

На правах рукописи

ЕЛЫКОВА Анна Владимировна

**АССОЦИАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ
ВАЗОАКТИВНЫХ ГОРМОНОВ С РАЗВИТИЕМ ПРЕЭКЛАМПСИИ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Белгород – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

Чурносов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Солодилова Мария Андреевна, доктор биологических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии

Батлуцкая Ирина Витальевна, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, заведующая кафедрой биотехнологии и микробиологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 2013 года в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13
доктор биологических наук

В.И.Кочкаров

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Преэклампсия (ПЭ) представляет собой осложнение беременности, характеризующееся артериальной гипертензией, протеинурией, отеками, а также глубокими расстройствами функции сосудистой системы, гемостаза, иммунитета, гемодинамики и микроциркуляции, плацентарной недостаточностью, нарушением функции почек, печени, легких [Сидорова И.С., 2008; Айламазян Э.К. и др., 2008; Иванов И. И. 2010]. Частота преэклампсии практически не снижается на протяжении последних двадцати лет и составляет по данным разных авторов 7-20% [Zhang J. et. al., 2009; Kalkunte S. et. al., 2009; Xia Y. 2009; Качалина Т.С. и др., 2010; Радзинский В.Е., 2012]. ПЭ развивается у 6-12% здоровых беременных и у 20-40% беременных, имеющих экстрагенитальную патологию [Roten L.T. et al., 2011; Вихлеева Е.М., 2009; Сидельникова В.М. и др., 2010]. Преэклампсия является одним из самых тяжелых осложнений беременности, приводя к наступлению преждевременных родов, преждевременной отслойке нормально расположенной плаценты, плацентарной недостаточности, рождению детей с низкой массой тела [Савельева И.В. и др., 2012]. В структуре причин материнской смертности ПЭ, по данным литературы, составляет 15-25% [Duley L., 2009; Berg C.J. et al., 2009; Steegers E.A. et al., 2010; Johansson A, et al., 2011; Roten L.T., et al., 2011; Williams P.J., et al., 2011; Вихлеева Е.М., 2009; Сухих Л.А. и др., 2010]. Преэклампсия как причина перинатальной смертности занимает 1-2 места [Радзинский В.Е. и др., 2010]. Перинатальные потери при ПЭ в 4 раза превышают таковые в группе здоровых женщин. Показатель перинатальной смертности при преэклампсии составляет 23-27% [Тимохина Е.В., 2009; Трунова Л.А. и др., 2011].

В этиопатогенезе преэклампсии важная роль отводится сосудистым реакциям, в основе которых лежит генерализованный спазм сосудов, обуславливающий ишемические и гипоксические изменения в тканях с нарушением их функции, развитие эндотелиальной дисфункции, полиорганной недостаточности [Young V.C. et.al., 2010]. Как свидетельствуют результаты ряда исследований [Kartik P., 2010; López-Carbajal M J., et al., 2012; Direkvand-Moghadam A., et al., 2012; Демин Г. С., 2008; Добродомова И.С., 2011] значимую роль в развитии ПЭ играют генетические факторы. Генетическая компонента заболевания может составлять до 50% [Wang A et al., 2009; Young V.C., 2010; Roten L.T. et al., 2011]. В настоящее время известно свыше 30 генов-кандидатов преэклампсии. Локальные генные сети преэклампсии включают гены метаболизма, гены эндотелиальной дисфункции, гены сосудистой системы, гены ростовых факторов и цитокинов, гены эндокринной системы, гены главного комплекса гистосовместимости [Баранов В.С. и

др., 2009]. Однако, следует отметить, что подавляющее число генетических исследований преэклампсии проведено за рубежом и характеризуется противоречивостью полученных данных [Cackovic M., et al., 2008; Kalkunte S. et al., 2009; Seremak-Mrozikiewicz A. Cunha V.M. et al., 2011; Chen H. et al., 2012; Song G.G. et al., 2013]. Клинико-генетические работы, посвящённые молекулярно-генетическим аспектам ПЭ, в России немногочисленны [Демин Г.С., 2008; Поздняков И.М. и др., 2008; Добродомова И.С., 2011], что диктует необходимость проведения данных исследований в Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы "Научные и научно - педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы (гос.контракт №02.740.11.0496 "Генетические факторы мультифакториальных заболеваний человека").

Цель: Изучить генетические полиморфизмы вазоактивных гормонов и оценить их патогенетическую значимость при преэклампсии.

Задачи:

1. Исследовать роль полиморфных вариантов генов вазоактивных гормонов (+1837G/A *ANP*, S311C *PON2*, -344C/T *CYP11B2*, G460W *ADD1*, +46G/A *ADRB2*, G/A *GNB3* (*rs2301339*), VNTR *4a/4b eNOS*, -1903G/A *CMA*, K198N *ET-1*, +6986G/A *CYP3A5*) в формировании преэклампсии.

2. Выявить ассоциации генетических вариантов со степенью тяжести преэклампсии.

3. Рассмотреть вклад сочетаний генов - кандидатов в генетическую предрасположенность к преэклампсии.

4. Изучить связи полиморфизмов генов вазоактивных гормонов с количественными патогенетически значимыми признаками ПЭ.

5. Провести математическое моделирование предикторов формирования ПЭ и разработать способ прогнозирования риска её развития.

Научная новизна.

Впервые установлены ассоциации генетических полиморфизмов вазоактивных гормонов с предрасположенностью к развитию преэклампсии у женщин русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья РФ. Определены молекулярно-генетические факторы риска развития преэклампсии различных степеней тяжести. Показаны связи полиморфных маркеров K198N *ET-1* и 4a/4b *eNOS* с уровнем артериального давления у беременных и определены межгенные сочетания, ассоциированные с формированием преэклампсии.

Установлены прогностически значимые предикторы развития преэклампсии: генетические варианты -344C/T *CYP11B2* и S311C *PON2*, наличие преэклампсии у родственников, наличие у индивидуумов

патологии сердечно-сосудистой системы, систолическое артериальное давление до беременности, курение.

