

УДК 618.3-008.6:616.1-07

РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ВАЗОАКТИВНЫХ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЖЕННОСТИ К ПРЕЭКЛАМПСИИ

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

Тверская государственная медицинская академия, Тверь, e-mail: vzvavarin@mail.ru

Проведен анализ ассоциации полиморфизмов *C825T* гена субъединицы бета-3 гуанин связывающего белка (*GNB3*) и *-786T/C* и *Glu298Asp* эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*) с преэклампсией. Обследовано 124 беременные с преэклампсией и 112 здоровых беременных. Аллель *298Asp* гена *NOS3* и аллель *825T* гена *GNB3* ассоциированы с преэклампсией. Аллель *298Glu* и генотип *Glu/Glu* гена *NOS3*, а также аллель *825C* гена *GNB3* связаны со снижением риска заболевания. При преэклампсии установлено синергическое взаимодействие между полиморфными локусами *GNB3/C825T* и *NOS3/(-786T/C)*, тогда как полиморфный locus *NOS3/Glu298Asp* оказывает независимый эффект в формировании этого заболевания.

Ключевые слова: преэклампсия; ген *GNB3*; ген *NOS3*; мультилокусный анализ

ROLE OF GENE-GENE INTERACTIONS OF VASOACTIVE GENES IN THE FORMATION OF PREDISPOSITION TO PREECLAMPSIA

Zavarin V.V., Kalinkin M.N., Radkov O.V.

Tver State Medical Academy, Tver, e-mail: vzvavarin@mail.ru

The association of *GNB3 C825T* and *NOS3 -786T/C* and *Glu298Asp* gene polymorphisms with preeclampsia was studied. A total of 124 pregnant women with preeclampsia and 112 healthy pregnant women were examined. Allele *298Asp* of *NOS3* gene and allele *825T* of *GNB3* gene are associated with preeclampsia. Allele *298Glu* and genotype *Glu/Glu* of *NOS3* gene, and allele *825C* of *GNB3* gene are associated with reduced risk of disease. In preeclampsia synergy between polymorphic loci *GNB3/C825T* and *NOS3/(-786T/C)* is established, whereas the polymorphic locus *NOS3/Glu298Asp* has an independent effect in disease development.

Keywords: preeclampsia, *GNB3* gene, *NOS3* gene, multilocus analysis

Преэклампсия является осложнением беременности с высокой материнской и перинатальной заболеваемостью и смертностью, в реализации которого участвует множество генетических и средовых факторов [10]. Эндотелиальная 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 при преэклампсии уровень этого вазодилататора снижается, что может быть ассоциировано с генетическим полиморфизмом эндотелиальной синтазы NO, кодируемой геном *NOS3* [5, 6]. 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 [4, 9]. Полиморфизм *C825T* гена *GNB3* ассоциируется с эндотелиальной дисфункцией [4], 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 [1]. Мультилокусный анализ полиморфизмов генов, влияющих на функцию эндотелия, может выделить патогенетически значимые комбинации локусов, ассоциированных с преэклампсией, для прогнозирования этого осложнения беременности.

Целью исследования явилось проведение анализа ассоциации полиморфизма *C825T* гена *GNB3*, а также полиморфизмов *-786T/C* и *Glu298Asp* гена *NOS3* с преэклампсией.

Материалы 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. Критерии включения в основную группу: клиническое АД $\geq 140/90$ мм рт. ст. и суточная протеинурия $> 0,3$ г/л, впервые выявленные после 20 недели гестации. Средний возраст в группах – $27,6 \pm 4,3$ и $25,7 \pm 3,5$ года. По данным суточного мониторирования среднесуточное систолическое АД в основной группе – $132,57 \pm 2,78$, в контрольной группе – $109,89 \pm 1,53$ мм рт. ст. ($p = 0,046$), среднесуточное диастолическое АД – $81,05 \pm 1,99$ и $65,45 \pm 0,90$ мм рт. ст. соответственно ($p = 0,032$).

Геномную ДНК выделяли из крови сорбентным методом с использованием набора «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лаборатория «Изоген», Россия). Однонуклеотидные полиморфизмы *-786T/C* (rs2070744)

и *Glu298Asp* (rs1799983) гена *NOS3*, а также *C825T* (rs5443) гена *GNB3* 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).

Статистический анализ данных выполнен с помощью on-line калькулятора на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия; <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 , а также при сравнении с параболой ДеФинетти. Различия по частоте аллелей и генотипов между группами оценены критерием χ^2 Пирсона. Для оценки ассоциации генотипов и аллелей с преэклампсией рассчитаны отношения шансов (odds ratio, OR) с 95%-м доверительным интервалом (confidence interval, CI). Анализ межгенных взаимодействий проведен методом сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) в среде открытой программы MDR v.2.0 beta8 (<http://www.multifactoridimensionalityreduction.org>). Метод MDR был разработан для моделирования межгенных взаимодействий высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых в генетической эпидемиологии параметрических методов [7].

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 $\chi^2 = 0,40$, $p = 0,53$). Отмечается ассоциация полиморфизма *C825T* гена *GNB3* с преэклампсией (табл. 1). Так, вариантный аллель *825T* гена *GNB3* ассоциирован с преэклампсией, т. к. 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 [9]. Вместе с тем связь этого генетического маркера с эндотелиальной дисфункцией при чистом варианте преэклампсии не подтверждена, однако присутствует в случае присоединения HELLP синдрома [4]. Фенотипическими особенностями носителей аллеля *825T* гена *GNB3* в отличие от гомозигот *CC* могут быть более высокие показатели АД, избыточная масса тела, эндотелиальная дисфункция [4, 8].

