

О ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТАХ ПРЕЭКЛАМПСИИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕПЕНЕЙ ТЯЖЕСТИ

Каганович Е.Н.

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, e-mail: info@bsu.edu.ru

В статье приведены некоторые результаты ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с морфологическими характеристиками плаценты у беременных с преэклампсией русской национальности, являющихся уроженками Центрального Черноземья России. Проведен комплексный анализ частот аллелей и генотипов у беременных с преэклампсией и беременных с нормально протекающей беременностью. Группу беременных с преэклампсией различной степени тяжести составили 250 индивидуумов, а контрольную группу 245 беременных без преэклампсии. Среди беременных с преэклампсией 1-я степень тяжести наблюдалась у 95 женщин (38%), 2-я степень тяжести - у 100 индивидуумов (40%), а 3-я степень тяжести - у 55 беременных (22%). При сравнении частот отдельных генетических вариантов исследуемых цитокинов у беременных с преэклампсией различных степеней тяжести и в контрольной группе статистически достоверных различий выявлено не было.

Ключевые слова: преэклампсия, артериальное давление, беременность, цитокины, праймеры и зонды, степень тяжести.

ABOUT GENETIC DETERMINANTS OF A PREEKLAMPSIYA OF VARYING SEVERITY

Kaganovich E.N.

"The Belgorod state national research university", Belgorod, e-mail: info@bsu.edu.ru

Some results of associations of molecular and genetic markers with morphological characteristics of a placenta at the pregnant women from a preeklampsia Russian nationality who are natives of the Central Chernozem region of Russia are given in article. The complex analysis of frequencies of alleles and genotypes at pregnant women with a preeklampsia and pregnant women with normally proceeding pregnancy is carried out. The group of pregnant women from a preeklampsia of varying severity was made by 250 individuals, and control group of 245 pregnant women without preeklampsia. Among pregnant women with a preeklampsia the 1st severity was observed at 95 women (38%), the 2nd severity - at 100 individuals (40%), and the 3rd severity - at 55 pregnant women (22%). When comparing frequencies of separate genetic options of the studied tsitokin at pregnant women with a preeklampsia of varying severity and in control group of statistically reliable distinctions it wasn't revealed

Keywords: preeklampsia, arterial pressure, pregnancy, tsitokins, primers and probes, severity.

Преэклампсия – это осложнение гестационного периода беременности, возникающее во второй ее половине. В основе патологии лежат расстройства функций эндокринной, сердечно-сосудистой центральной и вегетативной нервной систем, а также нарушения обменных процессов, микроциркуляции, иммунного ответа и других функций организма [4]. В настоящее время общепринятым считается полиэтиологичность ПЭ. Это специфичное для беременности осложнение и развитие его связано с особенностями самого гестационного процесса. Несмотря на высокий интерес к проблеме, генез данной патологии остается малоизученным. [2]. Важное значение в реализации патогенетических механизмов развития преэклампсии отводится цитокинам [1], что требует более детального рассмотрения их медико-биологических и молекулярно-генетических характеристик.

Цель исследования

Изучить генетические полиморфизмы цитокинов *-308 G/ATNF α (rs1800629)*, *+36 A/GTNFR1 (rs767455)*, *+250 A/GLT α (rs909253)*, *-403 G/ARANTES(rs2107538)*, *-801 G/ASDF1 (rs1801157)*, *C/GMCP-1 (rs 285765)*, *+1931 A/T MIP1 β (rs1719153)* и оценить их патогенетическую значимость при ПЭ различной степени тяжести.

Материалы и методы

Проведено молекулярно-генетическое исследование двух выборок женщин: 250 пациенток с преэклампсией и 245 женщин контрольной группы. Общий объем исследуемой выборки составил 495 человек. Средний возраст пациенток с преэклампсией равен $31,2 \pm 7,5$ лет (варьирует от 18 лет до 42 лет), контрольной группы - $30,2 \pm 6,3$ лет (варьирует от 16 до 42 лет, $p > 0,05$). Критериями включения в исследуемые выборки являлись: русская национальность, уроженцы Центрально-Черноземного района Российской Федерации, не имеющие родства между собой. В группу пациенток с ПЭ включались индивидуумы с подтвержденным клиническими и клинико-лабораторными методами обследования диагнозом преэклампсия. Контрольная группа формировалась из женщин с физиологическим течением беременности. Обследование беременных проводилось в Перинатальном центре Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Сбор клинического материала осуществлялся врачом – перинатологом, к.м.н. Добродомовой И.С.

Среди 495 беременных 245 пациенток было с физиологическим течением гестации и 250 беременных женщин с ПЭ: 95 беременных с преэклампсией I степени тяжести, 100 - с преэклампсией II степени тяжести и 55 – с III степенью тяжести преэклампсией. Степень тяжести ПЭ оценивалась по шкале Гоеске в модификации Г.М. Савельевой [3].