Научно-практическое значение. Результаты проведенного исследования расширяют представления о молекулярно-генетических детерминантах развития преэклампсии. Разработанные модели индивидуального прогнозирования риска развития ПЭ могут быть использованы в работе женских консультаций и акушерско-гинекологических стационаров для выявления среди женщин при прегравидарной подготовке и на ранних сроках беременности групп с повышенным риском развития ПЭ. Результаты работы используются в учебном процессе в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» и в практической деятельности врачей женской консультации МБУЗ «Городская поликлиника №2» г. Белгорода и перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: V Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009), III Международной конференции молодых ученых «Современные вопросы акушерства и гинекологии» (Москва, 2009), Всероссийской конференции с международным участием «Охрана репродуктивного здоровья – будущее России» (Белгород, 2010), Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Репродуктология: новые технологии, проблемы перспективы» (Белгород, 2010), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы полиморбидной патологии в клинике внутренних болезней» (Белгород, 2010), VI Съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (Курск, 2011), Итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвященной 76-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2011), 76-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: Молодежная наука и современность (Курск, 2011), XIV Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием): Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье (Санкт-Петербург, 2011), V Международной конференции молодых ученых «Современные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии» (Москва, 2011), 77-й Российской научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 80-летию БГМУ (Уфа, 2012), VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2012), Всероссийском

междисциплинарном образовательном конгрессе «Осложненная беременность и преждевременные роды; от вершин к практике (Москва, 2012), VI Региональном научном форуме "МАТЬ И ДИТЯ" (Ростов-на-Дону, 2012), X научно-практической конференции студентов, интернов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых, посвященной 10-летию института последипломного медицинского образования «Актуальные вопросы современной клинической и экспериментальной медицины» (Белгород, 2012), VII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2013), VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2013), VI Международной конференции молодых ученых «Современные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии» (Москва, 2013).

Личный вклад автора. Автор лично определил цель и задачи исследования, разработал методические подходы для их решения. Автором лично выполнено молекулярно-генетическое исследование, проведена обработка, анализ и обобщение полученных результатов, подготовлены основные публикации по выполненной работе, проведена апробация результатов исследования, написана и оформлена рукопись.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, в том числе 7 в журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Генетические полиморфизмы *4a/4b eNOS*, *+46G/A ADRB2*, *G460W ADD,1 K198N ET-1* ассоциированы с развитием преэклампсии.

2. Полиморфные варианты генов вазоактивных гормонов определяют степень тяжести преэклампсии.

3. Генотипы *4a4a eNOS* и *198KK ET-1* связаны с повышенным уровнем артериального давления у женщин в конце беременности.

4. Генетические варианты по локусам *-344C/T CYP11B2* и *S311C PON2*, наличие преэклампсии у родственников, наличие у индивидуумов патологии сердечно-сосудистой системы, систолическое артериальное давление до беременности, курение являются прогностически значимыми предикторами развития преэклампсии.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы, список литературы и приложения.

Материалы диссертации изложены на 147 страницах машинописного текста и содержат 15 таблиц и 30 рисунков. Библиографический указатель содержит 240 наименования, из которых 143 иностранных.

Материалы и методы исследования

Характеристика исследованных групп

В соответствии с поставленными целями и задачами исследования проведен анализ результатов обследования 459 женщин: 250 беременных с преэклампсией и 209 женщин с физиологическим течением беременности (контрольная группа). Среди 250 беременных у 95 женщин была преэклампсия легкой степени тяжести, у 100 - с преэклампсией средней степени тяжести и у 55 – тяжелое течение преэклампсии. В исследуемые выборки включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженками Центрально-Черноземного региона России и не имеющие родства между собой. Средний возраст беременных с преэклампсией составил $27,11 \pm 6,42$ лет (варьировал от 18 до 44 лет), контрольной группы – $26,50 \pm 6,36$ года (варьировал от 18 до 42 лет) ($p > 0,05$). Клиническое и клинико-лабораторное обследование беременных проводилось на сроке родоразрешения (37-40 недель) на базе Перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Всем женщинам проведено типирование десяти молекулярно-генетических маркеров вазоактивных гормонов: диаллельные локусы генов цитохрома 3A5 (+6986G/A *CYP3A5*), эндотелина 1 (*K198N ET-1*), параоксоназы 2 (*S311C PON2*), β_3 -субъединицы гуанин связывающего белка (*G/A GNB3* (rs2301339)), эндотелиальной NO-синтазы (*4a/4b eNOS*), альдостеронсинтазы (*-344C/T CYP11B2*), химазы (*-1903G/A CMA*), предсердного натрийуретического пептида (*+1837G/A ANP*), β_2 -адренорецептора (*+46G/A ADRB2*), α -аддуцина (*G460W ADD1*). Выбор данных систем для исследования обусловлен их возможной ассоциацией с развитием преэклампсии за счет способности изучаемых полиморфизмов изменять экспрессию соответствующих генов или приводить к изменению структуры кодируемых продуктов [Lovati E., 2001; Givens R.C. et al., 2003; Bianchi G. et al., 2005; Dosenko V.E. et al., 2006; Brodde O.E., 2008; Qu Y. et al., 2008].

Молекулярно-генетические методы

Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew, 1984].

Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась на амплификаторах «Терцик-МС4» (ДНК-технология) и IQ5 (Bio-Rad) с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М», олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Синтол».

Генотипирование ДНК-маркеров производилось следующими методами: 1) анализ полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов (*4a/4b eNOS*); 2) анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (*+1837G/A ANP*, *S311C PON2*, *-344C/T CYP11B2*, *-1903G/A CMA*)

продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома с использованием соответствующих ферментов рестрикции производства ООО «Сибэнзим» (Новосибирск). Визуализация фореграмм осуществлялась в темном боксе с трансиллюминатором фирмы UVP (Швеция). 3) генотипирование локусов *K198N ET-1*, *+6986G/A CYP3A5*, *G/A (rs2301339) GNB3*, *G460W ADD1*, *+46G/A ADRB2* осуществлялось методом детекции TagMan зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе IQ5 с детектирующей системой в режиме реального времени. Для дискриминации аллелей использовалась программа «Bio-Rad IQ5-Standard Edition».

