
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ АКУШЕРСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ: МЕЖГЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ

Т.Б. Третьякова, Н.В. Башмакова,
Н.С. Демченко

ФГБУ «Научно-исследовательский институт
охраны материнства и младенчества» Минздравсоцразвития России
ул. Репина, 1, Екатеринбург, Россия, 620028

Целью исследования явилось изучение межгенных взаимодействий генов-маркеров тромбофилии, нарушений обмена гомоцистеина и регуляторов артериального давления у женщин с отягощенным акушерским анамнезом. В исследование было включено две группы женщин. Опытную группу составили 197 женщин с эклампсией и невынашиванием беременности в анамнезе. Контрольная группа представлена 228 женщинами с нормальным акушерским анамнезом. Было проведено молекулярно-генетическое тестирование 21 аллельного полиморфизма генов (MTHFR, MTR, MTRR, FGB, F2, F5, F7, F13, ITGA2, ITGB3, PAI-1, ADD1, AGT, AGTR1, AGTR2, CYP, GNB, NOS3). Не было обнаружено статистически значимых отличий частоты встречаемости альтернативных генотипов изучаемых генов при однофакторном анализе. Однако обнаружена статистически более высокая частота определенной комбинации генотипов (AGT 704CC, GNB 825CT, NOS3 894GT, MTR 2756AG) в группе с эклампсией и невынашиванием беременности в анамнезе.

Ключевые слова: полиморфизм генов, комбинированный генотип.

Женщины с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАА) составляют группу риска по развитию гестационных осложнений, таких как угроза прерывания беременности, хроническая плацентарная недостаточность, эклампсия и т.д. В основе патогенеза невынашивания беременности и патологических состояний, связанных с пролонгированием беременности, некоторые авторы выделяют эмбриоплацентарную дисфункцию, клинические проявления которой определяются генетическим кодом и характером экзогенных и эндогенных влияний.

Факторы риска развития невынашивания беременности, хронической плацентарной недостаточности, преэклампсии достаточно схожи, поэтому отсутствует возможность достоверного прогнозирования развития данных состояний [1, 3, 6, 8, 9]. Исследование генетических причин ОАА было выполнено на генах-кандидатах, имеющих отношение к тромбофилии, метаболизму фолиевой кислоты, липидному обмену, окислительному стрессу, функционированию ренин-ангиотензиновой системы и т.д. Однако предложенные на сегодняшний день диагностические системы наследственной предрасположенности к ОАА не имеют достаточной прогностической значимости. Это объясняется нелинейностью и сложностью взаимоотношений генотип-фенотип. Большинство ассоциативных генетических исследований не учитывает таких феноменов генетической архитектуры, как локусная гетерогенность, фенокопии, ген-средовые и межгенные взаимодействия [2, 5—7, 13, 14].

Эпистатические (ген-генные) взаимодействия — распространенное явление в патологических состояниях (болезнях) человека. С точки зрения эволюционной биологии, болезнь — есть результат накопления множества мутаций в различных

частях генной сети, которые необходимы для возмущения надежной системы для ее эволюции. Поэтому отдельные генетические варианты имеют достаточно низкий вклад в формирование патологического фенотипа и, соответственно, положительные результаты ассоциации отдельных полиморфизмов с заболеваниями, как правило, не реплицируются через независимые выборки. Принимая эту гипотезу, следует искать сочетания генетических вариантов и анализировать межгенные и ген-средовые взаимодействия, играющие роль в формировании патологического фенотипа.

В настоящее время разработаны различные статистические методы анализа межгенных и ген-средовых взаимодействий: логистическая регрессия, нейронные сети, метод снижения многомерной размерности, метод комбинаторного разбиения, метод рестрикционного разбиения и другие [4, 5].

Цель исследования. Анализ межгенных взаимодействий генов-кандидатов тромбофилии, нарушений обмена гомоцистеина и регуляторов артериального давления у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом.

Материалы и методы. В исследовании проанализированы данные обследования у 325 женщин полиморфных вариантов кандидатных генов предрасположенности к различным видам акушерской патологии, обратившихся за медицинской помощью в НИИ «Охраны материнства и младенчества» Минздравсоцразвития РФ, г. Екатеринбурга за период с 2009 по 2011 год.

