

Роль генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции в формировании структуры наследственной предрасположенности к привычному невынашиванию беременности

Трифонов Е.А.^{1,2}, Ганьжа О.А.², Габидулина Т.В.², Степанов В.А.¹

¹ НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, ekaterina.trifonova@medgenetics.ru

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск

В настоящее время продолжается активный поиск генетических предикторов привычного невынашивания беременности (ПНБ), являющегося одной из наиболее важных проблем, оказывающих отрицательное воздействие на репродуктивное здоровье женщины и обуславливающих высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности. Поскольку невынашивание беременности рассматривается большинством авторов как многофакторное состояние, то ген-генные взаимодействия могут играть важную роль в этиологии данного заболевания, являясь одним из источников его «недостающей наследуемости» («missing heritability»). В связи с этим, целью представленной работы являлся анализ ассоциации с ПНБ полиморфных вариантов генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, а также поиск межгенных взаимодействий, играющих значимую роль в формировании генетической предрасположенности к данной патологии. Показано, что в качестве генетических факторов, ассоциированных с предрасположенностью к данной патологии в русской этнической группе можно выделить аллели 677Т гена *MTHFR* и 894Т гена *NOS3*, а также генотипы 936СТ и 936ТТ гена *VEGF*. Продемонстрирована значимая роль аддитивного и эпистатического эффектов межгенных взаимодействий изученных полиморфных вариантов генов *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR* и *VEGF* в формировании генетической архитектуры ПНБ. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой информативности оценки риска развития невынашивания беременности при анализе комбинации генотипов нескольких аллельных вариантов по сравнению с данными, полученными на уровне отдельных полиморфных маркеров.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, однонуклеотидный полиморфный вариант, межгенные взаимодействия, эндотелиальная дисфункция.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The role of angiogenesis and endothelial dysfunction genes to recurrent miscarriage susceptibility

Trifonova E.A.^{1,2*}, Ganzha O.A.², Gabidulina T.V.², Stepanov V.A.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

The roles of genetic polymorphisms in the pathogenesis of recurrent miscarriage (RM) have been intensively studied. The main problems of active search for genetic predictors RM has become the phenomenon of «missing heritability». Complex diseases, including miscarriage are believed to have a polygenic basis and gene-gene interactions can play a significant role in the etiology of the disease. Gene-gene interactions can be a source of RM «missing heritability». This study was conducted to investigate the association of gene-gene interaction of angiogenesis and endothelial dysfunction genes polymorphisms and RM. It is shown that alleles of the 677T gene of the *MTHFR* gene, 894T of the *NOS3* gene, genotypes of the 936CT and 936TT of the *VEGF* gene are associated with a predisposition to this pathology in the Russian ethnic group. The significant role of additive and epistatic effects in the intergenic interactions of the polymorphic variants of the *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR*, and *VEGF* genes to recurrent miscarriage susceptibility has been demonstrated. It has been shown that the analysis of a combination of genotypes of several allelic variants is more informative in assessing the risk of developing miscarriage than an association analysis at the level of single polymorphic markers.

Keywords: recurrent miscarriage, single nucleotide polymorphism, gene-gene interactions, endothelial dysfunction.

Введение

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) остается одной из наиболее значимых проблем акушерства, оказывающих отрицательное воздействие на репродуктивное здоровье женщины и обуславливающих высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности. По

данным многих авторов, частота данного осложнения не имеет тенденции к снижению и составляет от 1 до 5% всех беременностей [1, 2, 3]. ПНБ — одна из самых трудных областей в репродуктивной медицине, так как этиология данного заболевания часто неизвестна, а современная диагностика и известные стратегии лечения, основанные на фактических данных, недостаточно эффективны [2, 4].

ПНБ является многофакторным заболеванием (МФЗ), развитию которого наиболее часто способствуют анатомические, инфекционные, иммунологические, эндокринные и генетические факторы в различных сочетаниях [3]. Согласно современным представлениям, в развитии ПНБ ранних сроков значимую роль играет наследственная предрасположенность со стороны родителей [3, 5, 6]. На сегодняшний день изучено более 230 генов-кандидатов ПНБ, имеющих отношение к тромбофилии и гиподиспазии, метаболизму фолиевой кислоты и витамина B₁₂, функционированию эндотелиальных клеток, метаболизму гормонов, иммунному ответу и другим процессам (база данных «HuGE Navigator»). Однако необходимо отметить, что результаты большинства этих исследований противоречивы и плохо воспроизводимы [6, 7]. Тем не менее, при обобщенном анализе литературных данных можно выделить ряд генетических маркеров, продемонстрировавших ассоциацию с ПНБ в нескольких метаанализах: C677T гена *MTHFR* (rs1801133), 4G/5G гена *SERPINE-1* (rs1799889), G894T (rs2070744) гена *NOS3*, I/D-полиморфизм гена *ACE* (rs4646994), G215C (rs1042522) гена *TP53*, G634C (rs2010963) и C936T (rs3025039) гена *VEGFA*, в связи с чем данные аллельные варианты несомненно представляют особый интерес при изучении предрасположенности к развитию ПНБ [8].