Статистические методы

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программы «STATISTICA 6.0». Определение фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [Животовский, 1983]. Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использован критерий χ^2 [Вейр, 1995]. Ассоциации аллелей и генотипов изученных ДНК-маркеров с формированием преэклампсии и ее качественными признаками (степень тяжести ПЭ и др.) оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности 2×2 с расчетом критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом [Schlesselman J., 1982]. Изучение роли комбинаций генетических вариантов вазоактивных гормонов в возникновении ПЭ проведен с помощью программного обеспечения APSampler (<http://sources.redhat.com/cygwin/>), использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [Favorov A. V., et al., 2005]. При проведении множественных сравнений с целью минимизации ошибок первого рода (ложноположительные результаты) использовали поправку Бонферрони [Реброва О.Ю., 2006].

При изучении связей генетических полиморфизмов с патогенетически значимыми количественными признаками ПЭ (показатели артериального давления, уровень фибриногена, ПТИ и др.) вначале оценивали характер распределения этих признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка [Реброва О.Ю., 2006]. Получено, что распределение всех исследуемых количественных признаков не соответствовало закону нормального распределения и поэтому для их описания применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а для сравнительного анализа – критерий Манна-Уитни с использованием поправки Бонферрони [Реброва О.Ю., 2006]. С целью прогнозирования риска развития преэклампсии и уровня артериального давления у женщин в конце беременности в работе использованы методы математического моделирования (логистический

регрессионный анализ, дискриминантный анализ и метод множественной регрессии).

Результаты исследования и их обсуждение

1. Исследование роли генетических полиморфизмов в формировании преэклампсии

В результате проведенного исследования определены протективные и рисковые генетические варианты исследуемых генов-кандидатов и их комбинации, отличающие беременных с ПЭ от контрольной группы. Установлено, что среди беременных с ПЭ частота аллеля *198K ET-1* составляет 84,80% и превышает аналогичный показатель индивидуумов без ПЭ (79,67%; $p=0,05$). Таким образом, молекулярно-генетическим фактором риска развития ПЭ является аллель *198K ET-1* ($OR=1,43$). Патогенетическая значимость гена-кандидата эндотелина при формировании ПЭ, выявленная в нашем исследовании, согласуется с литературными данными по медико-биологическим эффектам эндотелина в организме. В соответствии с материалами работ Capragnano G. et al. (2004) и Dupuis J. et al. (2008) ген ET-1 кодирует белок эндотелин, который является главным вазоконстрикторным пептидом и играет ключевую роль в гомеостазе эндотелия сосудов.

С помощью биоинформатических подходов определены четыре из десяти рассмотренных генетических полиморфизмов: *+46G/A ADRB2*, *K198N ET-1*, *4a/4b eNOS*, *G460W ADD1*, комбинации которых ассоциированы с развитием ПЭ (рис. 1). В состав этих комбинаций генетических вариантов вазоактивных гормонов входят аллели *4b eNOS*, *198N ET-1*, *+46A ADRB2*, *460G ADD1* и данные сочетания имеют протективное значение для развития ПЭ ($OR < 1,0$). Установлено, что комбинации из двух генетических вариантов - *4b eNOS* и *198N ET-1* (35,89%), *198N ET-1* и *+46A ADRB2* (23,65%) встречаются среди беременных без преэклампсии в 1,4-1,6 раз чаще, чем среди беременных с преэклампсией (25,60%, $p_{cor}=0,04$ и 14,46%, $p_{cor}=0,032$, соответственно). При наличии этих сочетаний полиморфных маркеров риск развития преэклампсии значительно снижен ($OR=0,60$ и $OR=0,55$, соответственно). Выявлено, что в контрольной группе сочетания молекулярно-генетических факторов *460G ADD1*, *4b eNOS* и *198N ET-1* встречаются в 1,47 раза ($OR=0,57$; $p_{cor}=0,032$), *198N ET-1*, *460G ADD1* и *+46A ADRB2* – в 1,73 раза ($OR=0,51$; $p_{cor}=0,032$), *+46A ADRB2*, *198N ET-1* и *4b eNOS* – в 1,96 раза ($OR=0,44$; $p_{cor}=0,0072$) чаще по сравнению с беременными с преэклампсией. Минимальный риск развития преэклампсии ($OR=0,40$) определяется комбинацией из четырех генетических вариантов - *4b eNOS*, *198N ET-1*, *460G ADD1* и *+46A ADRB2*. Концентрация этого сочетания полиморфных маркеров среди беременных без преэклампсии (26,65%) в

2,1 раза превышает аналогичный показатель беременных с преэклампсией (11,25%, $p_{cor}=0,048$).

