

Оценка роли полиморфизма генов системы гемостаза и генов, отвечающих за формирование дисфункции эндотелия, в развитии гестационных осложнений

Чуманова О.В.², Пасман Н.М.², Воронина Е.Н.¹, Филипенко М.Л.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, просп. академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия.
E-mail: chumanova.o@ngs.ru

Изучено влияние полиморфизма генов системы гемостаза и генов дисфункции эндотелия на развитие осложнений беременности. В исследование были включены женщины из двух групп: экспериментальной ($n = 257$) и контрольной ($n = 190$). В первую группу включались женщины с патологией беременности (преэклампсия, преждевременная отслойка плаценты, декомпенсированная фетоплацентарная недостаточность, синдром потери плода). В группу контроля вошли здоровые женщины, родившие живого доношенного ребенка с оценкой по шкале Апгар 8–10 баллов и не имеющие акушерской патологии. Было установлено, что аллель А полиморфного локуса G20210A гена протромбина, аллель С локуса G634C гена *VEGF*, аллель 4G полиморфного локуса 5G/4G 675 гена *PAI-1* являются факторами риска развития акушерской патологии ($p < 0,05$). Полиморфизмы генов *MTHFR*, *eNOS*, *FV* не приводят к развитию гестационных осложнений.

Ключевые слова: осложнения беременности, тромбофилия, эндотелиальная дисфункция, полиморфизм генов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Evaluation of a role of hemostasis system genes polymorphism and the genes which are responsible for formation of an endothelium dysfunction in development of gestational complications

Chumanova O.V., Pasman N.M., Voronina E.N., Philipenko M.L.

The strength of association between polymorphisms of hemostasis system and endothelium dysfunction genes and development of gestational complications was assessed. The research included two groups of women: experimental ($n = 257$) and control ($n = 190$). The first group consisted of women with pregnancy pathology (preeclampsia, placental abruption, strong placental failure, syndrome of a fetus loss). The control group comprised women without pregnancy pathology who gave birth to a healthy child. Allele A of prothrombin G20210A, allele C of locus G634C (gene *VEGF*), allele 4G of the polymorphic locus 5G/4G of gene *PAI-1* were associated with risk of development of obstetric pathology ($p < 0.05$). Polymorphisms of *MTHFR*, *eNOS*, *FV* genes don't lead to development of gestational complications.

Keywords: pregnancy complications, thrombophilia, endothelial dysfunction, polymorphism of genes.

Введение

Повышенное тромбообразование и нарушение тонуса маточно-плацентарных сосудов в акушерской практике являются значимыми причинами развития осложнений беременности. Различают наследственные и приобретенные факторы риска развития этих осложнений.

К первой группе относятся наследственные формы тромбофилии и генетически обусловленная дисфункция эндотелия, которые, согласно данным литературы, имеют место в патогенезе более 30% всех гестационных осложнений [1, 2]. В эту группу попадают наиболее

грозные осложнения, определяющие четверть структуры материнской смертности в РФ: преэклампсия, эклампсия и отслойка плаценты [3].

Все исследуемые осложнения являются следствием снижения кровотока в маточно-плацентарных сосудах, приводя к нарушению имплантации, плацентации и дальнейшего развития плодного яйца.

Целью работы являлось определение роли следующих полиморфизмов в развитии осложненного течения беременности: G20210A *FII*, rs1799963; G1691A *FV*, rs6025; 5G/4G 675 *PAI-1*, rs1799768; C677T *MTHFR*, rs1801133; G634C *VEGF*, rs2010936; Glu298Asp *eNOS*, rs1799983.

Материалы и методы

Для проведения исследования были выбраны следующие группы: основная группа ($n = 257$) и контрольная ($n = 190$). В первую группу включались женщины с патологией беременности (преэклампсия, преждевременная отслойка плаценты, декомпенсированная фетоплацентарная недостаточность, синдром потери плода). Для устранения других причин развития гестационных осложнений были установлены критерии исключения из экспериментальной группы: врожденные пороки развития репродуктивной системы, тяжелая урогенитальная инфекция, декомпенсация хронических экстрагенитальных заболеваний, эндометриоз, миома матки, аномалии хромосомного набора плода при проведении карiotипирования, антифосфолипидный синдром.

В группу контроля вошли здоровые женщины, родившие живого доношенного ребенка с оценкой по шкале Апгар 8–10 баллов и не имеющие акушерской патологии. Предпочтение отдавалось женщинам, имеющим двух и более детей.