У каждой беременной с преэклампсией тщательно собирался анамнез (наличие вредных привычек, психо-эмоциональных перенапряжений, наличие преэклампсии у родственников, данные о менструальном цикле, возраст начала половой жизни, наличие заболевания передающиеся половым путем до беременности и во время данной беременности, наличие гинекологических заболеваний, возраст наступления первой беременности, количество и исход предыдущих беременностей, наличие осложнений после родов, медицинских аборт, вид контрацепции до наступления данной беременности).

Молекулярно-генетическое исследование выполнялось в лаборатории "Молекулярной генетики человека" медицинского института НИУ БелГУ.

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из венозной крови исследуемых индивидуумов. Выделение геномной ДНК из периферической крови производилось методом фенол-хлороформной экстракции [5]. Этапы выделения ДНК включали:

1. Лизирование осажденных в PBS (pH=8.4) лейкоцитов в ТЕ-буфере протеиназой К в течении 20 часов при 37°C.

2. Отмывка ДНК лизированных лейкоцитов. Сначала 1:1 фенолом, забуференным HCl (pH=7.4), потом забуференных в соотношении 1:1 объемами фенола и хлороформа на два объема надосадочной жидкости и после этого хлороформом (1:1).

3. Затем ДНК преципитировалась этанолом (-20°C), высушивалась, растворялась ТЕ-буфером и замораживалась (-20°C).

Методом ПЦР синтеза ДНК проводили анализ исследуемых генетических полиморфизмов -308 G/ATNF α (*rs1800629*), +250 A/GLT α (*rs909253*), +36 A/GTNFR1 (*rs767455*), -801 G/ASDF 1(*rs1801157*), +1931 A/T MIP1 β (*rs1719153*) на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad). Использовали стандартные олигонуклеотидные праймеры и зонды с дальнейшим анализом полиморфизмов методом дискриминации аллелей. При проведении ПЦР реакционная смесь объемом 25 мкл включала: геномная ДНК в количестве 0,1 мкг, 2,5мМ MgCl₂, 67 мМтрис-HCl (pH=8,8), зонды в количестве по 5 пкмоль каждый, праймеры по 10 пМ каждый, dATP, dGTP, dCTP, dTTP в концентрации по 200 мкМ каждый, Taq-полимераза в количестве 1-2единицы активности.

После денатурации (при t 95°C 4 мин.) были выполнены 40 циклов амплификации по следующей схеме: отжиг праймеров – при t +49-66°C 1 мин.; денатурация – при t +95°C 15 сек.

Генотипирование ДНК-маркеров производили на амплификаторе «IQ5» с помощью метода детекцииTaqMan зондов на основе уровня относительной флуоресценции каждого зонда с системой детекции в режиме реального времени. Для генотипирования локусов использовалась программа «Bio-Rad IQ5-Standard Edition».

Результаты исследования

Проведен анализ распределения частот изучаемых полиморфных маркеров генов цитокинов в группах беременных с преэклампсии различной степени тяжести (n=250) и в контрольной группе (n=245). Среди беременных с преэклампсией 1-я степень тяжести наблюдалась у 95 женщин (38%), 2-я степень тяжести - у 100 индивидуумов (40%), а 3-я степень тяжести - у 55 беременных (22%). При сравнении частот отдельных генетических вариантов исследуемых цитокинов у беременных с преэклампсией различных степеней тяжести и в контрольной группе статистически достоверных различий выявлено не было

Далее проведено изучение роли сочетаний генетических полиморфизмов цитокинов в развитии преэклампсии различных степеней тяжести.

Установлено, что в формировании значимых комбинаций, отличающих беременных с ПЭ I степени тяжести от контрольной группы участвуют пять из восьми изученных

генетических полиморфизмов: *-308 G/ATNF α* (*rs1800629*), *+250 A/GLt α* (*rs909253*), *-403 G/ARANTES*(*rs2107538*), *-801 G/ASDF1* (*rs1801157*), *C/GMCP-1* (*rs 285765*), *+1931 A/T MIP1 β* (*rs1719153*). При этом пять «значимых» локусов формируют и пять статистически значимых сочетаний генетических вариантов, отражающих особенности генетической конституции беременных с преэклампсией I степени тяжести.

Получено, что в формировании двух комбинаций принимают участие по четыре генетических варианта исследуемых локусов цитокинов. Сочетание аллелей *+1931 A MIP1 β* , *+250 A Lt α* , *-403 GRANTES* и *-308 GTNF α* встречается у 73,03% беременных с преэклампсией I степени тяжести, что меньше показателя контрольной группы (86,53%, $p=0,004$). Также выявлено, что среди беременных с преэклампсией I степени тяжести комбинация генетических маркеров *+1931 A MIP1 β* , *-801 GSDF1*, *+250 A Lt α* и *-308 GTNF α* (73,63%) регистрируется в 1,17 раза реже, чем в контрольной группе, (86,53%, $p=0,005$). Данные сочетания имеют протективный характер (OR=0,42, 95% CI 0,23-0,76 и OR=0,43, 95% CI 0,24-0,78, соответственно).