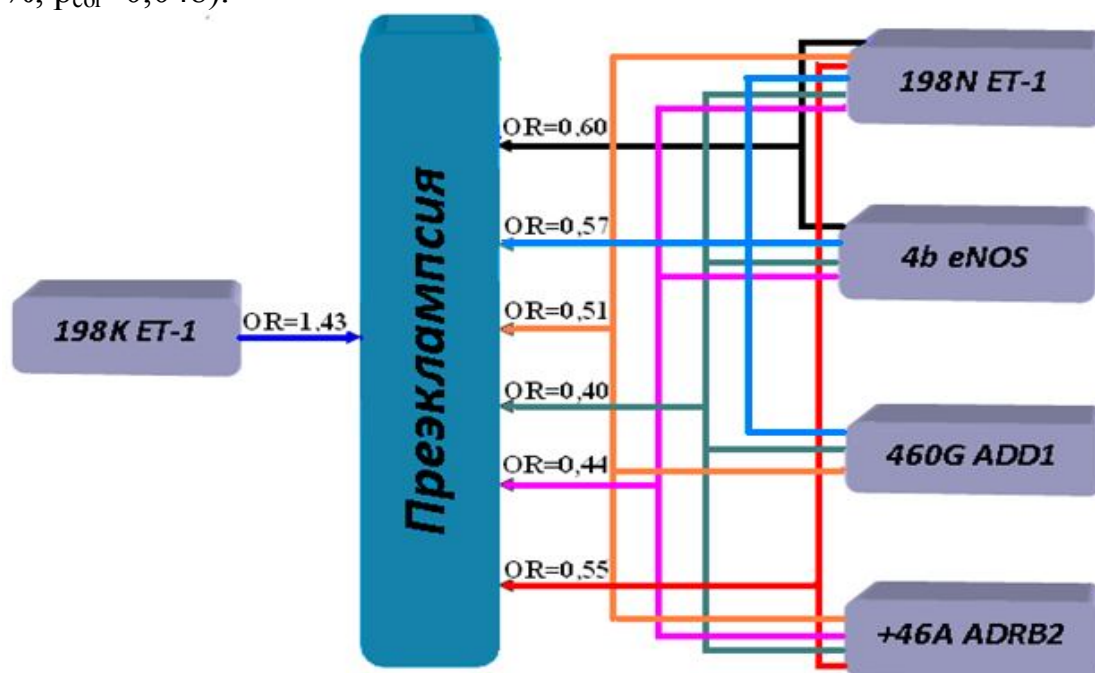


Рис. 1. Вклад генов vasoактивных гормонов в генетическую предрасположенность к преэклампсии

Исследование особенностей генетической "конституции" беременных с преэклампсией различной степени тяжести выявило следующее. Во-первых, при преэклампсии 1-ой степени тяжести, у беременных регистрируются максимальные частоты генотипа *198KK ET-1* (77,89%) и аллеля *198K ET-1* (87,89%), по сравнению с беременными без преэклампсии (64,12%; $\chi^2=5,12$; OR=1,97; 95%CI 1,09-3,60; $p=0,02$ и 79,67%; $\chi^2=5,51$; OR=1,85; 95%CI 1,10-3,14; $p=0,02$, соответственно).

Во-вторых, среди женщин с преэклампсией 3-ей степени тяжести, наблюдается наибольшая частота генотипа *4a4a eNOS* (12,73%), что более чем в 4 раза превышает аналогичный показатель контрольной группы (2,87%; $\chi^2=7,05$; OR=4,94; 95%CI 1,41-17,51; $p=0,009$; $p_{cor}=0,027$) и в 2-4 раза больше концентрации этого генотипа у беременных с ПЭ 1-ой и 2-ой степеней тяжести (3,16-5,00%). Следует отметить, что с увеличением степени тяжести преэклампсии концентрация генетического варианта *4a4a eNOS* возрастает с 2,87% у беременных без преэклампсии до 4,10% с ПЭ 1 и 2-й степеней тяжести и до 12,73% у беременных с ПЭ 3-й степени тяжести (рис. 2). Согласно литературным данным, носители генотипа *4b4b eNOS* имеют уровень нитратов и нитритов в крови на 25 % выше, чем носители генотипа *4a4a eNOS* [Tsukada T., et al, 2003]. В настоящее время известно, что NO является наиболее мощным из известных на

сегодняшний день вазодилататоров, а также способен подавлять пролиферативный ответ гладко-мышечных клеток сосудистой стенки

