

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

О. В. Чуманова², Н. М. Пасман²,
Е. Н. Воронина¹, М. Л. Филипенко¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Согласно данным литературы, наследственные формы тромбофилии и генетически обусловленная дисфункция эндотелия отмечаются в патогенезе более 30 % всех акушерских осложнений [1; 2]. В эту группу попадают наиболее грозные, определяющие четверть в структуре материнской смертности в РФ: преэклампсия, эклампсия и отслойка плаценты [3]. Кроме того, такие осложнения, как тяжелая плацентарная недостаточность, самопроизвольные выкидыши, замершая беременность, приводят к снижению рождаемости, оставляя семьи без желанных детей.

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

Цель исследования. Определить роль следующих полиморфизмов в развитии осложненного течения беременности: G20210A FII, G1691A FV, 5G/4G 675 PAI-1, C677T MTHFR, G634C VEGF, Glu298Asp eNOS.

Материалы и методы. Для проведения исследования выбраны следующие группы: экспериментальная ($n = 257$) 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 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 кариотипирования.

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.

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 (табл. 1); по 100 нМ TaqMan-зондов, конъюгированных с FAM или HEX; 200 мкМ dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу – 1 ед. акт./реакц. Амплификация проводилась с помощью амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) в следующих условиях: начальная денатурация 3 мин при 96 °С; затем 50 циклов, включающих денатурацию при 96 °С – 8 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 60 °С – 40 с [5; 6]. Интерпретацию результатов проводили с помощью анализа графиков накопления флюоресценции по соотношению значений флюоресценции в диапазонах эмиссии красителей FAM и HEX.

Соответствие частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга проверяли с помощью критерия χ^2 . Достоверность отличий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах оценивали с помощью критерия χ^2 с учетом поправки Йетса. Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$. Для оценки величины относительного риска использовали отношение шансов (OR) с его доверительным интервалом (С. I.) при уровне доверия 95 %. Вычисления производили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, http://ihg.qsf.de/ihg/index_engl.html).

Результаты. Частоты встречаемости генотипов всех исследуемых полиморфизмов соответствуют закону Харди – Вайнберга и представлены в табл. 2.

Мутация гена протромбина G20210A. Для гена II фактора нами обнаружены статистически значимые отличия 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 ($OR = 0,179$; $C. I. = 0,056-0,569$) [7]. Частоты встречаемости мутации 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 или отсутствию заболеваний.

Мутация Лейдена G1691A гена V фактора свертывания крови заключается в точечной замене гуанина на аденин в позиции 1691. Она приводит к резистентности V фактора 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 ($\chi^2 = 5,94$; $p = 0,01478$; $OR = 3,351$; $C. I. = 1,200-9,362$).

Полиморфный локус C677T гена MTHFR. MTHFR является ключевым ферментом фолатного цикла, приводя к образованию активной формы фолиевой кислоты. Аллель T локуса C677T гена MTHFR, наличие которого приводит к снижению активности фермента метилентетрагидрофолат-редуктазы, вызывает повышение уровня гомоцистеина в крови, что приводит к повреждению эндотелия и нарушению микроциркуляции [9; 10]. Однако в нашем исследовании было показано, что полиморфный локус C677T гена MTHFR не приводит к развитию акушерской патологии.

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 раз ($OR = 2,586$; $C. I. = 1,424-4,696$), в то

время как у гетерозигот – в 1,8 раза. Развитие осложнений связывают с тем, что присутствие аллели 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 [11].

Полиморфный локус G634C гена VEGF. Для гена сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) было показано наличие ассоциаций аллели C с развитием патологического течения беременности ($\chi^2 = 4,49$; $p = 0,03402$). Это наблюдается за счет развития вазоконстрикции, повышения сосудистой проницаемости и нарушения процессов неангиогенеза [12; 13].

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 [14; 15]. Нами не выявлено ассоциаций полиморфизма гена eNOS с развитием патологии беременности.

