

*На правах рукописи*

**ДЕМИН**  
**Григорий Сергеевич**



**АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ «СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ»  
И «ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ» С РАЗВИТИЕМ ПРЕЭКЛАМПСИИ**

03.00.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2008

Работа выполнена в Лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН

Научный руководитель: доктор биологических наук  
**Иващенко Татьяна Эдуардовна**  
ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,  
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук, доцент  
**Спивак Ирина Михайловна**  
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор  
**Носиков Валерий Вячеславович**  
Государственный научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных микроорганизмов,  
Москва

Ведущая организация: ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН,  
Санкт-Петербург

Защита состоится « 21 » марта 2008 г. в 15 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4  
Электронный адрес: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан « 13 » февраля 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Каминская Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Преэклампсия или гестоз занимает лидирующие позиции в патологии беременности и является одной из наиболее актуальных проблем современного акушерства. В настоящее время ее частота колеблется от 7% до 22% (Кулаков, Мурашко, 1998, Pirkin, 1999, Клинические..., 2005). В структуре причин материнской смертности в Российской Федерации преэклампсия, стабильно занимая 3-е место, составляет от 11,8% до 14,8% и остается основной причиной заболеваемости и смертности новорожденных (Савельева и др., 1992, Зильбер и др., 1997, Сидорова, Калюжина, 1998). По данным ВОЗ, у каждого пятого ребенка, родившегося от матери с преэклампсией, в той или иной степени нарушено физическое и психоэмоциональное развитие, значительно выше уровень заболеваемости в младенческом и раннем детском возрасте (Bussolino et al., 1980, Duley et al., 2004).

Причины развития преэклампсии зависят от многих факторов и до конца не изучены. Несмотря на многочисленные исследования, во всем мире до сих пор нет единого мнения о причинах возникновения преэклампсии. Несомненно, что заболевание непосредственно связано с беременностью, так как прекращение последней всегда способствует выздоровлению (Клинические..., 2005). Существует несколько взаимодополняющих гипотез развития преэклампсии, к ним относятся неврогенная, почечная, плацентарная, иммунологическая и генетическая теории (Абрамченко и др., 1995, Зильбер и др., 1997, Серов и др., 1997, Клинические..., 2005, Chappell, Morgan, 2006). Наиболее обоснованной считается роль дисфункции эндотелиальных клеток в генезе преэклампсии (Клинические..., 2005, Chappell, Morgan, 2006).

Согласно данным исследований последних лет, генетическая компонента заболевания может составлять до 50% всех факторов, влияющих на развитие преэклампсии (Cnattingius et al., 2004).

Поиск молекулярных маркеров, ассоциированных с развитием преэклампсии – важнейшая задача для понимания патогенеза, лечения и профилактики заболевания. Однако необходимо отметить, что результаты, полученные разными исследователями при изучении генетической предрасположенности к преэклампсии, зачастую противоречивы. Кроме того, пока еще не разработан системный подход при исследовании данной патологии. Принимая во внимание приоритетность эндотелиальной дисфункции в генезе преэклампсии, значение артериального давления как основного диагностического признака заболевания и данные предыдущих исследований по генетике данной патологии, мы предположили, что именно существование полиморфизма генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции»

во многом сможет объяснить очевидные индивидуальные различия в отношении происхождения и течения заболевания.

Таким образом, выявление взаимосвязи между дисфункцией эндотелия, полиморфизмом генов, ответственных за его функционирование, у больных с преэклампсии поможет приблизить к пониманию роли генетического полиморфизма в патогенезе заболевания.

Работа была поддержана грантами Администрации Санкт-Петербурга (M02-2.6Д-726, M03-2.6Д-233, M05-2.6К-435), РФФИ (05-04-58595-з), CRDF (ST-012-0), INTAS (05-109-5066).

**Цель и задачи исследования.** Оценить роль полиморфизма генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» в развитии преэклампсии в двух этнически различающихся популяциях.