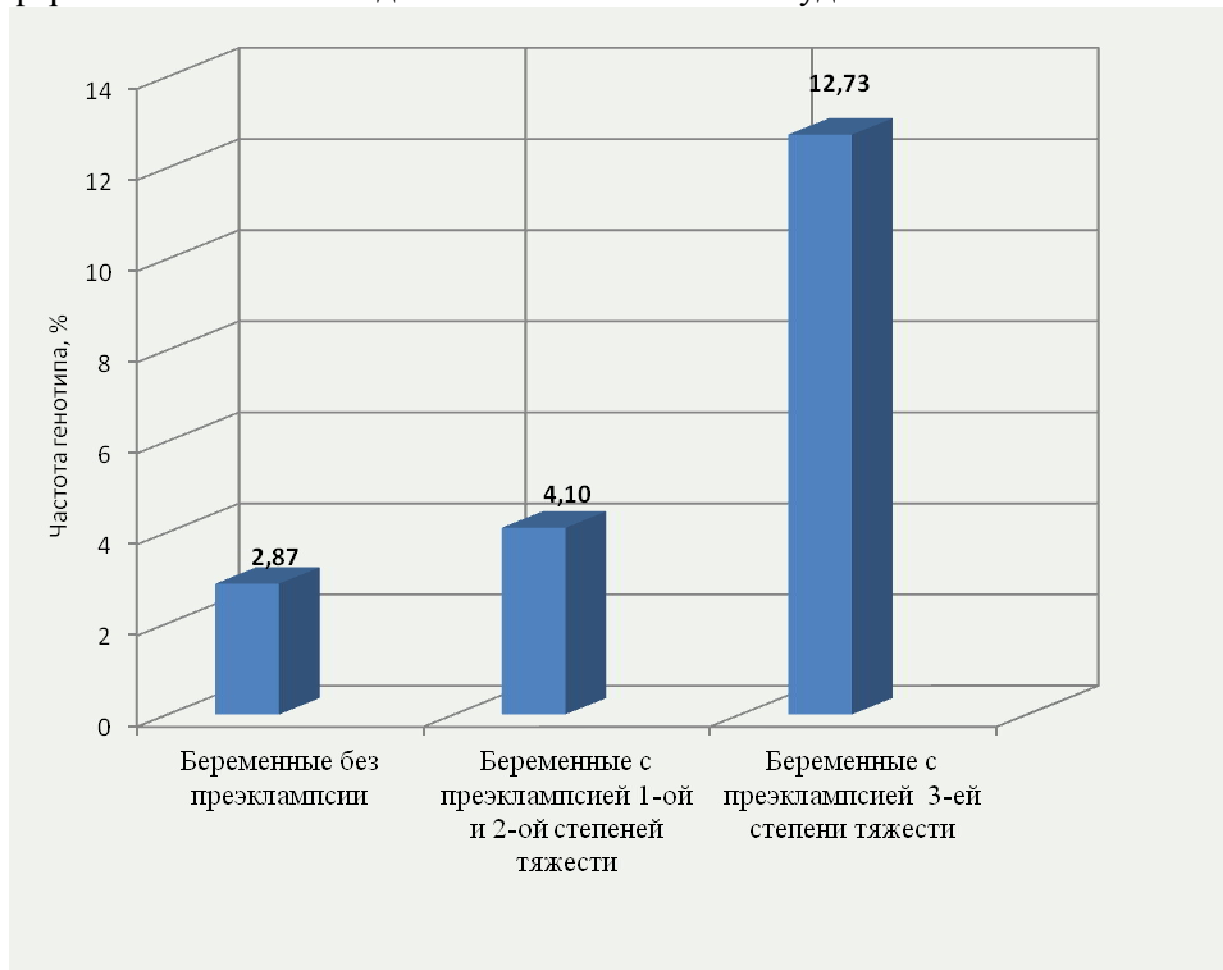


Рис. 2. Распределение генотипа *4a4a eNOS* среди беременных с преэклампсией различной степени тяжести и в группе контроля

и оказывать ряд системных эффектов в просвете сосуда – блокирование агрегации тромбоцитов, окисления липопротеинов низкой плотности, адгезии моноцитов и тромбоцитов к стенке сосуда, продукции эндотелина [Kaszaki J. et al., 2008]. Таким образом, на основании полученных нами данных можно говорить о потенциальной патогенетической роли генотипа *4a4a eNOS*, как фактора риска развития преэклампсии тяжелой степени тяжести.

В-третьих, отличительными особенностями генетических характеристик беременных с преэклампсией 2-ой и 3-ей степенью тяжести, является максимальная концентрация генотипа *460WW ADD1* (6,45%) в сравнении с женщинами контрольной группы (0,96%; $\chi^2=6,79$; OR=7,14; 95%CI 1,44-47,81; $p=0,01$, $p_{\text{cor}}=0,03$) и беременными с ПЭ 1-ой степени тяжести (0,00%; $\chi^2=4,82$; $p=0,03$). О возможной вовлеченности альфа -

аддукция в формирование преэклампсии свидетельствуют и литературные данные [Goddard K. A. et al., 2007].

Биоинформатический анализ показал, что сочетание полиморфных маркеров *4b eNOS* и *460G ADD1* встречается среди беременных без ПЭ (96,17%) и беременных с ПЭ 1-ой степени тяжести (96,84%) чаще, чем среди беременных с ПЭ 2-3-ей степеней тяжести (87,10%; OR=0,27; $p_{\text{cor}}=0,04-0,004$). Наоборот, сочетание генетических вариантов *4a4a eNOS* и *198N ET-1* наблюдается среди беременных с ПЭ 2-3-ей степеней тяжести с наибольшей частотой (4,52%) по сравнению как с беременными без ПЭ (0,00%, $p_{\text{cor}}=0,012$), так и беременными с преэклампсией легкой степени тяжести (1,05%). Это сочетание молекулярно-генетических вариантов является фактором риска развития ПЭ средней и тяжелой степеней тяжести (OR=1,79).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важном патогенетическом значении генетических маркеров *G460W ADD1*, *K198N ET-1*, *4a/4b eNOS*, *+46A ADRB2* в формировании и степени выраженности преэклампсии. Согласно данным литературы эти генетические полиморфизмы [Fava C. 2007; Manunta P. et al., 2008; Castro M.G. et al., 2007] вовлечены в реализацию сосудистых реакций в организме, что может играть значимую роль в развитии ПЭ [Mozgovaia E. V. et al., 2002].

2. Изучение ассоциаций генетических вариантов с патогенетически значимыми признаками преэклампсии

Согласно литературным данным [Шилин Д.Е., 2008; Hartgill T.W. et al., 2013] одним из основных признаков ПЭ является повышенный уровень артериального давления. В нашей работе выявлены ассоциации полиморфных вариантов *K198N ET-1* и *4a/4b eNOS* с показателями артериального давления у беременных.

Установлено, что у женщин с генотипом *4a4a eNOS* отмечаются более высокие значения систолического (медиана - 150,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 130,0 - 160,0 мм.рт.ст.), диастолического (медиана - 100,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 90,0 - 100,0 мм.рт.ст. и среднего артериального давления (медиана - 113,3 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 103,3 - 116,7 мм.рт.ст.) в конце беременности по сравнению с женщинами, имеющими генотипы *4a4b* (САД - 130,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 120,0 - 140,0 мм.рт.ст., $p=0,01$; ДАД - 90,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 75,0 - 90,0 мм.рт.ст., $p=0,006$, $p_{\text{cor}}=0,018$; АД ср. - 103,3 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 91,7 - 108,3 мм.рт.ст., $p=0,006$) и *4b4b* (САД - 130,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 120,0 - 140,0 мм.рт.ст., $p=0,007$; ДАД - 80,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 80,0 - 90,0 мм.рт.ст., $p=0,004$; АД ср. - 100,0 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 91,7 - 106,7 мм.рт.ст., $p=0,004$). Повышенные уровни артериального давления у беременных с

генотипом *4a4a eNOS*, обнаруженные в нашем исследовании, могут быть обусловлены снижением выработки окиси азота NO у индивидуумов с генетическим вариантом *4a4a eNOS* и, соответственно, уменьшением его вазодилатационных эффектов [Böger R.H et al., 2009].