В исследование были включены беременные и женщины на прегравидарной подготовке. Пациентки были разделены на две группы в зависимости от характера акушерского анамнеза. Опытную группу составили 197 женщин с отягощенным акушерским анамнезом, а именно с эклампсией и невынашиванием беременности (самопроизвольные выкидыши, преждевременные роды, регрессирующие беременности). Контрольная группа была представлена 128 женщинами с физиологическим течением беременностей и родов в анамнезе. Возраст беременных в обеих группах варьировал от 21 до 43 лет, средний возраст пациенток с ОАА составил 25—43 ($32,2 \pm 0,4$) года, в контрольной группе — 21—36 ($39,4 \pm 0,9$) года. По показателю среднего возраста группы были сопоставимы.

Пациенткам основной и контрольной групп проводилось молекулярно-генетическое типирование полиморфных вариантов генов предрасположенности к невынашиванию беременности и эклампсии:

1. Гены ключевых ферментов обмена гомоцистеина: MTHFR 677 C>T, MTHFR 1298 A>C, MTR 1256 A>G и MTRR 66 A>G.

2. Гены компонентов системы гемостаза: FGB -455 G>A, F2 20210 G>A, F5 1691 G>A, F7 10976 G>A, F13 163 (100) G>T (Val34Leu), ITGA2 807 C>T, ITGB3 1565T>C, PAI-1 -675 5G>4G.

3. Гены регуляции артериального давления (АД) крови: ADD1 1378G > T, AGT 704 T>C, AGT 521C>T, AGTR1 1166 A>C, AGTR2 1675G>A, CYP11B2 -344C>T, GNB3 825C>T, NOS3-786T>C, NOS3 894 G>T.

Из совокупности обследованных 325 пациенток 114 женщин были комплексно обследованы на все три группы изучаемых генов; 77 женщин были типированы по двум группам генов (компонентов гемостаза, регуляции обмена гомоцистеина).

Образцы ДНК пациенток получали из буккального эпителия, используя коммерческие наборы реагентов и протоколы для выделения ДНК (НПО «ДНК-Технология», Россия). Для оценки количества выделенной геномной ДНК использовали набор реагентов «КВМ» контроля взятия материала для метода ПЦР (НПО «ДНК-Технология», Россия). В исследование брали не менее 1,0 нг геномной ДНК на реакцию. Генотипирование образцов по аллельным вариантам исследуемых генов проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «режиме реального времени» со снятием кривых плавления продуктов амплификации. Анализ результатов ПЦР проводили в автоматическом режиме программного обеспечения детектирующего амплификатора ДТ-96 (НПО «ДНК-Технология», Россия).

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 7.0 и SPSS 13.0. Различия между параметрическими переменными с нормальным распределением устанавливались при помощи *t*-критерия Стьюдента. Сравнение частот генотипов полиморфных вариантов отдельных генов между анализируемыми группами проводилось при помощи χ^2 Пирсона (Person) и χ^2 Йетса (Yates) для числа наблюдений менее 10. Для оценки сочетаний генотипов различных генов использовали регрессионную модель пропорционального риска (Кокса) с оценкой значимости тестируемых переменных с помощью асимптотического критерия χ^2 Вальда. Нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$. Тест на соответствие распределения генотипов закону Харди—Вайнберга в обеих выборках проводили с помощью критерия χ^2 с использованием программы Hardy—Weinberg equilibrium.

Обсуждение результатов. По результатам однофакторного анализа, включавшего 21 вариант однонуклеотидных замен в генах компонентов системы гемостаза, обмена гомоцистеина и регуляции АД, сравниваемые группы женщин с ОАА и с нормальным акушерско-гинекологическим анамнезом достоверно не отличались по частоте встречаемости альтернативных аллелей и генотипов. Наблюдалась тенденция более высокой частоты встречаемости среди женщин с ОАА генотипа GG полиморфизма F13 Val34Leu G>T ($\chi^2 = 10,78, p = 0,06$).

Полученные результаты подтверждают известный факт слабого эффекта отдельных однонуклеотидных замен (SNPs) на развитие заболевания без их связи с остальной частью генома и без учета влияния внешней среды [4, 5, 12, 13]. Для основной массы изученных генов-маркеров относительный риск (RR, relative risk) развития заболевания не превышает 1,5. Следовательно, реальный вклад отдельно взятого полиморфизма в развитие мультифакториальной патологии сравнительно не велик [3, 4]. Другими словами, чтобы выявить ассоциацию генетического фактора (SNP) с определенным заболеванием, необходимо рассматривать совокупность множества генов, вовлеченных в сложные механизмы патогенеза, и факторы внешней и внутренней среды организма [5, 10, 13].

