

# Полиморфизм модулирующих эндотелий-зависимую вазодилатацию генов при гестозе

Категория: **Акушерство и гинекология**

В.В. Заварин, О.В. Радьков, М.Н. Калинин

ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздравсоцразвития РФ», кафедра акушерства и гинекологии, кафедра патологической физиологии

## Библиографическая ссылка на статью:

Заварин В.В., Радьков О.В., Калинин М.Н. Полиморфизм модулирующих эндотелий-зависимую вазодилатацию генов при гестозе//Верхневолжский медицинский журнал.-2011.-Т.9. Вып.3 №11 – С.20-22.

Преэклампсия является осложнением беременности с высокой материнской и перинатальной смертностью. В реализации ее участвует множество генетических и средовых факторов [6, 10]. Эндоте-лиальная дисфункция является ведущим фактором патогенеза преэклампсии [2], однако роль оксида азота (NO) в ее реализации при гестационном повышении артериального давления (АД) дискуссионна. Вместе с тем известно, что при преэклампсии уровень этого вазодилатора снижается, что может быть ассоциировано с генетическим полиморфизмом эндотелиальной синтазы NO, кодируемой геном NOS3 [7, 9]. Гуанин-связывающие белки (G-белки) экспрессируются во всех клетках организма и играют главную роль в передаче сигналов от множества рецепторов с поверхности клетки. Минорный аллель 825T гена субъединицы бета-3 G-белка (GNB3) связан с образованием варианта протеина, обладающего повышенной биологической активностью, приводящей к усиленной сигнальной трансдукции [3, 11]. Полиморфизм C825T гена GNB3 ассоциируется с эндотелиальной дисфункцией [3], однако его связь с преэклампсией остается предметом дискуссий. Необходимо отметить, что преэклампсия является мультифакториальным заболеванием с высоким коэффициентом наследуемости, для которого характерно отсутствие воспроизводимости результатов исследования монолокусных ассоциаций в различных популяциях. Объяснение данного феномена находят в явлении межгенных взаимодействий [4]. Мультилокусный анализ полиморфизма генов, влияющих на функцию эндотелия, может выделить патогенетически значимые комбинации локусов, ассоциированных с преэклампсией, для прогнозирования этого осложнения беременности.

**Цель исследования** Провести анализ ассоциации полиморфизма C825T гена GNB3, а также полиморфизма –786T/C и Glu298Asp гена NOS3 у беременных с преэклампсией.

