitras V., Paulssen R.H., Gronaas H., Leirvik J., Hanssen T.A., Vartun A., Acharya G. 2009. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta.* **30**, 424–433.
24. Founds S.A., Conley Y.P., Lyons-Weiler J.F., Jeyabalan A., Hogge W.A., Conrad K.P. 2009. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta.* **30**, 15–24.
25. Lee G.S., Joe Y.S., Kim S.J., Shin J.C. 2010. Cytokine-related genes and oxidation-related genes detected in preeclamptic placentas. *Arch. Gynecol. Obstet.* **282**, 363–369.
26. Hoegh A.M., Borup R., Nielsen F.C., Sorensen S., Hviid T.V. 2010. Gene expression profiling of placentas affected by preeclampsia. *J. Biomed. Biotechnol.* **787545**. doi 10.1155/2010/787545
27. Varkonyi T., Nagy B., Fule T., Tarca A.L., Karaszki K., Schonleber J., Hupuczki P., Mihalik N., Kovalszky I., Rigó J., Jr., Meiri H., Papp Z., Romero R., Than N.G. 2011. Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta.* **32**, 21–29.
28. Tsai S., Hardison N.E., James A.H., Motsinger-Reif A.A., Bischoff S.R., Thames B.H., Piedrahita J.A. 2011. Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signalling pathways. *Placenta.* **32**, 175–182.
29. Chang S.D., Chao A.S., Peng H.H., Chang Y.L., Wang C.N., Cheng P.J., Lee Y.S., Chao A., Wang T.H. 2011. Analyses of placental gene expression in pregnancy-related hypertensive disorders. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* **50**, 283–291.
30. Kang J.H., Song H., Yoon J.A., Park D.Y., Kim S.H., Lee K.J., Farina A., Cho Y.K., Kim Y.N., Park S.W., Kim G.J., Shim S.H., Cha D.H. 2011. Preeclampsia leads to dysregulation of various signaling pathways in placenta. *J. Hypertens.* **29**, 928–936.
31. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M., Kato T., Sekiya T., KuraHASHI H., Udagawa Y. 2011. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 107. doi 10.1186/1477-7827-9-107
32. Nishizawa H., Pryor-Koishi K., Kato T., Kowa H., KuraHASHI H., Udagawa Y. 2007. Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe pre-eclampsia. *Placenta.* **28**, 487–497.
33. Mayor-Lynn K., Toloubeydokhti T., Cruz A.C., Chegini N. 2011. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod. Sci.* **18**, 46–56.
34. Junus K., Centlow M., Wikstrom A.K., Larsson I., Hansson S.R., Olovsson M. 2012. Gene expression profiling of placentae from women with early- and late-onset pre-eclampsia: down-regulation of the angiogenesis-related genes *ACVRL1* and *EGFL7* in early-onset disease. *Mol. Hum. Reprod.* **18**, 146–155.
35. Meng T., Chen H., Sun M., Wang H., Zhao G., Wang X. 2012. Identification of differential gene expression profiles in placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays. *OMICS.* **16**, 301–311.
36. Lapaire O., Grill S., Lalevee S., Kolla V., Hosli I., Hahn S. 2012. Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. *Fetal. Diagn. Ther.* **31**, 147–153.
37. Heikkilä A., Tuomisto T., Häkkinen S.K., Keski-Nisula L., Heinonen S., Ylä-Herttua S. 2005. Tumor suppressor and growth regulatory genes are overexpressed in severe early-onset preeclampsia – an array study on case-specific human preeclamptic placental tissue. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **84**(7), 679–689.
38. Løset M., Mundal S.B., Johnson M.P., Fenstad M.H., Freed K.A., Lian I.A., Eide I.P., Bjørge L., Blangero J., Moses E.K., Austgulen R. 2011. A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **204**(1), 84.e1–27. doi 10.1016/j.ajog.2010.08.043
39. Reimer T., Koczan D., Gerber B., Richter D., Thiesen H.J., Friese K. 2002. Microarray analysis of differentially expressed genes in placental tissue of pre-eclampsia: up-regulation of obesity-related genes. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 674–680.
40. Buimer M., Keijser R., Jebbink J.M., Wehkamp D., van Kampen A.H., Boer K., van der Post J.A., Ris-Stalpers C. 2008. Seven placental transcripts characterize HELLP-syndrome. *Placenta.* **29**(5), 444–453. doi 10.1016/j.placenta.2008.02.007
41. Hansson S.R., Chen Y., Brodzki J., Chen M., Hernandez-Andrade E., Inman J.M., Kozhich O.A., Larsson I., Marsál K., Medstrand P., Xiang C.C., Brownstein M.J. 2006. Gene expression profiling of human placentas from preeclamptic and normotensive pregnancies. *Mol. Hum. Reprod.* **12**(3), 169–179.
42. Yan Y.H., Yi P., Zheng Y.R., Yu L.L., Han J., Han X.M., Li L. 2013. Screening for preeclampsia pathogenesis related genes. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17** (22), 3083–3094.