В последнее десятилетие фокус в исследованиях ассоциаций генетических маркеров с МФЗ человека постепенно смещается от оценки вклада отдельных полиморфных вариантов к определению эффектов

взаимодействия генов [9]. Поскольку ПНБ, несомненно, имеет полигенную основу, то ген-генные взаимодействия могут играть важную роль в этиологии данного заболевания, обуславливая противоречивые результаты проведенных ассоциативных исследований и являясь одним из источников его «недостающей наследуемости». В связи с вышеизложенным, целью представленной работы являлся анализ ассоциации с ПНБ полиморфных вариантов генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, а также поиск межгенных взаимодействий, играющих значимую роль в формировании генетической предрасположенности к данной патологии.

Материалы и методы

Обследовано 592 женщины из русской этнической выборки. Первую группу составили пациентки с ПНБ, критерием включения в группу было наличие в анамнезе не менее 2-х самопроизвольных потерь беременности, не связанных с аномалиями развития или хромосомной патологией плода. Критериями исключения из исследования являлись наличие анатомических причин привычных потерь беременности, гормональные нарушения во время беременности, аномалии кариотипа родителей. Группу контроля составили женщины с физиологически протекавшей беременностью и благоприятным акушерским анамнезом. Характеристика обследованных групп представлена в табл. 1. Минимальный возраст пациенток составил 18 лет, максимальный —

Характеристика исследуемых групп

Таблица 1

Обследованные группы	Кол-во индивидов	Возраст, лет
Контрольная группа	339	27,29 ± 4,60
Женщины с ПНБ	253	29,59 ± 4,49

Краткая характеристика исследованных полиморфных вариантов

Таблица 2

Ген и его локализация на хромосоме	SNP	Локализация в гене (по данным базы NCBI)	Аллели	Предковый аллель
<i>ACE</i> 17q22-q24	I/D rs4646994	Инtron 16	I/D	D
<i>MTHFR</i> 1p36.3	C677T rs1801133	Экзон 5	C/T	C
<i>SERPINE1</i> 7q21.3-q22	5G/4G rs1799889	5'-UTR	4G/5G	5G
<i>NOS3</i> 7q36	G894T rs1799983	Экзон 7	G/T	G
<i>VEGF</i> 6p21.3	C936T rs3025039	3'-UTR	C/T	C
	G634C rs2010963	5'-UTR	G/C	G
<i>TP53</i> 17p13.1	G215C rs1042522	Экзон 4	G/C	G

44 года. По показателю среднего возраста исследуемые группы были сопоставимы. Образцы крови исследуемых были собраны на базе НИИ медицинской генетики и НИИ акушерства, гинекологии и репродукции (г.Томск) в течение 2010—2014 гг. Биологическим материалом для исследования служила ДНК, выделенная из венозной крови пациентов.

В работе проводился молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов шести генов-кандидатов подверженности к ПНБ, выбранных на основании на наших предыдущих исследованиях (табл. 2): *ACE* (ангиотензин-превращающего фермента), *MTHFR* (метилентетрагидрофолатредуктазы), *SERPINE-1* (ингибитора активатора плазминогена 1 типа), *NOS3* (эндотелиальной синтазы оксида азота), *TP53* (супрессора опухолевого роста P53), *VEGF* (фактора роста эндотелия сосудов) [8].

Генотипирование маркеров rs4646994, rs1801133, rs1799889, rs1799983 осуществляли согласно протоколам, описанным ранее [10—13]. Генотипирование полиморфных вариантов rs3025039, rs2010963, rs1042522 проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием линейных разрушаемых проб «TaqMap Genotyping Assay» («AppliedBiosystems»). Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакетов статистических программ «Statistica 10.0», «MDR» и «Haploview 4.2». При сравнении частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса или точный тест Фишера для числа наблюдений хотя бы в одной из ячеек таблицы сопряженности менее 5. Для оценки ассоциаций SNPs с патологическим фенотипом вычисляли отношение шансов (OR) и доверительные интервалы (CI) для отношения шансов (95% CI). Тест на соответствие распределения генотипов закону Харди—Вайнберга в обеих выборках проводили по критерию χ^2 . Критический уровень значимости различий p , при котором нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась и принималась альтернативная, принимали равным 0,05. Анализ неравновесия по сцеплению (LD) проводился в программе «HaploView 4.2». LD между парами SNPs оценивалось с помощью коэффициента D' , предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r^2 Пирсона [14]. Анализ межгенных взаимодействий проводили в программе «Multifactor Dimensionality Reduction» методом снижения многомерной размерности, применяя алгоритм расширенного поиска (exhaustive search algorithm).

Результаты и обсуждение

Анализ распределения частот генотипов и аллелей в изученных выборках

В табл. 3 представлены распределение частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга и уровень значимости, полученный при сравнении групп больных с контрольными выборками.