**Материал и методы исследования** Обследовано в III триместре 124 беременные с преэклампсией (основная группа) и 112 беременных с нормальным течением гестации (контрольная группа) из популяции русских, проживающих на территории Тверской области. Средний возраст в группах  $27,6 \pm 4,3$  и  $25,7 \pm 3,5$  года. Среднесуточное систолическое артериальное давление (АД) при преэклампсии в контрольной группе составило соответственно  $132,57 \pm 2,78$  и  $109,89 \pm 1,53$  мм рт. ст. ( $p = 0,046$ ), а среднесуточное диастолическое АД  $81,05 \pm 1,99$  и  $65,45 \pm 0,90$  мм рт. ст. ( $p = 0,032$ ). Для проведения генотипирования использовали препараты тотальной геномной ДНК, полученные сорбентным методом – набор «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лаборатория «Изоген», Москва). Однонуклеотидные полиморфизмы –786T/C (rs2070744) и Glu298Asp (rs1799983) гена NOS3, а также C825T гена GNB3 (rs5443) типировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием наборов праймеров и аллель-специфических разрушаемых гибридизационных зондов («Applied Biosystems», США). В качестве детектирующего амплификатора применяли систему регистрации ПЦР в реальном времени «ABI Prism 7500» («Applied Biosystems», США). Проверка выборки на нормальность распределения выполнена критерием Шапиро–Вилка. Сравнение количественных величин фенотипов выполнено U-тестом Манна–Уитни. Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга критерием  $\chi^2$ . Различия по частоте аллелей и генотипов между группами оценены тестом  $\chi^2$ . Для оценки ассоциации генотипов и аллелей с преэклампсией рассчитаны соотношения шансов (odds ratio, OR) с 95% доверительным интервалом (confidence interval, CI). Тесты на соблюдение равновесия Харди–Вайнберга и выявление ассоциаций методом Пирсона  $\chi^2$  проводили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека Мюнхенского Центра Гельмгольца (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Анализ межгенных взаимодействий проведен с помощью метода сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) в среде открытой программы MDR v. 2.0 beta 8 (<http://www.epistasis.org>). Данный метод позволяет уменьшить размерность числа рассчитываемых параметров при одновременной оценке взаимодействий большого количества полиморфных маркеров путем конструирования новых переменных на основе суммирования сочетаний генотипов как повышенного, так и пониженного риска развития болезни. Метод MDR был разработан для моделирования межгенных взаимодействий высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых в генетической эпидемиологии параметрических методов [5]. **Результаты исследования и их обсуждение** Распределение частот генотипов C825T гена GNB3 соответствовало закону Харди–Вайнберга (в группе контроля  $\chi^2 = 0,21$ ,  $p = 0,65$ , среди беременных с преэклампсией  $\chi^2 = 0,40$ ,  $p = 0,53$ ). Отмечена ассоциация полиморфизма C825T гена GNB3 у беременных с преэклампсией (табл. 1).

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей полиморфизма C825T гена GNB3 в контрольной группе беременных и группе пациенток с преэклампсией

Генотип и аллель	Контроль (n = 112)	Преэклампсия (n = 124)	Критерий $\chi^2$ (p)	OR (95% CI)
Генотип CC	73 (65,2%)	68 (54,8%)	5,15 (0,08)	0,65 (0,38–1,10)
Генотип CT	36 (32,1%)	45 (36,3%)		1,20 (0,70–2,06)
Генотип TT	3 (2,7%)	11 (8,9%)		3,54 (0,96–13,02)
Аллель C	181 (73,0%)	181 (81,3%)	4,53 (0,03)	0,62 (0,40–0,97)
Аллель T	67 (27,0%)	42 (18,8%)		1,60 (1,04–2,48)

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей полиморфизмов –786T/C и Glu298Asp гена NOS3 в контрольной группе беременных и группе пациенток с преэклампсией

Генотип и аллель	Контроль (n = 112)	Преэклампсия (n = 124)	Критерий $\chi^2$ (p)	OR (95% CI)
<b>Полиморфизм -786T/C</b>				
Генотип TT	37 (33,0%)	32 (25,8%)	3,75 (0,15)	0,71 (0,40–1,24)
Генотип TC	62 (55,4%)	67 (54,0%)		0,95 (0,57–1,58)
Генотип CC	13 (11,6%)	25 (20,2%)		1,92 (0,93–3,97)
Аллель T	136 (60,7%)	131 (52,8%)	2,98 (0,08)	0,72 (0,50–1,04)
Аллель C	88 (39,3%)	117 (47,2%)		1,38 (0,96–1,99)
<b>Полиморфизм Glu298Asp</b>				
Генотип Glu/Glu	91 (81,3%)	81 (65,3%)	8,02 (0,02)	0,43 (0,24–0,79)
Генотип Glu/Asp	16 (14,3%)	36 (29,0%)		2,45 (1,27–4,73)
Генотип Asp/Asp	5 (4,5%)	7 (5,6%)		1,28 (0,39–4,16)
Аллель Glu	198 (88,4%)	198 (79,8%)	6,38 (0,01)	0,52 (0,31–0,87)
Аллель Asp	26 (11,6%)	50 (20,2%)		1,92 (1,15–3,21)