Достижение этой цели предусматривало решение следующих задач:

1. Разработать систему молекулярных маркеров для анализа полиморфизма генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции».
2. С использованием разработанной системы определить частоты аллельных вариантов генов «сосудистой системы» – *ACE* (I/D) и *PAII* (4G/5G) и «эндотелиальной дисфункции» – *NOS1* (AAT)<sub>n</sub>, *NOS2* (CCTTT)<sub>n</sub>, *NOS3* (894G>T и 4a/4b) и *TNF-α* (–308G>A и –238G>A) у больных с преэклампсией и в контрольной группе в популяционных выборках из Северо-Западного региона России и Северо-Западного региона Греции.
3. Провести сравнительный анализ частот аллельных вариантов генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» в контрольных группах из России и Греции и группах больных с преэклампсией из двух стран и изучить ассоциацию проанализированных молекулярных маркеров со степенью тяжести заболевания, а также с клиническими и биохимическими параметрами у больных с преэклампсией в двух разных популяциях (Россия и Греция).
4. Определить вклад генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» в развитие преэклампсии с учетом межпопуляционных различий.
5. На основе полученных данных разработать молекулярно-биологическую модель развития преэклампсии при наличии молекулярных маркеров риска заболевания.

**Научная новизна работы.** Впервые изучены особенности аллельного полиморфизма генов «сосудистой системы» – *ACE* (I/D) и *PAII* (4G/5G) и «эндотелиальной дисфункции» – *NOS1* (AAT)<sub>n</sub>, *NOS2* (CCTTT)<sub>n</sub>, *NOS3* (894G>T и 4a/4b) и *TNF-α* (–308G>A и –238G>A) при преэклампсии в популяциях России и Греции, а также проанализирована ассоциация

аллельных вариантов изученных генов с тяжестью течения заболевания. Разработаны новые варианты идентификации полиморфных аллелей ряда генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции». Впервые показаны достоверные отличия, как между контрольными группами, так и между группами больных с преэклампсией из России и Греции по частотам аллельных вариантов ряда изученных генов. Впервые выявлены ассоциации между развитием преэклампсии, степенью тяжести заболевания и полиморфизмом генов *NOS1* и *NOS3* у больных с преэклампсией из Северо-Западного региона России. Впервые показана ассоциация развития преэклампсии, степени тяжести заболевания и полиморфизма генов *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *TNF-α* у больных с преэклампсией из Северо-Западного региона Греции. Впервые показан синергический (аддитивный) эффект различных сочетаний «функционально неблагоприятных» генотипов по генам «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» при развитии и прогрессировании преэклампсии в популяционных выборках из России и Греции. Впервые продемонстрирована ассоциация некоторых аллельных вариантов генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с изменчивостью клинически значимых признаков у больных с преэклампсией. Впервые предложена молекулярно-биологическая модель развития преэклампсии при наличии молекулярных маркеров риска заболевания.

**Практическая значимость.** Анализ аллельного полиморфизма генов «сосудистой системы» – *ACE* (I/D) и *PAI1* (4G/5G) и «эндотелиальной дисфункции» – *NOS1* (AAT)<sub>n</sub>, *NOS2* (CCTTT)<sub>n</sub>, *NOS3* (894G>T и 4a/4b) и *TNF-α* (–308G>A и –238G>A) можно рекомендовать в качестве прогностического теста для оценки риска развития преэклампсии с учетом межпопуляционных различий.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработана система идентификации молекулярных маркеров риска развития преэклампсии.
2. Контрольные группы и группы больных с преэклампсией из России и Греции отличаются по частотам аллелей и генотипов по генам «эндотелиальной дисфункции» (гены *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *TNF-α*).
3. Генотипы *NOS1* 10/15 и *NOS3* 4a/4b, а также сочетание определенных генотипов по генам «эндотелиальной дисфункции» (*NOS1* 15/- + *NOS3* 4a/-) ассоциированы с развитием преэклампсии в популяции Северо-западного региона России.
4. Носительство сочетанного генотипа *NOS3* 4b/4b + *PAI1* 4G/- увеличивает риск развития преэклампсии в популяции Северо-западного региона Греции.