Как видно, распределение частот генотипов во всех контрольных выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга, а частоты аллелей и генотипов находились в диапазоне мировых данных.

Из семи исследованных полиморфных вариантов статистически значимые различия были выявлены для четырех маркеров: C677T гена *MTHFR*, G894T гена *NOS3*, G634C и C936T гена *VEGF*. Так, аллель T полиморфного варианта C677T гена *MTHFR* был ассоциирован с повышенным риском подверженности ПНБ (OR = 1,41, CI: 1,08—1,84).

Известно, что несинонимичная замена C677T гена *MTHFR* приводит к значительному снижению активности метилентетрагидрофолатредуктазы, обусловленному заменой аминокислотного остатка аланина на валин в области связывания данного фермента с ко-фактором флавин-аденин-динуклеотидом [15]. Данный вариант представляет интерес в связи с патологическими состояниями, ведущими к накоплению гомоцистеина в организме и повреждению эндотелия сосудов с последующей активацией внутрисосудистого свертывания и развитием ряда гестационных осложнений, включая и ПНБ [16].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных выявлению ассоциации аллельного варианта C677T гена *MTHFR* и ПНБ, единого мнения по этому поводу до сих пор нет. Согласно результатам ряда метаанализов, генетический вариант C677T вносит значительный вклад в подверженность ПНБ [17, 18]. Однако другие исследования не обнаружили связи между аллельным вариантом C677T гена *MTHFR* и идиопатическим ПНБ [19, 20]. Исходя из данных отечественных авторов, носительство аллеля 677T гена *MTHFR* в 2 раза увеличивает риск развития неблагоприятных исходов периода гестации [21].

В настоящей работе была зафиксирована также ассоциация с ПНБ аллельного варианта G894T гена *NOS3*. Частота генотипа GG894 аллельного варианта была повышена у женщин в контрольной группе по сравнению с группой ПНБ (при сравнении группы индивидов с генотипом GG и выборки пациенток с генотипами GT и TT $\chi^2 = 5,68$; $p = 0,02$), что может свидетельствовать о протективном значении данного генотипа в отношении развития данной патологии (OR = 0,72; CI: 0,57—0,92). Наряду с этим в группе с ПНБ наблюдалось статистически значимое увеличение частоты аллеля 894T по сравнению с контрольной группой (38% против 30% соответственно), следовательно, аллель 894T может быть предрасполагающим к возникновению данной патологии (OR = 1,39; CI: 1,09—1,77).

Таблица 3

Распределение частот аллелей и генотипов в исследуемых группах

Исследуемые полиморфизмы (гены)			Исследуемые группы			
			ПНБ, N = 253	Контрольная группа, N = 339	OR, (95% CI)	Уровень значимости p для критерия χ^2 с поправкой Йетса ¹
C677T <i>MTHFR</i>	Частоты генотипов, %	CC	52	62	0,68 (0,49–0,94)	6,23 (p = 0,04*)
		CT	39	33	1,30 (0,93–1,83)	
		TT	9	5	1,70 (0,89–3,24)	
	Частота аллеля, %	T	28	22	1,41 (1,08–1,84)	6,47 (p = 0,01*)
	p ²		0,58	0,56		
I/D <i>ACE</i>	Частоты генотипов, %	II	25	25	0,99 (0,67–1,44)	0,06 (p = 0,97)
		ID	51	52	0,97 (0,70–1,35)	
		DD	24	23	1,05 (0,71–1,55)	
	Частота аллеля, %	D	49	49	1,02 (0,81–1,29)	0,04 (p = 0,85)
	p ²		0,65	0,44		
G894T <i>NOS3</i>	Частоты генотипов, %	GG	39	49	0,66 (0,47–0,92)	6,79 (p = 0,03*)
		GT	46	41	1,27 (0,91–1,76)	
		TT	15	10	1,50 (0,92–2,46)	
	Частота аллеля, %	T	38	30	1,39 (1,09–1,77)	6,92 (p = 0,009*)
	p ²		0,78	0,38		
G215C <i>TP53</i>	Частоты генотипов, %	CC	10	9	1,03 (0,59–1,81)	0,95 (p = 0,62)
		CG	39	43	0,85 (0,61–1,19)	
		GG	51	48	1,16 (0,83–1,61)	
	Частота аллеля, %	C	29	31	0,92 (0,71–1,19)	0,39 (p = 0,53)
	p ²		0,35	0,94		
G634C <i>VEGF</i>	Частоты генотипов, %	CC	19	8	2,59 (1,57–4,27)	25,70 (p<0,001*)
		CG	44	36	1,41 (1,01–1,98)	
		GG	37	56	0,46 (0,33–0,65)	
	Частота аллеля, %	C	41	26	1,97 (1,53–2,52)	28,57 (p<0,001*)
	p ²		0,13	0,13		
C936T <i>VEGF</i>	Частоты генотипов, %	CC	43	64	0,42 (0,30–0,58)	27,99 (p<0,001*)
		CT	44	30	1,85 (1,31–2,60)	
		TT	13	6	2,44 (1,35–4,41)	
	Частота аллеля, %	T	35	21	2,06 (1,58–2,68)	29,34 (p<0,001*)
	p ²		0,71	0,13		
4G/5G <i>SERPINE-1</i>	Частоты генотипов, %	4G/4G	30	32	0,90 (0,63–1,29)	0,99 (p = 0,61)
		4G/5G	55	51	1,18 (0,85–1,65)	
		5G/5G	15	17	0,87 (0,63–1,29)	
	Частота аллеля, %	5G	42	43	0,94 (0,74–1,20)	0,01 (p = 0,94)
	p ²		0,08	0,57		