Так, вариантный аллель 825T гена GNB3 ассоциирован с преэклампсией, так как его носительство увеличивает в 1,6 раза риск этого осложнения беременности. Напротив, аллель C изучаемого полиморфного маркера является «протективным» в отношении преэклампсии. Было показано, что вариант 825T является аллелем риска преэклампсии независимо от состава исследуемой популяции [11]. Вместе с тем связь этого генетического маркера с эндотелиальной дисфункцией при чистом варианте преэклампсии не подтверждена, однако присутствует в случае присоединения HELLP синдрома [3]. Фенотипическими особенностями носителей аллеля 825T гена GNB3 в отличие от гомозигот CC могут быть более высокие показатели АД, избыточная масса тела, эндотелиальная дисфункция [3, 6]. Несмотря на это, в российской популяции именно с аллелем дикого типа 825C и генотипом CC установлена ассоциация с ишемической болезнью сердца [1]. Распределение частот генотипов полиморфизмов гена NOS3 также соответствовало закону Харди–Вайнберга. Для полиморфизма Glu298Asp в группе контроля  $\chi^2 = 2,59$  ( $p = 0,11$ ), среди пациенток с пре-эклампсией  $\chi^2 = 0,57$  ( $p = 0,45$ ), для полиморфизма -786T/C в аналогичных группах:  $\chi^2 = 1,44$  ( $p = 0,23$ ) и  $\chi^2 = 0,49$  ( $p = 0,48$ ) соответственно. Статистически значимых различий по частоте генотипов и аллелей полиморфизма -786T/C гена NOS3 между группами беременных в нашем исследовании не установлено (табл. 2). Однако мутантный аллель -786C гена NOS3 связан с проявлениями дисфункции эндотелия и преэклампсией в близкой к нашей восточноевропейской популяции, несмотря на то что у носителей этого аллеля концентрация NO в плазме крови выше [7, 8]. Оказалось, что полиморфизм Glu298Asp гена NOS3 ассоциирован с преэклампсией. Так, гетерозиготный генотип увеличивает риск развития преэклампсии в 2,45 раза, а носительство аллеля 298Asp – в 1,92 раза. Напротив, присутствие аллеля 298Glu или генотипа Glu/Glu ассоциируется с уменьшением вероятности гестационного повышения АД. Кроме того, носительство гаплотипа «Asp298–786C–4b» гена NOS3 связано с двукратным увеличением риска преэклампсии при сравнении с гаплотипом «Glu298–786T–4b» [9]. Однако, с одной стороны, утверждению о связи полиморфизма Glu298Asp гена NOS3 с преэклампсией противоречат весьма обширные мультипопуляционные исследования типа случай–контроль [10, 14]. С другой стороны, носительство «протективного» аллеля 298Glu ассоциировано с увеличением уровня NO в плазме, что, вероятно, может защищать от развития преэклампсии [7]. Проведено моделирование межгенных взаимодействий исследованных полиморфизмов при преэклампсии методом MDR, позволившее выбрать комбинации полиморфных локусов, которые имеют наибольшую патогенетическую значимость для развития этого осложнения беременности. Статистически значимой оказалась трехлокусная модель GNB3/C825T x NOS3/Glu298Asp x NOS3/(-786T/C), которая обладает 100% воспроизводимостью (Cross-validation Consistency) и 84,6% точностью предсказания (Testing Balanced Accuracy) ( $p = 0,025$ ).