43. Apps R., Sharkey A., Gardner L., Male V., Trotter M., Miller N., North R., Founds S., Moffett A. 2010. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. *Placenta*. **32**(1), 33–43. doi 10.1016/j.placenta.2010.10.010
44. Dunk C.E., Roggensack A.M., Cox B., Perkins J.E., Åsenius F., Keating S., Weksberg R., Kingdom J.C., Adamson S.L. 2012. A distinct microvascular endothelial gene expression profile in severe IUGR placentas. *Placenta*. **33**(4), 285–293. doi 10.1016/j.placenta.2011.12.020
45. Donfack J., Schneider D.H., Tan Z., Kurz T., Dubchak I., Frazer K.A., Ober C. 2005. Variation in conserved non-coding sequences on chromosome 5q and susceptibility to asthma and atopy. *Respir. Res.* **6**, 145.
46. Разин С.В., Гаврилов А.А., Ульянов С.В. 2015. Регуляторные элементы эукариотического генома, контролирующие транскрипцию. *Молекуляр. биология*. **49**(2), 212–223.
47. Степанов В.А., Трифонова Е.А. 2013. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека. *Молекуляр. биология*. **47**(6), 976–986.
48. The 1000 Genomes Project Consortium. 2012. An integrated map of genetic variation from 1092 human genomes. *Nature*. **491**, 56–63.
49. Choi S.J., Oh S.Y., Kim J.H., Sadovsky Y., Roh C.R. 2007. Increased expression of N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in placentas from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or pre-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **196**(1), 45.e1-7. doi 10.1016/j.ajog.2006.08.029
50. Chen B., Nelson D.M., Sadovsky Y. 2006. N-Myc downregulated gene 1 (NdrG1) modulates the response of term human trophoblasts to hypoxic injury. *J. Biol. Chem.* **281**(5), 2764–2772.
51. Muttukrishna S., Knight P.G., Groome N.P., Redman C.W., Ledger W.L. 1997. Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for pre-eclampsia. *Lancet*. **349**, 1285–1288.
52. Hamasaki T., Masuzaki H., Miyamura T., Yoshimura S., Hamaguchi N., Ishimaru T. 2000. High concentrations of serum inhibin in pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **71**, 7–11.
53. Florio P., Cobellis L., Luisi S., Ciarmela P., Severi F.M., Bocchi C., Petraglia F. 2001. Changes in inhibins and activin secretion in healthy and pathological pregnancies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **180**, 123–130.
54. Muttukrishna S., Child T.J., Groome N.P., Ledger W.L. 1997. Source of circulating levels of inhibin A, pro alpha C-containing inhibins and activin A in early pregnancy. *Hum. Reprod.* **12**, 1089–1093.
55. Shen Z., Cai L.Y., Suprpto I.S., Shenoy P., Zhou X. 2011. Placental and maternal serum inhibin A in patients with preeclampsia and small-for-gestational-age. *J. Obstet. Gynaecol.* **37**, 1290–1296.
56. Bersinger N.A., Groome N., Muttukrishna S. 2002. Pregnancy-associated and placental proteins in the placental tissue of normal pregnant women and patients with pre-eclampsia at term. *Eur. J. Endocrinol.* **147**, 785–793.

DETECTION OF NOVEL GENETIC MARKERS OF SUSCEPTIBILITY TO PREECLAMPSIA BASED ON THE ANALYSIS OF REGULATORY SITES IN DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN THE PLACENTAL TISSUE

V. N. Serebrova^{1,*}, E. A. Trifonova^{1,2}, T. V. Gabdulina³, I. Yu. Bukharina³, T. A. Agarkova³, I. D. Evtushenko⁴, N. R. Maksimova⁵, V. A. Stepanov^{1,2}

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia

²National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

³The Institute for Obstetrics and Gynecology, Tomsk, 634063 Russia

⁴Regional Perinatal Center, Tomsk, 634063 Russia

⁵Laboratory of Genome Medicine, Clinics of Medical Institute, North East Federal University, Yakutsk, 677019 Russia

*e-mail: vika.serebrova@medgenetics.ru

Regulatory single nucleotide polymorphisms (rSNPs) are the least studied group of SNP, however they play an essential role in the development of human pathology by altering the level of candidate genes expression. In this work we analyzed 29 rSNPs in 17 new candidate genes, associated with PE according to the analysis of the transcriptome in placental tissue. Three ethnic groups have been studied (Yakut, Russian, Buryat). We have detected significant associations of PE with eight rSNPs in six differentially expressed genes: rs10423795 in *LHB* gene, rs3771787 in *HK2* gene, rs72959687 in *INHA* gene, rs12678229, rs2227262 and rs3802252 in *NDRG1* gene, rs34845949 in *SASH1* gene, rs66707428 in *PPP1R12C* gene. We used the new approach for the detection of genetic markers of multifactorial diseases in the case of PE, based on combination of genomic, transcriptomic and bioinformatic approaches. This approach proved its efficiency and may be applied to detection of new potential genetic markers in genes involved in disease pathogenesis, reducing “missing heritability” in multifactorial diseases.

Keywords: preeclampsia, association study, genetic markers, Russian population, regulatory single-nucleotide polymorphisms (rSNPs), placenta, transcriptome