Примечание. N — Количество индивидов в группе. ¹ — Значение критерия χ^2 с поправкой Йетса и/или точный критерий Фишера и уровень значимости (p) получены при сравнении частот генотипов и аллелей контрольной группы и группы с ПНБ; ² — Уровень значимости, достигнутый при оценке соответствия равновесию Харди–Вайнберга; * — статистически значимые различия между исследуемыми группами

Известно, что полиморфизм G894T гена *NOS3* представляет собой замену гуанина на тимин в позиции 894 в седьмом экзоне гена *NOS3*, что приводит к замене глутамина на аспарагин в оксигеназном домене фермента и изменению его каталитической активности [10]. Показано, что вариант G894T гена *NOS3* обуславливает уменьшение активности NO-синтазы, биодоступность оксида азота (NO) и снижение содержания NO в плазме крови [22]. Патогенетическая роль эндогенного NO при ПНБ связана с развитием эндотелиальной дисфункции, как в материнском организме, так и в фетоплацентарном комплексе [23]. Так, показаны существенные различия в активности NO-синтазы и уровня NO в плазме и эндометрии женщин с ПНБ при сравнении данных параметров с группой контроля [24, 25]. Принимая во внимание значимую роль NO-синтазы и оксида азота в процессах ангиогенеза, контроле сосудистого тонуса и антитромботических эффектах в эндометрии во время децидуализации и в плаценте на ранних сроках беременности, изменения в гене, кодирующем эндотелиальную NO-синтазу, могут служить потенциальными факторами предрасположенности к ПНБ [23].

Несколько метаанализов выявили тесную связь между вариантом G894T гена *NOS3* и идиопатическим ПНБ [23, 26, 27]. В китайской этнической группе было зафиксировано значимое снижение частоты аллеля 894G у пациенток с ПНБ [28], что согласуется с данными, полученными в популяциях индийцев [22], корейцев [29], а также в настоящей работе. Наряду с этим Shin S.J. и соавторы обнаружили, что генотип 894TT гена *NOS3* значимо чаще встречался в группе с ПНБ по сравнению с контрольной выборкой (OR = 2,39; CI:1,25—4,58; $p = 0,008$) [29]. В представленной работе также наблюдалось повышение частоты данного генотипа в группе с ПНБ по сравнению с контрольной группой (15% и 10% соответственно), однако эти различия не были статистически значимы. Следует отметить, что результаты ряда работ, посвященных анализу ассоциации полиморфизма G894T гена *NOS3* с ПНБ, не обнаруживают связи этого генетического маркера с данной патологией [30, 31].

В настоящей работе ассоциация с ПНБ была установлена также для маркеров G634C и C936T гена *VEGF* (табл. 3). Так, в группе пациенток с ПНБ отмечались статистически значимое повышение частоты генотипа CC (OR = 2,59; CI:1,57—4,27; $\chi^2 = 13,57$; $p = 0,0002$) и частоты генотипа CG (OR = 1,41; CI:1,01—1,98; $\chi^2 = 4,03$; $p = 0,044$) полиморфного варианта G634C по сравнению с контрольной группой. Частота аллеля 634C также была выше у женщин с ПНБ по сравнению с группой сравнения (OR = 1,97; CI:1,53—2,52; $\chi^2 = 28,57$; $p < 0,001$).

Второй изученный маркер гена *VEGF* — C936T также показал статистическую значимую ассоциацию с ПНБ: генотипы CT и TT встречались достоверно чаще в груп-

пе с ПНБ по сравнению с выборкой женщин с физиологическим течением беременности (OR = 1,85; CI:1,31—2,60; $\chi^2 = 11,75$; $p = 0,0006$ и OR = 2,44; CI:1,35—4,41; $\chi^2 = 8,21$; $p = 0,004$ соответственно). Аллель T полиморфного варианта C936T гена *VEGF* преобладал в группе ПНБ по сравнению с группой контроля (OR = 2,06; CI:1,58—2,68; $\chi^2 = 16,12$; $p < 0,001$). Таким образом, генотипы CT и TT аллельного варианта C936T, а также генотипы CC и GC полиморфизма G634C гена *VEGF* являются аллелями риска в структуре подверженности ПНБ у женщин г. Томска.

