

## АНАЛИЗ ВКЛАДА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПОДВЕРЖЕННОСТЬ К ПРЕЭКЛАМПСИИ

Каганович Е.Н.

*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ») (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85), e-mail:info@bsu.edu.ru*

В данной работе приведены результаты исследований полиморфных маркеров генов цитокинов и их вовлеченности в формирование преэклампсии у беременных. В выборку включались индивидуумы русской национальности, являющихся уроженками Центрально-Черноземного региона России. Выполнено изучение распределения полиморфных вариантов генов-кандидатов среди беременных с преэклампсией в зависимости от наличия/отсутствия наследственной отягощенности и в контрольной группе. Данные о наличии (отсутствии) наследственной отягощенности по преэклампсии были получены у 200 беременных с преэклампсией из 247 женщин этой группы (81%). В исследуемой нами группе беременных с преэклампсией у 110 женщин (55%) отмечался отягощенный семейный анамнез, тогда как у 90 женщин (45%) наследственность была не отягощена. Молекулярно-генетический маркер - 403 G/A RANTES ассоциирован с формированием преэклампсии у индивидуумов без отягощенного семейного анамнеза.

Ключевые слова: преэклампсия, артериальное давление, беременность, цитокины, праймеры и зонды, наследственная отягощенность.

## THE ANALYSIS OF THE CONTRIBUTION OF GENES OF TSITOKINS IN SUSCEPTIBILITY TO PREEKLAMPSIYA

Kaganovich E.N.

*"The Belgorod state national research university" (NIU "BELGU") (Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85), e-mail:info@bsu.edu.ru*

Results of researches of polymorphic markers of genes of tsitokins and their involvement into formation of a preeklampsia at pregnant women are given in this work. Selection joined individuals of the Russian nationality, being natives of the Central Chernozem region of Russia. Studying of distribution of polymorphic options of candidate genes among pregnant women with a preeklampsia depending on existence/lack of a hereditary burdeness and in control group is executed. Data on existence (absence) of a hereditary burdeness on a preeklampsia were obtained at 200 pregnant women with a preeklampsia from 247 women of this group (81%). In the group of pregnant women investigated by us with a preeklampsia at 110 women (55%) the burdened family anamnesis whereas at 90 women (45%) heredity wasn't burdened was noted. The molecular and genetic marker - 403 G/A RANTES is associated with formation of a preeklampsia at individuals without the burdened family anamnesis.

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

Преэклампсия – это состояние, которое встречается у беременных женщин, характеризующееся высоким уровнем артериального давления, наличием белка в моче, отеками на ногах и руках, а также значительными расстройствами сосудистой системы, иммунитета, гемостаза, нарушением гемодинамики и микроциркуляции, сопровождающее плацентарной недостаточностью, нарушением функции почек, печени, легких [4,5]. В Российской Федерации, по данным статистики, частота преэклампсии у беременных за последние годы выросла и колеблется, по данным разных авторов, от 7% до 20%. В структуре причин материнской смертности преэклампсия стабильно занимает третье место и составляет от 11,8% до 14,8%. Большинство исследователей отмечают, что у женщин, перенесших преэклампсию, может формироваться хроническая патология почек и гипертоническая

болезнь [3,8]. Преэклампсия развивается у 6-12% здоровых беременных и у 20-40% беременных, имеющих экстрагенитальную патологию [5,6]. Среди причин материнской смертности 20-25% случаев приходится на долю ПЭ. Перинатальная смертность при тяжелом течении преэклампсии достигает 9,3-19,8 % [4]. Значительную роль в развитии преэклампсии играют генетические факторы. Генетическая компонента заболевания может составлять до 50% [6,9]. 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 [1].

### **Цель исследования**

Изучение роли генетических полиморфизмов-308 G/A *TNF $\alpha$*  (*rs1800629*), +250 A/G *Lta* (*rs909253*), +36 A/G *TNFR1* (*rs767455*), -403 G/A *RANTES*(*rs2107538*), A/G I- TAC (*rs 4512021*), -801 G/A *SDF 1*(*rs1801157*), C/G *MCP-1* (*rs 285765*), +1931 A/T *MIP1 $\beta$*  (*rs1719153*) в формировании преэклампсии в зависимости от наследственной отягощенности.