Аналогичной направленности результаты получены и в группе беременных с ПЭ. Женщины имеющие генотип *4a4a eNOS* характеризуются высоким уровнем систолического (медиана – 150,00 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 140,0 - 170,0 мм.рт.ст.) (рис. 3); диастолического (медиана – 100,00 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 90,00 - 100,00 мм.рт.ст.) и пульсового артериального давления (медиана – 50,00 мм.рт.ст., интерквартильный размах - 50,00 - 70,00 мм.рт.ст.), чем женщины с генотипами *4a4b* и *4b4b* (САД: медиана – 140,00 мм.рт.ст., нижний квартиль -130,00 мм.рт.ст., верхний квартиль – 150,00 мм.рт.ст., $p=0,035$); ДАД: медиана – 90,00 мм.рт.ст., нижний квартиль -80,0 мм.рт.ст., верхний квартиль – 95,00 мм.рт.ст, $p=0,005$; ПД: медиана – 50,00 мм.рт.ст., нижний квартиль -45,0 мм.рт.ст., верхний квартиль – 60,00 мм.рт.ст., $p=0,008$.

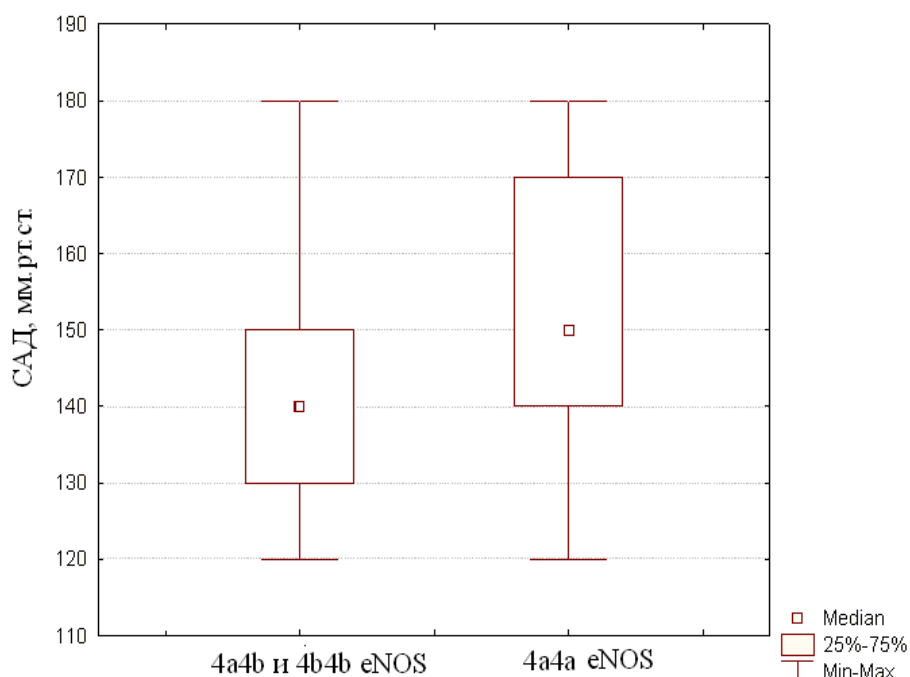


Рис. 3. Ассоциации генетических вариантов локуса *4a/4b eNOS* с уровнем САД в конце беременности у женщин с ПЭ

Выявлено, что у беременных с ПЭ с генотипом *198KK ET-1* уровень диастолического (медиана – 90,00 мм.рт.ст., интерквартильный размах- 90,00-100,00 мм.рт.ст.) и среднего артериального давления в конце беременности (медиана – 106,67 мм.рт.ст., интерквартильный размах -

103,33-116,67 мм.рт.ст.) достоверно выше аналогичных показателей индивидуумов с генотипами *198NN* и *198KN* (медиана – 90,00 мм.рт.ст., интерквартильный размах -80,00-90,00 мм.рт.ст., $p=0,009$ и медиана – 104,17 мм.рт.ст., интерквартильный размах -100,00-110,00 мм.рт.ст., $p=0,02$, соответственно).

3. Прогнозирование риска развития преэклампсии с использованием генетических данных

С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение критериев индивидуального прогнозирования риска развития ПЭ на основании исследованных полиморфных вариантов генов вазоактивных гормонов и других возможных факторов риска с целью выявления беременных, предрасположенных к преэклампсии.

С помощью методов математического моделирования (дискриминантный анализ) [Реброва О. Ю., 2006] нами разработан способ прогнозирования риска развития преэклампсии. Наиболее прогностически ценной в отношении риска развития ПЭ является модель, включающая следующие предикторы: наличие преэклампсии у родственников ($p=0,0000$), уровень систолического артериального давления до беременности ($p=0,0000$), курение ($p=0,0001$), наличие патологии сердечно-сосудистой системы ($0,0001$), генетический вариант по локусу *S311C PON2* ($p=0,008$), генетический вариант по локусу *-344C/T CYP11B2* ($p=0,04$). Для групп беременных с ПЭ и без ПЭ получены два уравнения линейных дискриминантных функции:

- для отнесения в группу беременных без ПЭ

$$y = -103,203 + 2,597x_1 + 6,100x_2 + 1,166x_3 + 13,271x_4 + 11,084x_5 + 11,674x_6$$

- для отнесения в группу беременных с ПЭ

$$y = -116,640 + 1,896x_1 + 8,654x_2 + 1,266x_3 + 12,295x_4 + 10,197x_5 + 12,295x_6,$$

где x_1 – курение (да-0; нет-1), x_2 – наличие ПЭ у родственников (да-0; нет-1), x_3 – САД до беременности (мм.рт. ст.), x_4 – наличие патологии сердечно-сосудистой системы (да-0; нет-1), x_5 – генетический вариант по локусу *-344C/T CYP11B2* ((*CC+TC*) -1; *TT* -0), x_6 – генетический вариант по локусу *S311C PON2* ((*CC+CS*) -1; *SS* -0).

Точность распознавания индивидуумов относящихся к группе беременных с ПЭ составляет 91,39%, а без ПЭ -59,59%. В среднем процент правильных дискриминаций в группы беременных с ПЭ и без ПЭ составляет 80,98%.