Методом MDR установлено, что наибольшая доля энтропии в отношении статуса «случай–контроль» связана с локусом NOS3/Glu298Asp и равна 14,12%. Локусы GNB3/C825T и NOS3/(-786T/C) объясняют только 1,31 и 0,79% энтропии соответственно. Данные результаты согласуются с результатами моно-локусного анализа ассоциаций для локуса NOS3/ Glu298Asp. В то же время межгенные взаимодействия пар локусов GNB3/C825T x NOS3/Glu298Asp и NOS3/ (-786T/C) x NOS3/Glu298Asp являются довольно слабыми (0,05 и 0,56% энтропии соответственно). Напротив, на долю комбинации локусов GNB3/C825T x NOS3/(-786T/C) приходится 9,15% фенотипической энтропии, что демонстрирует выраженный синергический эффект обоих полиморфизмов. На рис. представлена дендрограмма кластерного анализа результатов моделирования межгенных взаимодействий методом MDR при гестозе. Результаты нашего исследования согласуются с данными о нелинейных эпистатических взаимодействиях полиморфных генов, участвующих в регуляции артериального давления [12, 13].



Рис. Дендрограмма межгенных взаимодействий при гестозе для локусов GNB3/C825T, NOS3/(-786T/C) и NOS3/Glu298Asp

**Заключение** Таким образом, аллель 298Asp гена NOS3 и 825T гена GNB3 ассоциированы с развитием гестоза. Напротив, аллель 298Glu и генотип Glu/Glu гена NOS3, а также аллель 825C гена GNB3 связаны со снижением риска заболевания. В то время как полиморфный локус NOS3/Glu298Asp оказывает выраженный независимый эффект в формировании преэклампсии, локус NOS3/–786T/C вносит вклад в фенотипическую реализацию этого осложнения беременности преимущественно за счет синергического взаимодействия с полиморфным локусом GNB3/C825T.

## Литература

1. Никитин А.Г. Ассоциация полиморфного маркера C825T гена GNB3 с ишемической болезнью сердца / А.Г. Никитин [и др.] // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 8. – С. 1129–1133.
2. Blaauw J. Abnormal endothelium-dependent microvascular reactivity in recently preeclamptic women / J. Blaauw [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 105 (3). – P. 626–632.
3. Jansen M.W. C825T polymorphism in the human G protein beta 3 subunit gene and preeclampsia; a case control study / M.W. Jansen [et al.] // *Hypertens. Pregnancy.* – 2004. – Vol. 23 (2). – P. 211–218.
4. Moore J.H. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility / J.H. Moore [et al.] // *Journal of Theoretical Biology.* – 2006. – Vol. 241. – P. 252–261.
5. Moore J.H. New strategies for identifying gene–gene interactions in hypertension / J.H. Moore, S.W. Williams // *Ann. Med.* – 2002. – Vol. 34. – P. 88–95.
6. Nakayama T. Comparison between essential hypertension and pregnancy-induced hypertension: a genetic perspective / T. Nakayama, T. Yamamoto // *Endocrine Journal.* – 2009. – Vol. 56 (8). – P. 921–934.
7. Sandrim V.C. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia / V.C. Sandrim [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 16 (7). – P. 506–510.
8. Seremak-Mrozikiewicz A. The significance of –786T>C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia / A. Seremak-Mrozikiewicz [et al.] // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2011. – Vol. 24 (3). – P. 432–436.
9. Serrano N.C. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia A multicenter case-control study / N.C. Serrano [et al.] // *Hypertension.* – 2004. – Vol. 44. – P. 702–707.
10. Singh A. Role of inflammatory cytokines and eNOS gene polymorphism in pathophysiology of preeclampsia / A. Singh [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 63 (3). – P. 244–251.
11. Tang X. Role of C825T polymorphism of GNbeta3 gene in preeclampsia / X. Tang [et al.] // *Hypertens. Pregnancy.* – 2006. – Vol. 25 (2). – P. 93–101.
12. Tsai C.T. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension: interaction with ACE gene I allele / C.T. Tsai [et al.] // *Hypertension.* – 2003. – Vol. 41 (1). – P. 9–15.
13. Williams S.M. Multilocus analysis of hypertension: a hierarchical approach / S.M. Williams [et al.] // *Hum. Hered.* – 2004. – Vol. 57 (1). – P. 28–38.
14. Yu C.K. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis / C.K. Yu [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2006. – Vol. 16. – P. 6–7