5. Выявлена ассоциация определенных сочетаний генотипов по генам «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с развитием легкой и тяжелой форм преэклампсии в популяциях из России и Греции.

6. Выявленная ассоциация «функционально неблагоприятных» генотипов по генам «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с преэклампсией подтверждает роль данных метаболических систем (сосудистой и эндотелия) в развитии заболевания.

7. Аллельные варианты генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» ассоциированы с рядом клинических и биохимических параметров у больных с преэклампсией.

8. Предложена молекулярно-биологическая модель развития преэклампсии при наличии молекулярных маркеров риска заболевания.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на 12-й и 13-й международных междисциплинарных конференциях молодых ученых (Санкт-Петербург, 2001, 2006), конференции «Молодые биологи Санкт-Петербурга – 300-летию города» (Санкт-Петербург, 2003), Всероссийской конференции Научно-образовательных центров (Казань, 2004), III Международной anti-ageing конференции «Медицина долголетия и качества жизни» (Москва, 2007), 3-й ежегодной встрече Международного общества по фармакогеномике в 2004 году (Санторини, Греция), на Европейском конгрессе по генетике человека в 2005 году (Прага, Чехия).

Диссертация апробирована на научных семинарах Лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека ГУ научно-исследовательского института акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта и Лаборатории репродуктивной генетики человека Университета г. Иоаннина (Греция).

Работа была поддержана грантами Администрации Санкт-Петербурга (M02-2.6Д-726, M03-2.6Д-233, M05-2.6К-435), РФФИ (05-04-58595-з), CRDF (ST-012-0), INTAS (05-109-5066).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 22 работы.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 202 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Библиографический указатель включает 259 источников, из них 216 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 34 таблицами и 51 рисунком, содержит 3 приложения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика исследуемых групп.** В настоящей работе проведено обследование 317 человек. В группы больных вошли женщины, проходящие лечение по поводу чистой формы преэклампсии (без сопутствующих хронических заболеваний) в стационаре Института Акушерства и Гинекологии им. Д.О. Отта (47 пациентов, Санкт-Петербург, Россия) или в стационаре Госпиталя при Университете г. Иоаннина (66 пациентов, Иоаннина, Греция). В контрольные группы (как из России – 102 пациента, так и из Греции – 102 пациента) были включены недавно родившие женщины, у которых не было преэклампсии в анамнезе и отсутствовали хронические заболевания. После анализа клинической картины заболевания больные были сгруппированы в подгруппы с легкой и тяжелой формами преэклампсии (в зависимости от величины артериального давления, уровня протеинурии, а также дополнительных осложнений).

**Экстракция геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови.** Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови проводили в соответствии с методикой приведенной в руководстве Сэмбрук и др. с некоторыми модификациями (Sambrook et al., 1989).

**Проведение полимеразной цепной реакции.** Нуклеотидные последовательности искомым фрагментов генов выбирали из интернет-баз «Nucleotide» и «Ensembl» (США). Праймеры, необходимые для проведения ПЦР этих фрагментов, подбирали с использованием программы «Oligo v.6.31» (Molecular Biology Insights Inc., США).

Во всех группах изучены особенности генетического полиморфизма 2 генов «сосудистой системы»: *ACE* (I/D), *PAII* (4G/5G) и 4 генов «эндотелиальной дисфункции»: *NOS1* (AAT)<sub>n</sub>, *NOS2* (CCCTT)<sub>n</sub>, *NOS3* (894G>T и 4a/4b) и *TNF-α* (-308G>A и -238G>A). Характеристика исследованных аллельных вариантов генов приведена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика исследованных генов и их аллельных вариантов