Все женщины, включенные в исследуемые группы были пациентками лечебно-диагностического центра — ООО «Клиника профессора Пасман» г. Новосибирска. Генотипирование проводилось на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

В обеих группах проводился забор венозной крови. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом [4].

Типирование полиморфных локусов *G20210A FII*, *G1691A FV*, *5G/4G 675 PAI-1*, *C677T MTHFR*, *G634C VEGF*, *Glu298Asp eNOS* проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, содержащей 40–100 нг ДНК, 300 нМ прямого и обратного праймера (представлены в табл. 1); по 100 нМ TaqMan-зондов, конъюгированных с FAM или HEX; 200 мкМ dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу — I ед. акт./реакц. Амплификация проводилась с использованием амплификатора CFX-96 (Bio-Rad, США)

в следующих условиях: начальная денатурация 3 мин при 96°C; затем 50 циклов, включающих денатурацию при 96°C — 8 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 60°C — 40 с [5, 6]. Интерпретацию результатов проводили путем анализа графиков накопления флюоресценции по соотношению значений флюоресценции в диапазонах эмиссии красителей FAM и HEX.

Соответствие частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Достоверность различий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах оценивали с использованием критерия χ^2 с учетом поправки Йетса. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Для оценки величины относительного риска использовали отношение шансов (OR) с его доверительным интервалом (CI) при уровне доверия 95%. Вычисления производили с использованием программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия).

Результаты и обсуждение

Частоты встречаемости генотипов всех исследуемых полиморфизмов в обеих группах обследованных соответствуют закону Харди—Вайнберга и представлены в табл. 2.

Вариант гена протромбина *G20210A*

Для гена фактора II нами были обнаружены статистически значимые различия между контрольной и экспериментальной группой в частотах встречаемости аллелей ($\chi^2 = 6,09$; $p = 0,01357$). Риск развития акушерской патологии при наличии аллеля А, приводящего к возрастанию концентрации протромбина в крови в несколько раз, увеличивается в 3,3 раза (OR = 0,179; С.И. = 0,056–0,569) [7]. Частоты встречаемости этого варианта гена протромбина в обеих группах выше среднепопуляционных. Это может быть обусловлено тем, что в популяционных исследованиях используется смешанная выборка из мужчин и женщин, и не проводится какой-либо отбор по наличию/отсутствию заболеваний.

Таблица 1

Структуры праймеров для проведения генотипирования

Ген	Полиморфный локус	Последовательность праймеров	
		Прямой	Обратный
<i>FII</i>	G20210A	5'-GGTCCCAATAAAAAGTGA CTCTCATC-3'	5'-CATCTTTAATGCCTGTAAATTCGAC-3'
<i>FV</i>	G1691A	5'-GTAAGAGCAGATCCCTGGACAGTC-3'	5'-GCAGTGATGGTACTGATAAAAATCG-3'
<i>MTHFR</i>	C677T	5'-GTTACCCCAAAGGCCACCC-3'	5'-GGAAGAATGTGTCAGCCTCGAAG-3'
<i>PAI-1</i>	5G/4G 675	5'-TGCAGCCAGCCACGACGTGATTGTCTA-3'	5'-AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT-3'
<i>VEGF</i>	G634C	5'-CTTGCCTTGCTGCTCTACC-3'	5'-CACACAGGATGGCTTGAAG-3'
<i>eNOS</i>	Glu298Asp	5'-TGGCTGGTACATGAGCACTGAGAT-3'	5'-CACGTTGATTTCCACTGCTGCCTT-3'

*Мутация Лейдена G1691A
гена V фактора свертывания крови*

Эта мутация заключается в замене гуанина на аденин в позиции 1691. Она приводит к резистентности фактора V к расщепляющему действию протеина C, в результате чего уменьшается скорость инактивации протромбиназного комплекса и возрастает количество тромбина [8]. Ассоциаций между наличием этой мутации и развитием гестационных осложнений выявлено не было. В данной работе исследуемая группа состояла из женщин с различными нарушениями протекания беременности. При выделении подгруппы с преэклампсией, состоящей из 98 женщин, было показано, что при наличии мутации Лейдена риск развития преэклампсии возрастает в 3,4 раза ($\chi^2 = 5,94$; $p = 0,01478$; OR = 3,351; CI = 1,200–9,362). Это подтверждает данные

литературы: по данным метаанализа из 47 статей была установлена ассоциация лейденской мутации с развитием тяжелой и умеренной преэклампсии [9].