В вышеуказанные уравнения ЛДФ подставляются значения соответствующих показателей у конкретного индивидуума и рассчитываются новые признаки – y . Индивидуума следует отнести в ту группу беременных, для которой новый признак y является максимальным [Боровиков, 2001].

Например, у беременной Е. определены следующие показатели: курение – да, наличие патологии сердечно-сосудистой системы – да, наличие ПЭ у родственников – нет, САД до беременности - 120 мм.рт. ст., генетический вариант по локусу *-344C/T CYP11B2 - TT*, генетический вариант по локусу *S311C PON2 - SS*. Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак у.

$$\begin{array}{l} \text{у} \quad \quad \quad (\text{беременные} \quad \quad \quad \text{без} \quad \quad \quad \text{ПЭ}) \quad \quad \quad = \\ -103,203+2,597 \cdot 0+6,100 \cdot 1+1,166 \cdot 120+13,271 \cdot 0+11,084 \cdot 0+11,674 \cdot 0=42,817; \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{у} \quad \quad \quad (\text{беременные} \quad \quad \quad \text{с} \quad \quad \quad \text{ПЭ}) \quad \quad \quad = \\ -116,640+1,896 \cdot 0+8,654 \cdot 1+1,266 \cdot 120+12,295 \cdot 0+10,197 \cdot 0+12,295 \cdot 0=43,934 \end{array}$$

Максимальное значение нового признака у для данной беременной выявлено при расчётах в уравнении ЛДФ для беременных с ПЭ, что позволяет отнести эту женщину в группу беременных с преэклампсией. Дальнейшее детальное клиничко – лабораторное обследование данной беременной подтвердило наш прогноз - у беременной Е. была обнаружена преэклампсия.

Для беременной В. были определены следующие показатели: курение – нет, наличие патологии сердечно-сосудистой системы – нет, наличие ПЭ у родственников – да, САД до беременности - 110 мм.рт. ст., генетический вариант локуса *-344C/T CYP11B2 - CC*, генетический вариант локуса *S311C PON2 - SS*. Подставляя эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ, при расчетах мы выявили максимальное значение у для беременных:

$$\begin{array}{l} \text{у} \quad \quad \quad (\text{беременные} \quad \quad \quad \text{без} \quad \quad \quad \text{ПЭ}) \quad \quad \quad = \\ -103,203+2,597 \cdot 1+6,100 \cdot 0+110 \cdot 1,166+13,271 \cdot 1+11,084 \cdot 1+11,674 \cdot 0=52,009 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{у} \quad \quad \quad (\text{беременные} \quad \quad \quad \text{с} \quad \quad \quad \text{ПЭ}) \quad \quad \quad = \\ -116,640+1,896 \cdot 1+8,654 \cdot 0+1,266 \cdot 110++12,295 \cdot 1+10,197 \cdot 1+12,295 \cdot 0=47,008 \end{array}$$

Это дает нам возможность отнести беременную В. в группу женщин без преэклампсии. При дальнейшем обследовании наш прогноз подтвердился.

Разработанная нами модель прогнозирования развития ПЭ позволит формировать среди женщин при прегравидарной подготовке и на ранних сроках беременности группы риска по развитию данного осложнения беременности, что будет способствовать более эффективной реализации лечебно-профилактических мероприятий по предупреждению преэклампсии.

Выводы

1. Генетические варианты вазоактивных гормонов (*+6986G/A CYP3A5*, *K198N ET-1*, *S311C PON2*, *G/A GNB3 (rs2301339)*, *4a/4b eNOS*, *-344C/T CYP11B2*, *+46G/A ADRB2*, *G460W ADD1*) определяют подверженность к развитию преэклампсии и ее степень тяжести, ассоциированы с уровнем артериального давления у беременных.

2. Генетическим фактором повышенного риска развития преэклампсии является *198K ET-1* (OR=1,43). Протективное значение при формировании преэклампсии имеют комбинации аллелей *198N ET-1*, *+46A ADRB2*, *460G ADD1*, *4b eNOS*, (OR=0,40-0,60).

3. Развитие преэклампсии 1-ой степени тяжести ассоциировано с аллелем *198K ET-1* (OR=1,85). Формирование преэклампсии 2-й и 3-й степеней тяжести связано с генетическим вариантом *460WW ADD1* (OR=7,14), сочетанием *4a4a eNOS* с *198N ET-1* (OR=1,79) и *4b eNOS* с *460G ADD1* (OR=0,27), а преэклампсию 3-ей степени тяжести маркирует генотип *4a4a eNOS* (OR=4,94).

4. Генетический вариант *4a4a eNOS* ассоциирован с высоким уровнем систолического, диастолического и среднего артериального давления у женщин в конце беременности. У беременных с преэклампсией высокий уровень артериального давления маркируют генотипы *4a4a eNOS* и *198KK ET-1*.

5. Прогностически значимыми предикторами при определении вероятности развития преэклампсии являются генетические варианты по локусам *-344C/T CYP11B2* и *S311C PON2*, наличие преэклампсии у родственников, наличие у индивидуумов патологии сердечно-сосудистой системы, систолическое артериальное давление до беременности, курение.

Список сокращений

ПЭ — преэклампсия

АД - артериальное давление

САД – систолическое артериальное давление

ДАД – диастолическое артериальное давление

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Решетников, Е.А. Изучение роли кандидатных генов в формировании осложнений беременности / Е.А. Решетников, **А.В. Елыкова**, И.С. Самойлова (Добродомова), Л.Ю. Акулова, Т.И. Якунченко // Материалы V Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – Москва, 2009. – Часть I. С. 487.

2. Решетников, Е.А. Полиморфизм генов-кандидатов и эхокардиографические показатели у беременных в норме и при гестозе / Е. А Решетников, **А.В. Елыкова**, И.С. Добродомова, Л.Ю. Акулова, Т.И. Якунченко, М.И. Чурносков // Вестник РУДН. Серия " Медицина".- 2009.- №4.- С. 223-224.