Ген, локализация	Название белкового продукта гена	Полиморфизм	Эндонуклеаза
<i>ACE</i> (17q23)	Ангиотензин-превращающий фермент	del/ins Alu-повтора 287 п.н. в 16 интроне (I/D)	
<i>PAII</i> (7q21-22)	Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа	4 или 5 гуанинов в -675 положении (4G/5G)	BglI (Bsc4I)
<i>NOS1</i> (12q24)	Нейрональная NO-синтаза (NO-синтаза 1-го типа)	(AAT) <sub>n</sub> -повторы в 13 интроне	
<i>NOS2</i> (17q11)	Индукцибельная NO-синтаза (NO-синтаза 2-го типа)	(CCCTT) <sub>n</sub> -повторы в промоторной области	
<i>NOS3</i> (7q35-36)	Эндотелиальная NO-синтаза (NO-синтаза 3-го типа)	894 G>T (Glu298Asp)	MboI (KzoI)
		4 или 5 повторов 27 п.н. в 4 интроне (4a/4b)	
<i>TNF-</i> (6p21.3)	Фактор некроза опухоли альфа	-238G>A	MspI
		-308G>A	NcoI (BspI9I)

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили при помощи программируемых термоциклеров «ДНК-технология» (Москва) и «РТС-100» и «РТС-200» (MJ Research, США)

с использованием термофильной ДНК-полимеразы и специфических олигопраймеров. Определение аллельных вариантов генов *ACE*, *NOS1*, *NOS2* и *NOS3* (4a/4b полиморфизм) проводили методом ПЦР. Определение аллельных вариантов генов *PAII*, *NOS3* (894G>T полиморфизм) и *TNF*- проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом (табл. 1).

**Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции.** Гидролиз амплифицированных фрагментов ДНК проводился согласно рекомендациям фирм-изготовителей («Сибэнзим», Новосибирск; «NEB», США).

**Электрофорез и визуализация результатов.** Продукты амплификации и рестрикции разделяли в 6-10% неденатурирующем полиакриламидном (ПААГ) или 2-3% агарозном гелях, приготовленных на трис-боратном буфере, в аппарате для вертикального или горизонтального электрофореза, соответственно. ПААГ окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл), просматривали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе «Macrovue» («Pharmacia LKB», Великобритания) с использованием системы видео-гель-документации («Vilber Lourmat»). Результаты анализа с использованием агарозного геля фиксировали с помощью трансиллюминатора «Uvitec STX-20.M» системы видео-гель-документации («Kodak EDAS 290»). Первичную обработку изображений проводили в программе Kodak 1D v.3.6.4. (Scientific Imaging Systems, США).

**Статистическая обработка данных.** Определение достоверности различий между сравниваемыми группами или подгруппами по частотам генотипов и аллелей исследуемых генов производили с помощью критерия Фишера (F) или хи-квадрат ( $\chi^2$ ) по стандартной формуле с учетом поправки Йетса для парных сравнений и поправки Бонферрони для множественных сравнений с контрольной группой (Гланц, 1999). Для оценки различий значений биохимических или клинических параметров между носителями разных генотипов по исследуемым генам применялся U-критерий Манна-Уитни или t-критерий Стьюдента для независимых выборок (Реброва, 2003). Значение  $p < 0,05$  было принято как статистически значимое. Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программ Microsoft Excel 2002 SP-2 (Microsoft Corporation, США), STATISTICA v.6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, США) и GraphPad InStat v.3.05 (GraphPad Software Inc., California, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные литературы последних лет свидетельствуют о неуклонном росте частоты преэклампсии. Несмотря на стремительный прогресс современных медицинских технологий, в мире от преэклампсии ежегодно умирает до 50000 женщин (Khalil, Granger, 2002).



Необходимость разработки новых методик, направленных на раннее, досимптоматическое выявление беременных высокого риска развития преэклампсии с последующей профилактикой и соответствующим ведением беременности признается во всем мире.