Полиморфный локус C677T гена MTHFR

MTHFR является ключевым ферментом фолатного цикла, ответственным за образование активной формы фолиевой кислоты. Аллель T локуса C677T гена MTHFR, наличие которого приводит к снижению активности фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, вызывает повышение уровня гомоцистеина в крови, что приводит к повреждению эндотелия и нарушению микроциркуляции [10, 11]. Однако в нашем исследовании было показано, что полиморфный локус C677T гена MTHFR не ассоциирует с развитием акушерской патологии.

Таблица 2

Частоты аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов в экспериментальной и контрольной группах

Группа	Частота встречаемости аллеля (n)		Частота встречаемости генотипа (n)			Соответствие закону Харди–Вайнберга (χ^2 , df = 1), p (Pearson)
Полиморфный локус G20210A гена II фактора						
	G	A	G/G	G/A	A/A	
Контроль	0,989 (376)	0,011 (4)	0,979 (186)	0,021 (4)	0,005 (0)	0,883417
Группа риска	0,963 (495)	0,037 (19)	0,934 (240)	0,058 (15)	0,0078 (2)	0,3862
Полиморфный локус G1691A гена V фактора						
	G	A	G/G	G/A	A/A	
Контроль	0,984 (374)	0,016 (6)	0,968 (184)	0,032 (6)	0 (0)	0,824988
Группа риска	0,965 (496)	0,035 (18)	0,934 (240)	0,062 (16)	0,004 (1)	0,206190
Полиморфный локус C677T гена MTHFR						
	C	T	C/C	C/T	T/T	
Контроль	0,679 (258)	0,321 (122)	0,468 (89)	0,421 (80)	0,111 (21)	0,63749
Группа риска	0,621 (319)	0,379 (195)	0,389 (100)	0,463 (119)	0,148 (38)	0,788879
Полиморфный локус 675 5G/4G гена PAI-1						
	5G	4G	5G/5G	5G/4G	4G/4G	
Контроль	0,684 (260)	0,316 (120)	0,474 (90)	0,421 (80)	0,105 (20)	0,723761
Группа риска	0,572 (294)	0,428 (220)	0,337 (87)	0,465 (120)	0,194 (50)	0,457141
Полиморфный локус G634C гена VEGF						
	G	C	G/G	G/C	C/C	
Контроль	0,792 (301)	0,208 (79)	0,621 (118)	0,342 (65)	0,037 (7)	0,593425
Группа риска	0,731 (377)	0,269 (139)	0,531 (137)	0,399 (103)	0,070 (18)	0,819370
Полиморфный локус Glu298Asp гена eNOS						
	Glu	Asp	Glu/Glu	Glu/Asp	Asp/Asp	
Контроль	0,721 (274)	0,279 (106)	0,521 (99)	0,400 (76)	0,079 (15)	0,937961
Группа риска	0,679 (349)	0,321 (165)	0,444 (114)	0,471 (121)	0,085 (22)	0,199454

Полиморфный локус 675 5G/4G гена PAI-1

Для гена *PAI-1* статистически значимые различия между группами наблюдались в распределении как аллелей ($\chi^2 = 11,68$; $p = 0,00063$), так и генотипов ($\chi^2 = 8,34$; $p = 0,00387$). Для женщин, имеющих генотип 4G/4G, риск развития осложнений по сравнению с генотипом 5G/5G увеличивается в 2,6 раза (OR = 2,586; CI = 1,424—4,696), в то время как у гетерозигот — в 1,8 раза. Развитие осложнений связывают с тем, что присутствие аллеля 4G сопровождается повышением экспрессии гена и увеличением концентрации PAI-1 в крови, что приводит к снижению активности системы фибринолиза и увеличению содержания фибрина в сосудистом русле, в том числе и в маточно-плацентарных сосудах [12].

Полиморфный локус G634C гена VEGF

Для гена сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) было показано наличие ассоциаций аллеля С с развитием патологического течения беременности ($\chi^2 = 4,49$; $p = 0,03402$). Это наблюдается за счет развития вазоконстрикции, повышения сосудистой проницаемости и нарушения процессов неоангиогенеза [13, 14].