Закключение. Выявлены ассоциации аллелей 20210A гена протромбина, 634C гена VEGF, аллели 4G полиморфного локуса 5G/4G 675 гена PAI-1 с развитием осложненной беременности, обусловленных развитием тромбофилии и дисфункции эндотелия, в популяции женщин Новосибирска. 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 [16].

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

Список литературы:

1. Simcox L. E., Ormesher L., Tower C., Greer I. A. Thrombophilia and Pregnancy Complications // *Int J Mol Sci.* 2015; 16 (12): 28418–28428.
2. Близначкая С. Л. Основные наследственные тромбофилии и их роль при привычном невынашивании беременности: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009.

3. Агеева Л. И., Александрова Г. А., Зайченко Н. М. *Здравоохранение в России*. 2015: Стат. сб. М., 2015.
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 // *Сахарный диабет*. 2013. № 1. 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 индолентных лимфом // *Сибирский научн. медицинский журн*. 2011. Т. 2, вып. 2. С. 38–41.
6. Воронина Е. Н., Пикалов И. В., Хрипко Ю. Н., Филипенко М. Л. Исследование мутаций гена фактора гемостаза V и гена протромбина в популяции г. Новосибирска // *Консилиум*. 2004. № 4. 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 Arg 506 to Gln mutation in the factor V gene // *Biochem J*. 1996; 313: 467–472.
9. Трифонова Е. А., Габидулина Т. В., Агаркова Т. А. Гомоцистеин, полиморфизмы гена MTHFR и осложнения беременности // *Акушерство и гинекология*. 2011. № 2. С. 13–16.
10. Бицадзе В. О., Макацария А. Д. Тромбофилические состояния в акушерской практике. М., 2001. С. 89–92.
11. Пизова Н. В. Тромбофилии: генетические полиморфизмы и сосудистые катастрофы. М., 2013.
12. Arroyo J. A., Winn V. D. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta // *Semin. Perinatol*. 2008; 32: 172–177.
13. Makris A., Thornton C., Thompson J. et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1 // *Kidney Int*. 2007; 71(10): 977–984.
14. 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 журн*. 2010. № 25. С. 33–36.
15. 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. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17352> (дата обращения: 30.03.2017).
16. Бицадзе В. О., Макацария А. Д. Применение низкомолекулярных гепаринов в акушерской практике // *Рус. мед. журн*. 2000. Т. 8, № 18. С. 775–778.

Таблица 1. Структуры праймеров для проведения генотипирования

Ген	Полиморфный локус	Последовательность праймеров	
		прямой	обратный
FII	G20210A	5'-GGTTCCTCAA-TAAAAGTGA CTCTCATC-3'	5'-CATCTTTAATGCCTG-TAAATTCGAC-3'
FV	G1691A	5'-GTAAGAGCAGATCCCTG-GACAGTC-3'	5'-GCAGTGATGGTACTG-ATAAAAATCG-3'
MTHFR	C677T	5'-GTTACCCCAAAGGCC-ACCC-3'	5'-GGAAGAATGTGTCAGCCT-CGAAG-3'
PAI-1	5G/4G 675	5'-TGCAGCCAGCCACGAC-GTGATTGTCTA-3'	5'-AAGCTTTTACCATG-GTAACCCCTGGT-3'
VEGF	G634C	5'-CTTGCCTTGCTGCTC-TACC-3'	5'-CACACAGGATGGCTTGAAG-3'
eNOS	Glu298Asp	5'-TGGCTGGTACATGAGCAC-TGAGAT-3'	5'-CACGTTGATTTCCAC-TGCTGCCTT-3'

Таблица 2. Частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов в экспериментальных и контрольных группах

Группа	Частота встречаемости аллеля (n)		Частота встречаемости генотипа (n)			p
<i>Полиморфный локус G20210A гена II фактора</i>						
	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
<i>Полиморфный локус G1691A гена V фактора</i>						
	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
<i>Полиморфный локус C677T гена MTHFR</i>						
	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
<i>Полиморфный локус 675 5G/4G гена PAI-1</i>						
	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
<i>Полиморфный локус G634C гена VEGF</i>						
	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
<i>Полиморфный локус Glu298Asp гена eNOS</i>						
	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