На основе проведенного анализа зарубежной и отечественной литературы в рамках исследования молекулярных маркеров преэклампсии, наибольший интерес представляют аллельные варианты следующих генов: *ACE* (I/D), *PAII* (4G/5G), *NOS1* ((AAT)<sub>n</sub>-повторы), *NOS2* ((CCTTT)<sub>n</sub>-повторы), *NOS3* (894G>T и 4a/4b), *TNF-α* (-308G>A и -238G>A) (Warpeha et al., 1999, Mello et al., 2003, Serrano et al., 2004, Saarela et al., 2005, Wiwanitkit, 2006).

Для выбора нуклеотидных последовательностей и идентификации аллельных вариантов исследуемых генов были использованы следующие подходы: анализ данных литературы и поиск полиморфного участка ДНК в интернет-базах данных.

После идентификации полиморфизма для дальнейшего подбора праймеров мы использовали нуклеотидную последовательность в пределах 500 п.н. Последовательности праймеров выбирали с учетом того, что полученный ПЦР продукт должен обеспечивать специфичность и оптимальное количество наработки фрагмента. Иногда, в случаях однонуклеотидных замен в одном из праймеров создавался искусственный сайт рестрикции для определенной эндонуклеазы. Кроме того, большое значение имели размеры ПЦР-фрагментов в особенности для полиморфизма генов *NOS1* и *NOS2*, представленного высоко варьируемыми микросателлитными повторами.

Выбранные олигонуклеотиды не должны содержать высокостабильных вторичных структур типа «шпильки». Как известно, олигонуклеотиды, образующие внутренние вторичные структуры, могут амплифицироваться со значительно меньшей эффективностью и специфичностью. Соблюдение указанных принципов достигали путем варьирования длины олигонуклеотида и праймеров.

. Для определения аллелей I и D гена *ACE* использовали праймеры, описанные в статье С. J. Clark с соавторами (Clark et al., 2000).

*PAII*. Идентификацию аллелей 4G и 5G гена *PAII* проводили с помощью нового модифицированного подхода путем использования набора олигопраймеров, позволяющих создать искусственный сайт рестрикции для фермента Bsc4I (BglII). В данной методике использовали прямой праймер с одним неспаренным нуклеотидом (*PAII* F: 5'-CAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3') и обратный праймер (*PAII* R: 5'-GGCCCAACAGAGGACTCTTG-3'). При использовании модифицированного прямого праймера создавался сайт рестрикции для эндонуклеазы Bsc4I (BglII) для 5G аллели, но не для 4G аллели гена *PAII*. В отличие от предыдущих исследований данного полиморфизма

гена *PAII*, в которых использовался метод аллель-специфичной ПЦР, данный подход является более простым и удобным (Fabbro et al., 2003).

*NOS1*. Определение количества ААТ-повторов гена *NOS1* было упрощено за счет амплификации более коротких фрагментов ДНК с помощью разработки новых олигопраймеров.

*NOS2*. В связи с высокой вариабельностью количества ССТТТ-повторов (на настоящий момент описано около 15 аллелей) полиморфизма гена *NOS2* ранее определение числа данных повторов проводилось только с использованием дорогостоящих генетических анализаторов ABI Prism 310/3100 (Konno et al., 2001). В нашей работе путем использования различных маркеров молекулярного веса и новых праймеров идентификация аллелей (ССТТТ)<sub>n</sub>-полиморфизма гена *NOS2* стала возможной в 6%-ном ПААГ.

*NOS3*. Определение аллелей G и T (полиморфизм 894G>T), а также 4a и 4b (полиморфизм 4a/4b) проводили с использованием праймеров, приводящих к амплификации более коротких, по сравнению с ранее описанными, фрагментов ДНК, что упрощало проведение электрофоретического разделения продуктов ферментативного гидролиза и ПЦР (Tempfer et al., 2001b, Yoshimura et al., 2001).

*TNF*- . Для идентификации аллелей -308G, -308A, -238G и -238A гена *TNF*- использовали праймеры, описанные в статье С.Р. Day с соавторами (Day et al., 1998).