По этой причине для дальнейшего поиска ассоциаций изучаемых полиморфизмов генов на развитие акушерской патологии мы применили специальный ме-

тод статистического анализа (логистическая регрессия), который позволяет учитывать статистические взаимодействия распределения в группах пациентов мутаций множества генов [5, 11, 15]

Для учета возможного влияния различных комбинаций изучаемых генов на риск акушерско-гинекологических осложнений была использована логистическая регрессионная модель пропорционального риска Кокса. В пошаговый логистический регрессионный анализ были включены три группы полиморфных вариантов генов: обмена гомоцистеина (MTHFR 677 C>T, MTHFR 1298 A>C, MTR 1256 A>G и MTRR 66 A>G); компонентов системы гемостаза (FGB –455G>A, F220210 G>A, F5 1691G>A, F7 10976G>A, F13 163(100) G>T (Val34Leu), ITGA2 807C>T, ITGB3 1565T>C, PAI-1 –675 5G>4G); регуляции артериального давления (ADD11378G>T, AGT 704 T>C, AGT 521C>T, AGTR11166 A>C, AGTR2 1675G>A, CYP11B2 –344C>T, GNB3 825C>T, NOS3 –786T>C, NOS3 894 G>T). Анализ включал результаты генотипирования 114 пациенток, среди которых у 69 наблюдался отягощенный акушерский анамнез, а у 45 — нормальный акушерский анамнез. По данным многофакторного анализа была сформирована модель, представляющая собой совокупность из четырех генотипов, три из которых относятся к генам системы регуляции АД (AGT 704CC, GNB 825CT, NOS3 894GT) и один из системы метаболизма гомоцистеина (MTR 2756AG). В табл. 1 представлены критерии достоверности включения в модель каждого компонента модели и статистическая значимость модели как совокупности четырех генотипов. Чувствительность модели составила 86% ($\chi^2 = 26,27, p < 0,001$). На основании полученных расчетов можно вывести логлинейное уравнение прогноза риска ОАА:

$$\text{ОАА}_{\text{прогноз}} = B + e^{a \cdot x_1} + e^{b \cdot x_2} + e^{c \cdot x_3} + e^{d \cdot x_4}.$$

Таблица 1

Ассоциация сочетаний генотипов с ОАА (n = 114)

Компоненты модели	Критерий Вальда	p
AGT 704CC	3,919	0,048
GNB 825CT	5,945	0,015
NOS3 894GT	5,438	0,02
MTR 2756AG	6,305	< 0,001
Модель	χ^2 26,27	< 0,001

Пользуясь подобными моделями, можно использовать широкий спектр генетических вариантов генов (SNPs) и средовых факторов для прогнозирования индивидуальной предрасположенности к акушерско-гинекологической патологии на любом этапе консультирования женщины. Для этого необходимо провести на локальной популяции исследование на достаточно большой выборке пациентов для получения статистически достоверных данных, чтобы экстраполировать результаты моделирования на генеральную выборку. Необходимо учитывать, что обнаруженные статистически значимые ассоциации могут быть недостоверными на других популяциях [2].

Комплексная оценка различных групп полиморфизмов, влияющих на различные пути патогенеза определенной мультифакториальной патологии, является бо-

лее перспективной, чем однофакторный анализ [13]. Мультифакторный анализ позволяет учесть генетическую архитектуру сложных отношений генотип-фенотип. Реализация генотипа отдельных генов зависит от локусной гетерогенности, наличия фенотипов, межгенных влияний, ген-средовых взаимодействий [5, 12, 15].

В проведенном исследовании на фоне отсутствия достоверных различий между группами по отдельным полиморфизмам статистически значимым предиктором акушерских осложнений явилось определенное сочетание генотипов (AGT 704CC, GNB 825CT, NOS3 894GT, MTR 2756AG). Данную ситуацию можно рассматривать как статистический эпистаз, который определяется, как отклонение от аддитивности в математической модели, обобщающей отношения между мультилокусными генотипами и фенотипической изменчивостью в популяции, которые не могут быть предсказаны только на основе рассмотрения действия генов раздельно [5, 15].

Выводы

1. Комплексная оценка различных групп полиморфизмов, влияющих на различные пути патогенеза определенной мультифакториальной патологии, является более перспективной, чем однофакторный анализ.

2. Статистические методы моделирования позволяют более эффективно выявлять ассоциации множества предикторов с определенным патологическим процессом.