В формировании трех других значимых комбинаций участвуют по три генетических варианта изучаемых полиморфных локусов. При этом все эти сочетания оказывают протективное действие на развитие преэклампсией I степени тяжести (OR=0,43-0,46). Установлено, что в контрольной группе распространенность комбинаций генетических вариантов *+1931 A MIP1 β* , *+250 A Lt α* и *-403 GRANTES* (86,94%), *+1931 A MIP1 β* , *+250 A Lt α* и *-308 GTNF α* (88,57%) и *+1931 A MIP1 β* , *-801 GSDF1*, *+250 A Lt α* (86,94%) превышает аналогичные показатели беременных с ПЭ I степени тяжести (74,73%, $p=0,007$, 76,92%, $p=0,007$, 75,27%, $p=0,01$, соответственно).

Выявлены особенности «генетической конституции» беременных с преэклампсией II - III степени тяжести по исследуемым генам цитокинов. Комбинация генетических вариантов *-801 ASDF1*, *+36 GGTNFR1* и *-308 A TNF α* , встречается у 4,66% беременных с ПЭ с II - III степеней тяжести, что в 3,82 раза выше аналогичного показателя контрольной группы - 1,22%. Эта комбинация является фактором риска развития преэклампсией II - III степеней тяжести ($p=0,04$, OR=3,95, 95% CI 1,01-15,51).

Наоборот, сочетание аллелей *-801 GSDF1* и *GMCP* (*rs 285765*) имеет протективное значение для формирования преэклампсией II – III степеней тяжести ($p=0,02$, OR=0,59, 95% CI 0,36-0,98). Данная комбинация генетических вариантов зарегистрирована у 21,43% беременных с преэклампсией II – III степеней тяжести и у 31,43% женщин контрольной группы ($p=0,02$).

Выводы

Подводя итог полученным материалам, можно сделать вывод о значимой роли генетических полиморфизмов *-308 G/ATNF α (rs1800629)*, *+250 A/GL α (rs909253)*, *+36 A/GTNFR1 (rs767455)*, *-403 G/ARANTES (rs2107538)*, *-801 G/ASDF 1(rs1801157)*, *C/GMCP-1 (rs 285765)*, *+1931 A/T MIP1 β (rs1719153)* в формировании преэклампсии различных степеней тяжести. Развитие преэклампсии I степени тяжести ассоциировано с комбинациями генетических вариантов *+1931 AMIP1 β* , *+250 A L α* , *-403 GRANTES*, *-308 GTNF α* (OR=0,42), *+1931 A MIP1 β* , *-801 GSDF1*, *+250 A L α* , *-308 GTNF α* (OR=0,43), *+1931 A MIP1 β* , *+250 A L α* , *-403 GRANTES*(OR=0,44), *+1931 A MIP1 β* ,*+250 A L α* , *-308 GTNF α* (OR=0,43) и *+1931 AMIP1 β* , *-801 GSDF1*, *+250 A L α* (OR=0,46). Сочетания полиморфных вариантов *-801 GSDF1* и *GMCP (rs 285765)* (OR=0,59), *-801 ASDF1*,*+36 GTNFRI* и *-308 A TNF α* (OR=3,95) маркируют развитие преэклампсии II - III степеней тяжести.

Список литературы

1. Бочков, Н.П. Клиническая генетика [Текст] : учебник для студентов мед.вузов / Н.П. Бочков ; УМО по мед. и фармацев. образованию вузов России. – М. : ГЭОТАР МЕД, 2004. – 480 с.
2. Колгушкина, Т.Н. Гестоз: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение [Текст]: метод.рекомендации / Т.Н. Колгушкина; Минск. гос. мед. ин-т. – Минск: МГМИ, 2000. – 36 с.
3. Савельева, Г.М. Проблема гестоза в современном акушерстве / Г. М. Савельева // Материалы 36-го ежегодного конгресса Международного общества по изучению патофизиологии беременности организации гестоза, Москва, 24-28 мая 2004 г. – Москва, 2004. – С. 194-195.
4. Сидорова, И.С. Гестоз [Текст]: учеб.пособие / И.С. Сидорова. – М. : Медицина, 2003. – 414 с. – (Учеб.лит. для слушателей системы последиплом. образования).
5. Mathew, C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA[Text] / C.G.Mathew// Methods. Mol. Biol. – 1985. – Vol. 2. – P. 31-34.

Рецензенты:

Чурносов М.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин, медицинский факультет ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

Сорокина И.Н., д.м.н., доцент, профессор кафедры медико-биологических дисциплин, медицинский факультет ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.