Аналогичные результаты были показаны в работе Ху Х. и соавторов [32]. Метаанализ, включающий 1832 пациентки с ПНБ и 2271 женщину с благоприятным акушерским анамнезом, продемонстрировал ассоциацию с ПНБ аллеля C (OR = 1,16, CI:1,03—1,31, $p = 0,01$) и генотипа CC (OR = 1,36, CI:1,06—1,74, $p = 0,02$) полиморфного варианта G634C. Наряду с этим было установлено, что аллель C (OR = 0,72, CI:0,56—0,93, $p = 0,01$) и генотип CC (OR = 0,69, CI:0,53—0,89, $p < 0,005$) варианта C936T обладают протективными свойствами в отношении развития ПНБ [32]. В то же время, в некоторых научных исследованиях связи между вариантами C936T и G634C гена *VEGF* и ПНБ обнаружено не было [33—35].

Известно, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет ключевую роль в регуляции ангиогенеза, так как увеличивает сосудистую проницаемость и является основным хемотаксическим и митогенным стимулом для эндотелиоцитов. Вышеперечисленные свойства обуславливают значимость VEGF как в процессах эмбрионального развития, так и в материнской сосудистой адаптации к беременности [36, 37]. В представленной работе с развитием ПНБ показана ассоциация полиморфных вариантов G634C и C936T гена *VEGFA*, расположенных соответственно в 5'- и 3'-нетранслируемых областях данного локуса и ассоциированных с вариабельностью уровня его транскрипта [38, 39]. Показано, что нарушение экспрессии гена *VEGFA* в плацентарной ткани может приводить к нарушениям перфузии в эндометрии, и как следствие к ряду неблагоприятных исходов беременности, включая ПНБ, внутриутробную гибель и задержку развития плода, а также преэклампсию [40].

В настоящей работе при сравнении обследованных групп не было выявлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов аллельных вариантов 4G/5G *SERPINE-1*, G215C *TP53* и I/D-полиморфизма гена *ACE*.

Таким образом, в качестве генетических факторов, ассоциированных с повышенной предрасположенностью к ПНБ и вовлеченных в формирование гиперкоагуляции и эндотелиальной дисфункции при беременности у русских можно выделить полиморфные варианты G894T гена *NOS3*, C677T гена *MTHFR*, а также C936T и G634C гена *VEGF*.

Анализ межгенных взаимодействий
изученных генов-кандидатов ПНБ

Известно, что развитие МФЗ, в том числе и акушерских осложнений, обусловлено аддитивным действием множества генов и их аллельных вариантов, кумулятивный эффект которых может составлять до 20–70% общего риска, обусловленного генетическими факторами [41]. В связи с этим в настоящем исследовании был проведен анализ межгенных взаимодействий изученных генов-кандидатов ПНБ.

В результате MDR-анализа выявлено две модели для предсказания риска возникновения ПНБ (табл. 4).

Модель сочетания двух аллельных вариантов гена *VEGF* C936T (rs3025039) и G634C (rs2010963) (рис. 1) демонстрирует 10 из 10 непротиворечивых кросс-валидаций ($p = 0,001$). Балансовая точность всей модели составила 67,97%, чувствительность — 60,34%, специфичность — 75,59% ($p < 0,0001$).

Из рисунка видно, что предрасполагающими для формирования ПНБ у женщин г. Томска сочетаниями генотипов будут являться следующие: CC/CC; CG/CT; CC/CT; GG/TT; CG/TT; CC/TT (*VEGF* G634C/C936T соответственно). Комбинации GG/CC; GG/CT; CG/CC являются низкорисковыми для развития ПНБ.

Для оценки значимости данной модели в настоящей работе был проведен анализ неравновесия по сцеплению (LD) между изученными SNPs гена *VEGF*. Установлено, что в исследованных группах локусы C936T (rs3025039) и G634C (rs2010963) гена *VEGF* при наследовании не сцеплены между собой ($D' = 0,05$; $r^2 = 0,002$ для контрольной группы и $D' = 0,012$; $r^2 = 0,001$ для группы с ПНБ).

Необходимо отметить, что статистически значимые различия при сравнении исследуемых групп были показаны для пяти сочетаний генотипов из девяти обнаруженных (табл. 5). Так, было показано значимое увеличение частоты комбинации генотипов 936CT-634CC в группе с ПНБ по сравнению с контрольной группой (10,3% и 2,4% соответственно). Вычисленный коэффициент отношения шансов показал, что носительство данного сочетания генотипов повышает риск развития ПНБ более чем в 4 раза ($OR = 4,75$; $CI: 1,95–11,61$), в то время как при анализе ассоциации отдельных полиморфных вариантов показатель отношения шансов для дан-