Оптимизация условий ПЦР проводилась путем варьирования временных и температурных параметров реакции, а также использованием различных концентраций MgCl<sub>2</sub> для обеспечения специфичности реакции. Электрофоретическое разделение фрагментов проводилось с использованием различных концентраций агарозного и полиакриламидного геля в зависимости от размеров и разницы в размерах между двумя аллельными вариантами ПЦР продуктов исследуемых участков генов.

Работа проводилась на двух этнически различных популяционных выборках – из Северо-западного региона России и Северо-западного региона Греции. В обеих странах были отобраны контрольная группа и группа больных с преэклампсией. В связи с возможностью существования генетической неоднородности между разными популяциями нами был проведен сравнительный анализ частот аллельных вариантов исследуемых генов между контрольными группами из России и Греции и между группами больных с преэклампсией из этих стран.

Согласно полученным результатам, группы контроля и группы больных разного этнического происхождения (из России и Греции) отличались по частотам определенных генотипов и (или) аллелей генов *NOS2*, *NOS3* (полиморфизм 894G>T) и *TNF*- (полиморфизм -308G>A).

Кроме того, контрольные группы из двух стран отличались по частотам аллельных вариантов генов *NOS1* и *TNF*- (полиморфизм –238G>A), а группы больных – по гену *NOS3* (полиморфизм 4a/4b). При изучении полиморфизма генов «сосудистой системы» (*ACE* и *PAII*) нами не было выявлено достоверных отличий между двумя выборками из популяций двух стран.

Согласно нашим результатам и по данным литературы, при выявлении достоверных различий между выборками из разных стран в частотах аллельных вариантов изучаемых генов не представляется корректным объединять их в общую группу для увеличения статистической значимости результатов.

Так как нами были выявлены достоверные различия по частотам аллельных вариантов ряда генов между контрольными группами из России и Греции и группами больных с преэклампсией из двух стран, дальнейший сравнительный анализ между больными и контролем проводили отдельно в популяциях из России и из Греции.

Достоверные отличия по частотам генотипов и аллелей исследуемых генов были показаны только для русской популяции. Частота генотипа 4a/4b по гену *NOS3* была выше у больных с преэклампсией, чем в контроле, а частота аллели (AAT)<sub>14</sub> по гену *NOS1* была выше в контрольной группе (рис. 1).

При сравнительном анализе частот генотипов по исследуемым генам между контрольной группой и больными с разной степенью тяжести преэклампсии в русской популяции выявлено, что повышенная частота генотипа 4a/4b по гену *NOS3* в группе больных с преэклампсией по сравнению с контролем, по-видимому, обусловлена еще более высокой частотой данного генотипа у больных с легкой формой заболевания, тогда как у больных с тяжелой преэклампсией его частота была сравнима с таковой в контрольной группе (рис. 2).

Данные литературы по изучению ассоциации 4a/4b полиморфизма гена *NOS3* с различными заболеваниями достаточно противоречивы. С одной стороны, носительство аллели 4a считается фактором риска многих сосудистых заболеваний, и в том числе ряда осложнений при беременности (Wang et al., 1996, Ichihara et al., 1998, Tempfer et al., 2001a, Tempfer et al., 2001b). С другой стороны, данные по ассоциации другой аллели (4b) со сниженным уровнем NO, который является вазодилатирующим агентом, вносят несоответствие в механизм развития патологии (Wang et al., 1997). Кроме того, в некоторых исследованиях указывается на ассоциацию с преэклампсией аллели 4b, а не 4a (Mozgovaia et al., 2002, Serrano et al., 2004). Подобное противоречие может быть объяснено, во-первых, межэтническими различиями, так как перечисленные работы выполнялись на выборках из разных популяций.

Во-вторых, аллель 4a может быть сцеплена с другим генетическим маркером, который в действительности ассоциирован с заболеванием.