3. Самойлова, И.С. Изучение роли генов «сосудистых реакций» в формировании гипертонии при гестозе / И.С. Самойлова, **А.В. Елыкова**, Т.И. Якунченко // Материалы III международной конференции молодых

ученых «Современные вопросы акушерства и гинекологии».— Москва, 2009.— С. 113.

4. **Елыкова, А.В.** Полиморфизм генов сосудистых реакций у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова, М.И. Чурнос** // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Охрана репродуктивного здоровья – будущее России».— Белгород, 2010.— С. 26-28.

5. **Елыкова, А.В.** Молекулярно-генетическое исследование преэклампсии / **А.В. Елыкова** // Материалы всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Репродуктология: новые технологии, проблемы перспективы» – Белгород. – 2010. - С. 135-138.

6. **Елыкова, А.В.** Распределение полиморфизмов гена химазы (-1903G/A CMA) у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова** // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы полиморбидной патологии в клинике внутренних болезней». – Белгород. – 2010. – С. 11-12.

7. **Елыкова, А.В.** Анализ полиморфизма C311S гена параоксоназы 2 у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова, М.И. Чурнос**, С.П. Пахомов // Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков. - Ростов-на Дону, 2010. - С. 59.

8. Чурнос М.И. Полиморфизм генов вазоактивных гормонов и изменения морфофункциональных характеристик сердечно-сосудистой системы у женщин при возникновении беременности / М.И. Чурнос, Л.Ю. Акулова, Е.А. Решетников, И.С. Добродомова, **А.В. Елыкова** // Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков. - Ростов-на Дону, 2010.- С. 193.

9. **Елыкова, А.В.** О распределении генотипов локуса L198A эндотелина-1 у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова** // Медицинский академический журнал –2010. - Т. 10, №5. – С. 120-121.

10. **Елыкова, А.В.** Роль генетического полиморфизма цитохрома 11В2 в формировании преэклампсии / **А.В. Елыкова** // II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием – Курск, 2011. – С. 55-56.

11. **Елыкова, А.В.** Изучение взаимосвязи гена предсердного натрийуретического пептида (+1837G/A ANP) с развитием преэклампсии / **А.В. Елыкова, М.И. Чурнос** // Материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвященной 76-летию Курского государственного медицинского университета – Курск, 2011. – С. 231-234.

12. **Елыкова, А.В.** К вопросу о распределении полиморфного маркера ADRB2 у женщин с преэклампсией / **А.В. Елыкова** // Материалы 76-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с

международным участием: Молодежная наука и современность – Курск, 2011. – С. 63.

13. **Елыкова, А.В.** Генетический полиморфизм цитохрома 3A5 у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова** // XIV Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием) – Санкт-Петербург, 2011. – С. 89-90.

14. **Елыкова, А.В.** О распределении генотипов локуса *K198N ET-1* у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова** // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2011.– Специальный выпуск №2.– С.155-156.

15. **Елыкова, А.В.** Взаимосвязь гена-кандидата параоксоназы 2 (*SC11C PON*) с развитием преэклампсии / **А.В. Елыкова** // Материалы 77-й Российской научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 80-летию БГМУ – Уфа, 2012. – Том 1, С. 220-222.

16. **Елыкова, А.В.** Анализ ассоциаций вариантов гена параоксоназы 2 с морфологическими характеристиками плаценты у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова**, И.С. Добродомова // Материалы всероссийского междисциплинарного образовательного конгресса «Осложненная беременность и преждевременные роды; от вершин к практике – Москва, 2012. – С.57-58.

17. **Елыкова, А.В.** Некоторые результаты молекулярно-генетического исследования ассоциаций аллельных вариантов гена цитохрома 3A5 с морфологическими характеристиками плаценты у беременных с преэклампсией / **А.В. Елыкова**, М.И. Чурносов // VI Региональный научный форум "МАТЬ И ДИТЯ" – Ростов-на-Дону, 2012. - С. 41-43.

18. **Елыкова, А.В.** К вопросу о роли полиморфизма бета 3-субъединицы гуанин связывающего белка в развитии внутриутробной гипоксии плода у женщин с преэклампсией / **А.В. Елыкова** // Сборник трудов X научно-практической конференции студентов, интернов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых, посвященной 10-летию института последипломного медицинского образования «Актуальные вопросы современной клинической и экспериментальной медицины» - Белгород. - 2012. - С. 59-60.

19. **Елыкова, А.В.** Оценка роли генетического полиморфизма 3-субъединицы гуанин связывающего белка в формировании преэклампсии / **А.В. Елыкова** // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2012.– Специальный выпуск - №1.– С.48-49.

20. **Елыкова, А.В.** Ассоциации молекулярно-генетических маркеров с морфологическими характеристиками плаценты у беременных с преэклампсией / Журнал «Медицина и образование в Сибири» (Электронное издание). № 5 - 2012 г. 14.00.00 медицинские и

фармацевтические науки. УДК 611.013.85:618.3-008.6.
[Http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=802.](http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=802)

21. **Елыкова, А.В.** Взаимосвязь гена цитохрома 3A5 с развитием преэклампсии и состоянием реактивности сердечно-сосудистой системы плода / **А.В. Елыкова**, И.И. Добродомова, В.С. Орлова // Материалы VII Международного конгресса по репродуктивной медицине - Москва, 2013. – С.132-133.

22. **Елыкова, А.В.** Анализ ассоциаций аллельных вариантов гена предсердного натрийуретического пептида (+1837 G/A ANP) с формированием преэклампсии / **А.В. Елыкова**, С.П. Пахомов // Вестник Российского государственного медицинского университета.– 2013. – Специальный выпуск №1. – С.18.

23. **Елыкова, А.В.** Изучение ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с морфологическими характеристиками плаценты у беременных / **А.В. Елыкова**, В.С. Орлова // Вестник Российского государственного медицинского университета.– 2013. – Специальный выпуск №2. – С.127-128.