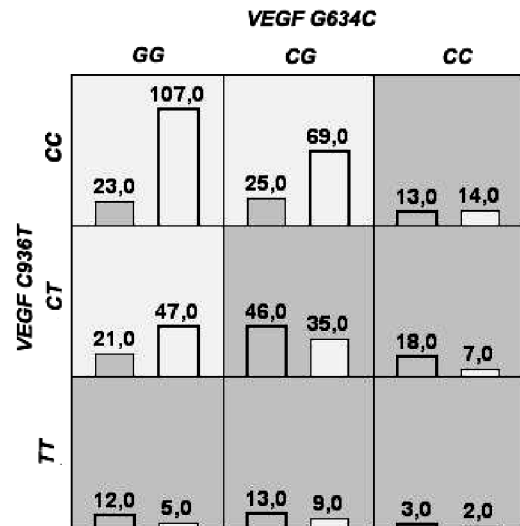


Рис. 1. Распределение сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *VEGF* C936T (rs3025039) и G634C (rs2010963) в группе больных ПНБ и в группе сравнения: темно-серые ячейки — генотипы повышенного риска ПНБ, серые ячейки — генотипы пониженного риска, левые столбики — группа больных ПНБ, правые столбики — группа сравнения.

ных генотипов был существенно ниже: 936CT ($OR = 1,85$; $CI: 1,31–2,60$), 634CC ($OR = 2,59$; $CI: 1,57–4,27$). Также нами были обнаружены следующие рисковые сочетания генотипов: 936CT-634CG ($OR = 2,67$; $CI: 1,64–4,35$) и 936TT-634GG ($OR = 4,30$; $CI: 1,49–12,41$), частота которых в группе ПНБ была статистически больше, чем в контрольной группе (26,4% и 7,4% против 11,9% и 1,7% соответственно). Частота сочетания генотипов 936CC-634GG и 936CC-634CG была статистически выше в контрольной группе (36,3% и 23,4% соответственно) по сравнению с группой больных (13,2% и 14,4% соответственно). Это позволяет сделать вывод, что две данных комбинации генотипов снижают риск возникновения ПНБ и обладают протективным эффектом ($OR = 0,55$; $CI: 0,33–0,91$ и $OR = 0,27$; $CI: 0,16–0,44$ соответственно).

Интересно, что в исследуемых группах не выявлено сочетания генотипов, включающих все мутантные аллели (936TT-634CC). Можно предположить, что индивиды, наследующие все мутантные аллели по данным по-

Характеристика моделей межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных маркеров

Модель	Tr. Bal. Acc	Ts. Bal. Acc	Se	Sp	CV Cons	Общий p (χ^2)
C936T и G634C <i>VEGF</i>	0,6797	0,6739	0,6034	0,7559	10/10	$p < 0,001$ (28,94)
5G/4G <i>SERPINE-1</i> ; I/D <i>ACE</i> ; G894T <i>NOS3</i> ; C677T <i>MTHFR</i> ; C936T и G634C <i>VEGF</i>	0,8792	0,5914	0,8793	0,8644	9/10	$p < 0,001$ (121,09)

Примечание. Tr. Bal. Acc — тренировочная сбалансированная точность; Ts. Bal. Acc — тестируемая сбалансированная точность; Se — чувствительность модели, Sp — специфичность; CV Cons — кросс-валидация.

лиморфным вариантам являются редко встречающимися или нежизнеспособными, хотя это предположение требует дальнейшего исследования на более репрезентативной выборке.

Модель, включающая шесть полиморфных вариантов генов *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR* и *VEGF* (табл. 4) обладает CVC-согласованностью 9 из 10 ($p = 0,001$). Общая балансовая точность составила 87,19% при чувствительности 87,93% и специфичности 86,44% ($p < 0,0001$).

В рамках данной модели в исследуемых группах было обнаружено 258 из 729 возможных сочетаний, из которых

для дальнейшего анализа нами было отобрано 34 комбинации, встречающихся хотя бы в одной из исследуемых выборок с частотой более 1%. Для 4-х из 34-х анализируемых комбинаций генотипов были показаны статистически значимые различия (табл. 6). Отношение шансов (OR) и доверительный интервал (95% CI) удалось рассчитать только для 3-х сочетаний шести исследуемых локусов, так как при их наличии в обеих группах количество наблюдений было отлично от 0 [109ДГ]. В группе с ПНБ при сравнении с контрольной выборкой было выявлено увеличение частоты сочетаний 936CT-634CG-677TT-4G/5G-894GT-DD (5,2% и 0,7% соответственно) и

Частота встречаемости статистически значимых сочетаний генотипов гена *VEGF* в группе с ПНБ и контрольной группе

Таблица 5

Сочетание генотипов (C936T-G634C)	Группа с ПНБ (n = 253)	Контрольная группа (n = 339)	Критерий χ^2 (p-уровень)
	Процентное соотношение		
CC-GG	13,2	36,3	27,89 (p<0,001)
CC-CG	14,4	23,4	5,01 (0,025)
CT-CG	26,4	11,9	15,26 (0,0001)
CT-CC	10,3	2,4	12,25 (0,005)
TT-GG	7,4	1,7	7,05 (0,008)