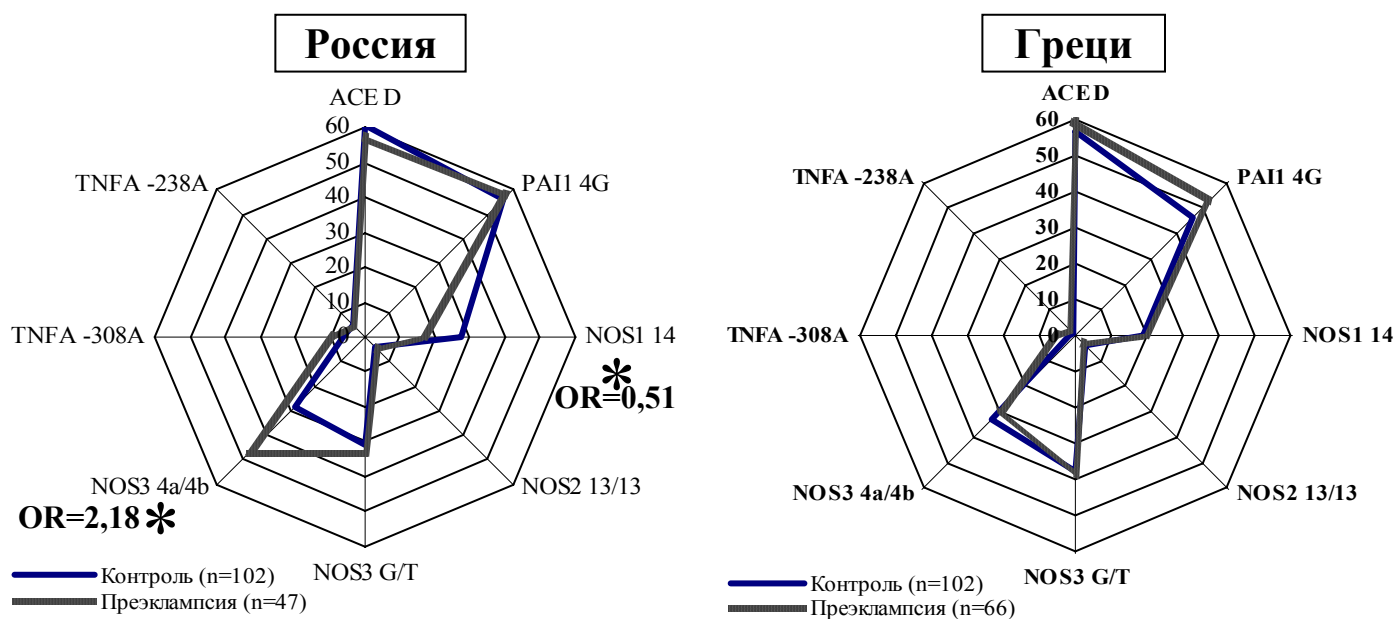


Рис. 1. Частоты некоторых генотипов и аллелей по изученным генам у больных с преэклампсией и в контрольной группе в популяциях из России и Греции.  
\* -  $p < 0,05$

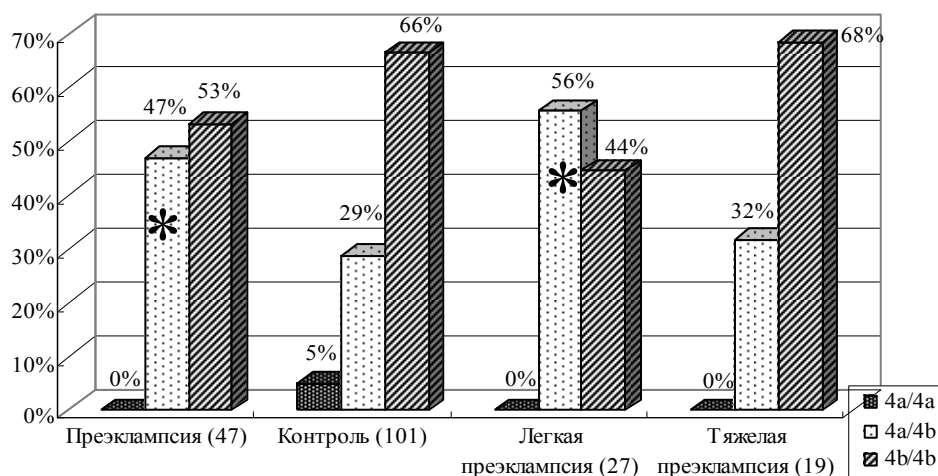


Рис. 2. Частоты генотипов по гену *NOS3* (4a/4b полиморфизм) в подгруппах больных с преэклампсией и в контрольной группе в популяции из России.  
\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