### **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 обследованием 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 [4].

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 [7]. Этапы выделения ДНК включали:

1. Лизирование осажденных в PBS (pH=8.4) лейкоцитов в TE-буфере протеиназой K 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 TE-буфером и замораживалась (-20°C).

Методом ПЦР синтеза ДНК проводили анализ исследуемых генетических полиморфизмов -308 G/A *TNF $\alpha$*  (*rs1800629*), +250 A/G *Lta* (*rs909253*), +36 A/G *TNFR1* (*rs767455*), -801 G/A *SDF 1* (*rs1801157*), +1931 A/T *MIP1 $\beta$*  (*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 MgCl<sub>2</sub>, 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 детекции TaqMan 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**

Выполнено изучение распределения полиморфных вариантов генов-кандидатов среди беременных с преэклампсией в зависимости от наличия/отсутствия наследственной отягощенности и в контрольной группе. Данные о наличии (отсутствии) наследственной

отягощенности по преэклампсии были получены у 200 беременных с преэклампсией из 247 женщин этой группы (81%). В исследуемой нами группе беременных с преэклампсией у 110 женщин (55%) отмечался отягощенный семейный анамнез, тогда как у 90 женщин (45%) наследственность была не отягощена.

Установлены статистически достоверные различия в сравнении с контролем только в группе женщин с преэклампсией без отягощенного семейного анамнеза по частотам генотипов и аллелей локуса - 403 G/A RANTES: среди беременных с преэклампсией без наследственной отягощенности наблюдалась наибольшая частота аллеля – 403 G RANTES (89,53%), генотипа- 403 GG RANTES (80,23%) и наименьшая распространенность генотипа -403 GA RANTES (19,60%) по сравнению с беременными с преэклампсией с наследственной отягощенностью (80,45%,  $\chi^2=5,39$ ,  $p=0,02$ , 62,73%,  $\chi^2=6,28$ ,  $p=0,01$  и 35,45%,  $\chi^2=5,98$ ,  $p=0,02$  соответственно) и контрольной группой (81,73%,  $\chi^2=5,16$ ,  $p=0,02$ , 66,26%,  $\chi^2=5,27$ ,  $p=0,02$  и 31,92%,  $\chi^2=4,24$ ,  $p=0,04$ , соответственно).

Таким образом, можно отметить, что молекулярно-генетический маркер - 403 G/A RANTES ассоциирован с формированием преэклампсии у индивидуумов без отягощенного семейного анамнеза. Генетические варианты -403 GG RANTES (OR=2,07 95% CI 1,01-3,90) и -403 G RANTES (OR=1,91, 95% CI 1,09-3,40) повышают риск развития преэклампсии, а генотип - 403 GA RANTES имеет протективное значение при формировании ПЭ (OR=0,51, 95% CI 0,26-0,97) у беременных без отягощенного семейного анамнеза.

Далее нами изучена роль комбинаций генетических вариантов исследуемых цитокинов в развитии преэклампсии в зависимости от наследственной отягощенности (табл. 9). Установлено, что, во-первых, в формировании значимых комбинаций, отличающих группу беременных с преэклампсией без наследственной отягощенности от группы беременных с преэклампсией с отягощенным семейным анамнезом и контрольной группы, принимают участие семь из восьми изученных полиморфных маркеров: -308 G/A TNF $\alpha$  (rs1800629), +250 A/G Lta (rs909253), -403 G/A RANTES (rs2107538), A/G I-TAC (rs 4512021), -801 G/A SDF1 (rs1801157), C/G MCP-1 (rs 285765), +1931 A/T MIP1 $\beta$  (rs1719153). Во-вторых, эти семь генетических полиморфизмов формируют шесть статистически значимых комбинаций генетических вариантов. При чем, в состав четырех этих комбинаций входят по три генетических варианта, а другие два сочетания включают по два генетических варианта. В-третьих, все шесть комбинаций имеют протективное значение для формирования преэклампсии у женщин без отягощенного семейного анамнеза.