Примечание. n — количество индивидов в группе

Частота встречаемости статистически значимых сочетаний генотипов локусов *VEGF*, *MTHFR*, *SERPINE-1*, *NOS3*, *ACE* в исследуемых группах

Таблица 6

Сочетание генотипов C936T-G634C-C677T-4G/5G-G894T-I/D	Группа с ПНБ (n = 253)	Контрольная группа (n = 339)	Критерий Фишера
	Процентное соотношение		
936CC-634GG-677CC-4G/5G-894GG-II	0	2,7	p = 0,029
936CC-634GG-677CT-4G/5G-894GG-ID	0,6	3,4	p = 0,015
936CT-634CG-677TT-4G/5G-894GT-ID	2,9	0,3	p = 0,041
936CT-634CG-677TT-4G/5G-894GT-DD	5,2	0,7	p = 0,016
Примечание. n — количество индивидов в группе			



Рис. 2. Дендрограмма межгенных взаимодействий локусов *MTHFR* C677T, *SERPINE-1* 5G/4G, *ACE* I/D, *NOS3* G894T, *TP53* G215C, *VEGF* C936T и G634C при ПНБ. Длинные линии в дендрограмме описывают слабую взаимосвязь между маркерами. Короткие линии, соединяющие два предиктора, отражают сильное взаимодействие между локусами. Цвет каждой линии обозначает тип взаимодействия: красный и оранжевый представляют синергетические взаимодействия, т.е. комплементарности между локусами исследуемых генов, желто-коричневый — независимый эффект; зеленый и синий описывают аддитивный эффект, т.е. эффект полимерии каждого предиктора.

936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-II (2,9% против 0,3% соответственно). Установлено, что при наличии комбинации генотипов 936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-DD риск возникновения ПНБ увеличивается почти в 9 раз ($OR = 8,70$; $CI:1,01-75,08$), а при наличии 936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-ID — в 5 раз ($OR = 5,20$; $CI:1,04-26,06$). Сочетание генотипов 936СТ-634СG-677ТТ-4G/5G-894GT-ID обладает протективным эффектом, так как снижает риск возникновения данного заболевания ($OR = 0,20$; $CI:0,05-0,89$).

Необходимо отметить, что при анализе данной модели взаимодействия изучаемых локусов получено небольшое количество значимых сочетаний генотипов, что обусловлено проблемой небольшого размера выборок, которая возникает при множественном тестировании вследствие увеличения числа подгрупп при возрастании количества взаимодействующих генов в обучающей выборке. Интересным представляется факт включения в данную модель аллельного варианта 4G/5G гена *SERPINE-1* и I/D-полиморфизма гена *ACE*, не продемонстрировавших в настоящем исследовании ассоциацию с ПНБ при анализе на уровне отдельных локусов.

Возможности программы MDR позволяют представить в виде дендрограммы вклад каждого SNP в риск развития ПНБ и оценить характер межгенных взаимодействий (рис. 2).

Исходя из данной дендрограммы, между маркерами I/D гена *ACE*, 5G/4G гена *SERPINE-1* и G215C гена *TP53* отмечается межгенное взаимодействие с явным синергичным эффектом, в то же время ген-генные взаимодействия между локусами C677T гена *MTHFR*, G894T гена *NOS3*, C936T и G634C гена *VEGF* носят аддитивный характер в отношении риска развития ПНБ у женщин русской национальности г. Томска.

Заключение

В настоящее время продолжается активный поиск генетических маркеров ПНБ. При этом возникла и стала важнейшей проблема «недостающей наследуемости» («missing heritability»), одним из источников которой могут являться межгенные взаимодействия. В рамках представленного исследования был осуществлен анализ роли полиморфных вариантов генов регуляции ангиогенеза и генов, ассоциированных с развитием эндотелиальной дисфункции, в подверженности к ПНБ. Показано, что в качестве генетических факторов, ассоциированных с предрасположенностью к данной патологии в русской этнической группе можно выделить аллели 677T гена *MTHFR* и 894T гена *NOS3*, а также генотипы 936СТ и 936ТТ гена *VEGF*. Продемонстрирована значимая роль аддитивного и эпистатического эффектов межгенных взаимодействий изученных полиморфных вариантов генов *SERPINE-1*, *ACE*, *NOS3*, *MTHFR* и *VEGF* в формировании генетической архитектуры ПНБ. Вышеописанные результаты свидетельствуют о более высо-

кой информативности оценки риска развития невынашивания беременности при анализе комбинации генотипов нескольких аллельных вариантов по сравнению с данными, полученными на уровне отдельных полиморфных маркеров. Дальнейшие исследования ген-генных взаимодействий в структуре подверженности к ПНБ могут стать основой для постепенного заполнения пробелов в «недостающей наследуемости» данной патологии.