Таблица 1

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

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

Распределение частот генотипов полиморфизмов гена *NOS3* также соответствовало закону Харди-Вайнберга, за исключением генотипов локуса *NOS3/Glu298Asp* в группе беременных с нормальным течением гестации. Для полиморфизма *Glu298Asp* в группе контроля $\chi^2 = 7,51$ ($p = 0,006$), среди пациенток с преэклампсией $\chi^2 = 0,57$ ($p = 0,45$), 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 [5].

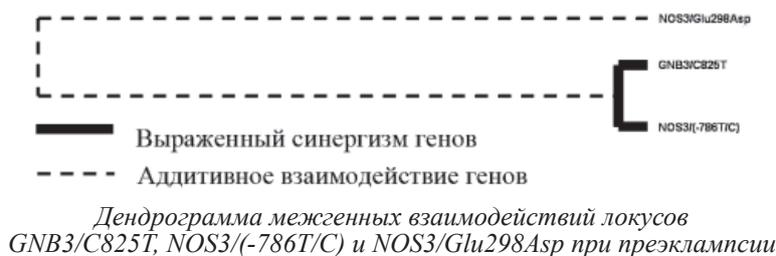
Полиморфизм *Glu298Asp* гена *NOS3* ассоциирован с преэклампсией. Так, гетерозиготный генотип увеличивает риск преэклампсии в 2,45 раза, а носительство аллеля *298Asp* – в 1,92 раза. Напротив, присутствие аллеля *298Glu* или генотипа *Glu/Glu* ассоциируется с уменьшением вероятности гестационного повышения АД. Кроме того, носительство гаплотипа «*Asp298–786C–4b*» гена *NOS3* связано с двукратным увеличением риска преэклампсии при сравнении с гаплотипом «*Glu298–786T–4b*» [6]. Однако утверждению о связи полиморфизма *Glu298Asp* гена *NOS3* с преэклампсией противоречат весьма обширные мультипопуляционные исследования типа случай-контроль [10]. С другой стороны, носительство «протективного» аллеля *298Glu* ассоции-

ровано с увеличением уровня NO в плазме, что, вероятно, может защищать от развития преэклампсии [5].

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*×*NOS3/Glu298Asp*×*NOS3/(-786T/C)*, которая обладает 100%-й 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)* объясня-

ют только 1,31 и 0,79% энтропии соответственно. Данные результаты согласуются с результатами монолокусного анализа ассоциаций для локуса *NOS3/Glu298Asp*. В то же время межгенные взаимодействия пар локусов *GNB3/C825T*×*NOS3/Glu298Asp* и *NOS3/(-786T/C)*×*NOS3/Glu298Asp* являются довольно слабыми (0,05 и 0,56% энтропии соответственно). Напротив, на долю комбинации локусов *GNB3/C825T*×*NOS3/(-786T/C)* приходится 9,15% фенотипической энтропии, что демонстрирует выраженный синергический эффект обоих полиморфизмов. На рисунке 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 [3].



Заключение

Таким образом, аллель *298Asp* гена *NOS3* и *825T* гена *GNB3* ассоциированы с гестозом. 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*.

Список литературы

1. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility / J.H. Moore, J.C. Gilbert, C.T. Tsai et al. // Journal of Theoretical Biology. – 2006. – Vol. 241. – P. 252–261.
2. Abnormal endothelium-dependent microvascular reactivity in recently preeclamptic women / J. Blaauw, R. Graaff, M.G. van Pampus et al. // Obstet. Gynecol. – 2005. – Vol. 105, №3. – P. 626–632.
3. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension: interaction with ACE gene I allele / C.T. Tsai, D. Fallin, F.T. Chiang et al. // Hypertension. – 2003. – Vol. 41, №1. – P. 9–15.
4. C825T polymorphism in the human G protein beta 3 subunit gene and preeclampsia: a case control study / M.W. Jansen, R.M. Bertina, H.L. Vos et al. // Hypertens. Pregnancy. – 2004. – Vol. 23, №2. – P. 211–218.

5. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in preeclampsia / V.C. Sandrim, A.C. Palei, J.T. Sertorio et al. // Mol. Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 16, №7. – P. 506–510.

6. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study / N.C. Serrano, J.P. Casas, L.A. Díaz et al. // Hypertension. – 2004. – Vol. 44. – P. 702–707.

7. Moore J.H., Williams S.W. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension // Ann. Med. – 2002. – Vol. 34. – P. 88–95.

8. Nakayama T., Yamamoto T. Comparison between essential hypertension and pregnancy-induced hypertension: a genetic perspective // Endocrine Journal. – 2009. – Vol. 56, №8. – P. 921–934.

9. Role of C825T polymorphism of GNBeta3 gene in preeclampsia / X. Tang, M. Guraju, G.P. Rajendran et al. // Hypertens. Pregnancy. – 2006. – Vol. 25, №2. – P. 93–101.

10. Role of inflammatory cytokines and eNOS gene polymorphism in pathophysiology of preeclampsia / A. Singh, D. Sharma, C. Raghunandan et al. // Am. J. Reprod. Immunol. – 2010. – Vol. 63, №3. – P. 244–251.

Рецензенты:

Мазур Е.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии и профессиональных заболеваний ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздравсоцразвития России», г. Тверь;
 Петрова М.Б., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздравсоцразвития России», г. Тверь.

Работа поступила в редакцию 21.09.2011.