Выявлено, что комбинации генетических вариантов цитокинов, являющиеся «своеобразными» для беременных с преэклампсией без наследственной отягощенности и включающие по три молекулярно-генетических маркера сформированы следующими

полиморфными вариантами: +1931 A MIP1 $\beta$ , +250 A Lta, -403 A RANTES; -801 G SDF1, G MCP-1, +250 A Lta; -801 G SDF1, +250 A Lta, G I-TAC; +250 A Lta, G I-TAC, -308 GG TNF $\alpha$ . Эти сочетания генетических вариантов встречаются у 14,46%, 17,78%, 51,11% и 41,57% беременных с преэклампсией без отягощенного семейного анамнеза, соответственно, тогда как в контрольной группе их распространенность равна 27,35% (OR=0,45 95% CI 0,22-0,88, p=0,01); 30,61% (OR=0,49 95% CI 0,27-0,90, p=0,01); 64,08% (OR=0,59 95% CI 0,36-0,96, p=0,02); 54,69% (OR=0,59 95% CI 0,36-0,96, p=0,02, соответственно).

Следующие два сочетания полиморфных маркеров цитокинов представлены двумя генетическими вариантами каждое. Эти комбинации зарегистрированы у 15,66% (+1931 A MIP1 $\beta$ , -403ARANTES) и 20,00% (-801 GSDF1, GMCP-1) беременных с преэклампсией без наследственной отягощенности, что более чем в 1,5 раза меньше аналогичных показателей контрольной группы, где они составляют 28,57% (OR=0,46 95% CI 0,24-0,89, p=0,01), 31,43% (OR=0,54 95% CI 0,30-0,98, p=0,02), соответственно.

У индивидуумов с наследственной отягощенностью значимых ассоциаций комбинаций генов-кандидатов цитокинов с формированием преэклампсией не выявлено.

### **Выводы**

Подводя итог данному разделу работы, можно заключить, что семь генетических полиморфизмов цитокинов формируют шесть комбинаций генетических вариантов, определяющих подверженность к развитию преэклампсии у индивидуумов без отягощенного семейного анамнеза. Это следующие сочетания: +1931A MIP1 $\beta$ , +250 A Lta, -403 A RANTES (OR=0,45); -801 G SDF1, G MCP-1, +250 A Lta (OR=0,49); -801 G SDF1, +250 A Lta, G I-TAC (OR=0,59); +250 A Lta, G I-TAC, -308 GG TNF $\alpha$  (OR=0,59); +1931A MIP1 $\beta$ , -403 A RANTES (OR=0,46); -801 G SDF1, G MCP-1 (OR=0,54). Данные комбинации снижают риск развития преэклампсии у женщин с неотягощенной наследственностью.

### **Список литературы**

1. Бочков, Н.П. Клиническая генетика [Текст] : учебник для студентов мед.вузов / Н.П. Бочков ; УМО по мед. и фармац. 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. Преэклампсия [Текст]: рук. / под ред. Г.Т. Сухих, Л.Е. Мурашко. – Москва :ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 576 с. – (Б-ка врача-специалиста. Акушерство. Гинекология).

4. Савельева, И.В. Роль фактора роста плаценты в прогнозе развития тяжелых гестационных осложнений у беременных с метаболическим синдромом [Текст] / И.В. Савельева, С.В. Баринев, Е.В. Рогова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 16-19.
5. Сидорова, И.С. Эндотелиальная дисфункция в развитии гестоза [Текст] / И.С. Сидорова, И.Л. Галинова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 75-81.
6. A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2) [Text] / L. T. Roten, M. H. Fenstad, S. Forsmo [et al.] // Mol. Hum. Reprod. – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 439-446.
7. Mathew, C. G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA[Text] / C. G.Mathew // Methods. Mol. Biol. – 1985. – Vol. 2. – P. 31-34.
8. Williams, P.J. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy [Text] / P.J. Williams, F.B. Pipkin // Best Pract. Res. Clin. ObstetGynaecol. – 2011. – Vol. 25, № 4. – P. 405-417.
9. Young, B.C. Pathogenesis of preeclampsia [Text] / B.C. Young, R.J. Levine, S. A. Karumanchi // Annu Rev. Pathol. – 2010. – Vol. 5. – P. 173-192.

**Рецензенты:**

Чурносков 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.