Список литературы

1. Сидельникова ВМ, Сухих ГТ. Невынашивание беременности. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 534с.
2. Радзинский ВЕ, Соловьева АВ, Оленев АС. Невынашивание беременности. Что в перспективе? Репродуктивная медицина. 2014;3-4(20):8-10.
3. Rull K, Nagiraja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Frontiers in Genetics*. 2012;3(34):1-13.
4. Sergi C, Al Jishi T, Walker M. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291(3):671-679.
5. Kolte AM, Nielsen HS, Steffensen R, et al. Inheritance of the 8.1 ancestral haplotype in recurrent pregnancy loss. *EvolMedPublicHealth*. 2015;(1):325-331.
6. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528с.
7. Shi X, Xie X, Jia Y, et al. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet*. 2017 Feb;91(2):265-284.
8. Трифонова ЕА, Ганьжа ОА, Габидулина ТВ и др. Генетические факторы в развитии привычного невынашивания беременности: обзор данных мета-анализов. *Акушерство и гинекология*. 2017;(4):14-20.
9. Aschard H, Lutz S, Maus B, et al. Challenges and opportunities in genome-wide environmental interaction (GWEI) studies. *Hum Genet*. 2012 Oct;131(10):1591-613.
10. Nasr HB, Dimassi S, M'hadhbi R, et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obesity research & clinical practice*. 2016;10(4):465-475.
11. Blasiak J, Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochimica Polonica*. 2000;47(1):191-199.
12. Kalita J, Somarajan BI, Kumar B, et al. A study of ACE and ADD1 polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clinica chimica acta*. 2011;412(7):642-646.
13. El-Aziz TAA, Mohamed RH. Influence of MTHFR C677T gene polymorphism in the development of cardiovascular disease in Egyptian patients with rheumatoid arthritis. *Gene*. 2017;610:127-132.
14. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265.
15. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86(6):1716-1722.

16. Трифонова ЕА, Габидулина ТВ, Агаркова ТА и др. Гомоцистеин, полиморфизмы гена MTHFR и осложнения беременности. *Акушерство и гинекология*. 2011; 2: 8-15.
17. Cao Y, Xu J, Zhang Z, et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene*. 2013; 514:105-111.
18. Chen H, Yang X, Lu M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in China: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2016;293(2):283-290.
19. Yousefian E, Kardi MT, Allahveisi A. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism in Iranian women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2014;16(7):1-4.
20. Isaoglu U, Ulug P, Delibas IB, et al. The association between inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss in Turkish women. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*. 2014;41(2):177-181.
21. Медяникова ИВ, Гудинова ЖВ. Распространенность генетических полиморфизмов, ассоциируемых с тромбеморрагическими и сосудистыми осложнениями гестационного периода, в когорте беременных женщин российской популяции. *Акушерство и гинекология*. 2012;4:10-15.
22. Parveen F, Faridi RM, Alam S, et al. Genetic analysis of eNOS gene polymorphisms in association with recurrent miscarriage among North Indian women. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(1):124-131.
23. Perez N, Peterlin B, Volk M, et al. A critical update on endothelial nitric oxide synthase gene variations in women with idiopathic recurrent spontaneous abortion: genetic association study, systematic review and meta-analyses. 2015;21(5):466-478.
24. Banerjee P, Ghosh S, Dutta M, et al. Identification of key contributory factors responsible for vascular dysfunction in idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *PloS one*. 2013;8(11):1-9.
25. Najafi T, Novin MG, Ghazi R, et al. Altered endometrial expression of endothelial nitric oxide synthase in women with unexplained recurrent miscarriage and infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2012;25(4):408-414.
26. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6):803-12.
27. Cao Y, Zhang Z, Xu J, et al. Genetic association studies of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a systematic and meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(6):3981-3989.
28. Luo L, Li DH, Wei SG, et al. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene associated with recurrent miscarriage. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(3):3879-3886.
29. Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (? 786T> C, 4a4b, 894G> T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010;152(1):64-67.
30. Zammiti W, Mtraoui N, Mahjoub T. Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in Tunisian women. *American journal of reproductive immunology*. 2008;59(2):139-145.
31. Yang C, Fangfang W, Jie L, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012;29(1):1167-1173.
32. Xu X, Du C, Li H, et al. Association of VEGF genetic polymorphisms with recurrent spontaneous abortion risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0123696.
33. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, et al. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and sterility*. 2010;93(4):1244-1247.
34. Traina E, Daher S, Moron AF, et al. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(1):53-57.
35. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 2005;83(4):959-963.
36. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GS. The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta*. 1999;20:661-667.
37. Yalcintepe SA, Silan F, Hacivelioglu SO, et al. Fetal VEGF genotype is more important for abortion risk than mother genotype. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2014;3(2):88-94.
38. Amirchaghmaghi E, Rezaei A, Moini A, et al. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Cell J*. 2015;4(16):538-545.
39. Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22(5):371-378.
40. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Human reproduction update*. 2012;18(4):436-457.
41. Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet*. 2009 Jun;10(6):392-404.