Полиморфный локус Glu298Asp гена eNOS

Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы приводит к уменьшению содержания оксида азота, являющегося основным вазодилататором, что сопровождается усилением вазоконстрикции. В литературе описаны ассоциации этого полиморфизма с развитием ишемической болезни сердца, гипертонической болезни [15, 16]. Нами не было выявлено ассоциаций полиморфизма гена eNOS с развитием патологии беременности. По данным Беспаловой С.Н. и соавт., полиморфизм этого гена приводит к развитию преэклампсии, однако его связь с развитием прочих осложнений не установлена [9].

Заключение

В результате проведенной работы выявлены ассоциации аллелей 20210A гена протромбина, 634C гена *VEGF*, 4G полиморфного локуса 5G/4G 675 гена *PAI-1* с развитием осложнений беременности, обусловленных тромбофилией и дисфункцией эндотелия. Обнаружение генетических маркеров позволяет определить группу женщин с высокой вероятностью развития акушерской патологии и вовремя начать соответствующую терапию, включающую применение низкомолекулярных гепаринов, избегая патологического течения беременности [17].

Описанные выше полиморфизмы генов *MTHFR*, *eNOS*, *FV* не приводят к развитию гестационных осложнений.

Список литературы

1. Simcox L.E., Ormsher L., Tower C., Greer I.A. Thrombophilia and Pregnancy Complications // *Int J Mol Sci*. 2015 Nov 30; 16 (12).
2. Близначская С.Л. Основные наследственные тромбофилии и их роль при привычном невынашивании беременности // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук, 2009. С.4-5.
3. Агеева Л.И., Александрова Г.А., Зайченко Н.М. Здоровоохранение в России. 2015 // *Стат.сб./ Росстат.* - М., 2015. С. 26.4. Бондарь И.А., Филипенко М.Л., Шабельникова О.Ю. Ассоциация полиморфных маркеров rs7903146 гена TCF7L2 и rs1801282 гена PPARG (Pro12Ala) с сахарным диабетом 2 типа в Новосибирской области // *Научно-практический медицинский журнал «Сахарный диабет»*, 2013.С.22-24.
5. Березина О.В., Вайнер А.С., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. Ассоциация полиморфных вариантов генов фолатного цикла с риском развития агрессивных и индолетных лимфом // *Сибирский научный медицинский журнал*, выпуск № 2, том 31. 2011. С. 38-41.
6. Воронина Е.Н., Пикалов И.В., Хрипко Ю.Н., Филипенко М.Л. Исследование мутаций гена фактора гемокоагуляции V и гена протромбина в популяции г. Новосибирска // *Консилиум* №4, 2004. С.39-41.
7. Poort S., Rosendaal F., Reitsma P. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis // *Blood* 1996; 88, 3698-3703.
8. Aparicio C, Dahlback B. Molecular mechanisms of activated protein C resistance. Properties of factor V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene // *Biochem J*. 1996 Jan 15; 313: 467-472.
9. Баранов В.С. Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины // Под ред. В. С. Баранова. - СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. - 528 с.
10. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Агаркова Т.А. Гомоцистеин, полиморфизмы гена MTHFR и осложнения беременности, 2011, 13-16.
11. Бицадзе В.О., Макацария А.Д. Тромбофилические состояния в акушерской практике. М., 2001. С.89-92.
12. Пизова Н.В. Тромбофилии: генетические полиморфизмы и сосудистые катастрофы, Москва, 2013; 88.
13. Arroyo J.A., Winn V.D. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta // *Semin. Perinatol*, 2008. V. 32.172-177.
14. Makris A., Thornton C., Thompson J. et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1 // *Kidney Int*. 2007. P 977-984.
15. Кузнецова Т.Ю., Гаврилов Д.В., Самоходская Л.М. Влияние полиморфизма Glu298Asp гена эндотелиальной NO синтазы на развитие поражений органов-мишеней при установлении артериальной гипертензии в молодом возрасте // *Сибирский медицинский журнал*, 2010. С.33-36.
16. Куба А.А., Никонова Ю.М., Феликсова О.М. Ассоциация генетического полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота с сердечно-сосудистой патологией // *Современные проблемы науки и образования*, 2015. №3.
17. Бицадзе В.О., Макацария А.Д. Применение низкомолекулярных гепаринов в акушерской практике // *Рус. мед. журн*. 2000. Т. 8, № 18. С. 775-778.