3. В проведенном исследовании 21 полиморфизма генов обмена гомоцистеина, компонентов гемостаза и регуляции АД, на фоне отсутствия достоверных различий между группами по отдельным полиморфизмам, статистически значимым предиктором акушерских осложнений явилось определенное сочетание генотипов (AGT 704CC, GNB 825CT, NOS3 894GT, MTR 2756AG).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Акушерство: Национальное руководство / Под ред. Э.К. Айламазяна, В.И. Кулакова, В.Е. Радзинского, Г.М. Савельевой. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.
- [2] Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития: научно-практические аспекты. — СПб.: Издательство Н-Л., 2007.
- [3] Белоцерковцева Л.Д., Буданов П.В., Давыдов А.И. и др. Невынашивание беременности: патогенез, диагностика, лечение. Клин. рук. / Под ред. А.Н. Стрижакова. — М., 2011.
- [4] Бондарь Т.П., Муратова А.Ю. Генетические факторы развития тромбофилии у беременных // Вестник РУДН. Серия «Медицина». — 2012. — № 1. — С. 119—120.
- [5] Конева Л.А. Метод MDR для анализа межгенных и ген-средовых взаимодействий // Генетика человека и патология // Актуальные проблемы современной цитогенетики: сборник научных трудов. — 2011. — Вып. 9. — С. 171—178.
- [6] Можейко Л.Ф., Тихоненко И.В. Шкала бальной оценки угрозы невынашивания беременности. Министерство здравоохранения Республики Беларусь. — Минск, 2009.
- [7] Радзинский В.Е., Ордиянц И.М., Оразмурадов А.А. Женская консультация. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2009.
- [8] Радзинский В.Е. Рук-во к практическим занятиям по акушерству. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.
- [9] Репродуктивное здоровье: Учеб. пособ. / Под ред. В.Е. Радзинского. — М.: РУДН, 2011.

- [10] Радзинский В.Е. Акушерская агрессия. — Изд. Медиабюро Статус презенс, 2011.
- [11] Стрижаков А.Н., Тезиков Ю.В., Липатов И.С. и др. Патогенетическое обоснование диагностики и догестационной профилактики эмбриоплацентарной дисфункции // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2012. — Т. 1. — № 1. — С. 5—10.
- [12] Ходжаева З.С., Мусиенко Е.В., Кузмин А.А. Роль полиморфизма ангиогенных факторов в развитии акушерской патологии // Вестник РУДН. Серия «Медицина». — 2009. — № 6. — С. 19—24.
- [13] Heidema A.G., Boer J.M.A., Nagelkerke N. et al. The challenge for genetic epidemiologists: how to analyze large numbers of SNPs in relation to complex diseases // BMC Genetics. — 2006. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/7/23>
- [14] Moore J.H., Gibert J.C., Tsai C.T. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility // J. Theoret. Biol. — 2006. — V. 241. — P. 252—261.
- [15] Moore J.H., Williams S.M. Epistasis and implications for Personal Genetics // Am. J. Hum. Genet. — 2009. — V. 85. — P. 309—320.

GENETIC PREDICTORS OF OBSTETRIC COMPLICATIONS: INTERGENETIC ASSOCIATION

**T.B. Tretyakova, N.V. Bashmakova,
N.S. Demchenko**

Federal State Institute "Scientific Research Institute
of Maternity and Infancy Welfare"
Repina str., 1, Yekaterinburg, Russia, 620028

The goal of the research is to analyze the intergenic interaction of the marker-genes of thrombophilia, the disruption of homocystein cycle and blood pressure control. Two groups of women have been included in the investigation. The under study group consists of 197 women with eclampsy and pregnancy miscarriage in anamnesis. The comparison group consists of 228 women with normal obstetric anamnesis. The molecular-genetic analysis of 21 allelic polymorphisms of MTHFR, MTR, MTRR, FGB, F2, F5, F7, F13, ITGA2, ITGB3, PAI-1, ADD1, AGT, AGTR1, AGTR2, CYP, GNB, NOS3 genes has been carried out. Statistically significant differences haven't been revealed in the univariate analysis of the alternative genotypes rate between groups. However, we have found out that the frequency of combined genotypes (AGT 704CC, GNB 825CT, NOS3 894GT, MTR 2756AG) in group with eclampsy and pregnancy miscarriage in anamnesis is statistically higher.

Key words: gene polymorphism, combined genotype.