При сравнении подгрупп больных из Северо-западного региона Греции между собой нами было выявлено достоверное повышение частоты генотипа G/T по гену *NOS3* в подгруппе больных с легкой формой преэклампсии по сравнению с тяжелой (56% и 32%, соответственно). Учитывая отсутствие различий по частотам аллелей и генотипов данного полиморфизма между контрольной группой и больными, можно предположить, что сам по себе он не влиял на развитие заболевания, а лишь определял степень тяжести преэклампсии (рис. 3).

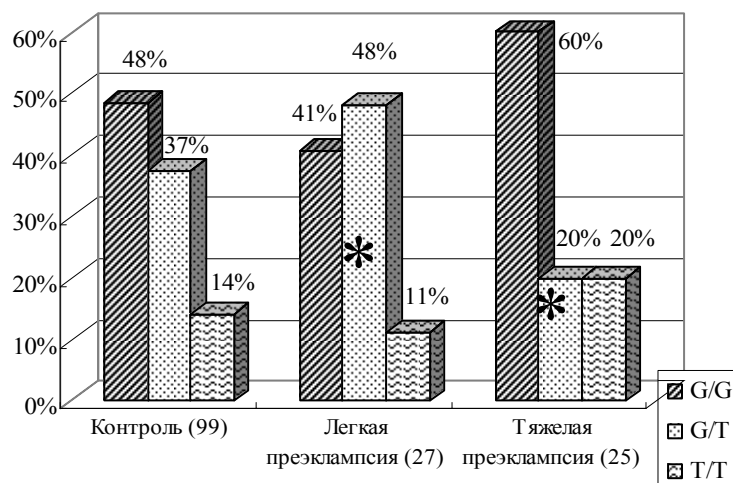


Рис. 3. Частоты генотипов по гену *NOS3* (894G>Т полиморфизм) в подгруппах больных с преэклампсией и в контрольной группе в популяции из Греции.

\* -  $p < 0,05$

Анализ частот полиморфного микросателлита  $(AAT)_n$  гена *NOS1* гена позволил выявить статистически значимые различия между выборками больных с преэклампсией и контролем, как для русской, так и для греческой популяции. Для греческой популяции был показан протективный эффект аллели  $(AAT)_{16}$ , частота которой была ниже у больных с легкой формой преэклампсии (0,0%), чем в контрольной группе (7,1%). Частота аллели  $(AAT)_{15}$  была выше в группе больных, чем в контроле (16,3% и 9,4%, соответственно), однако различия не были статистически значимы, а частота генотипа  $(AAT)_{10}/(AAT)_{15}$  была достоверно выше как группе больных (19,6%), так и в подгруппе с легкой формой преэклампсии (22,2%) по сравнению с контролем (6,9%) (Северо-запад России). Таким образом, для одних аллельных вариантов гена *NOS1* был выявлен протективный эффект по отношению к преэклампсии, а для других – предрасполагающий к развитию этой формы заболевания. При анализе литературы нами не было найдено данных об изучении полиморфизма гена *NOS1* в связи с развитием эндотелиальной дисфункции и сосудистых заболеваний.

При сравнительном анализе частот полиморфного микросателлита  $(CSTTT)_n$  гена *NOS2* были показаны статистически значимые различия между подгруппами больных с преэклампсией и контролем только для греческой популяции. Частота генотипа  $(CSTTT)_9/(CSTTT)_{10}$  по гену *NOS2* была достоверно выше в подгруппе больных с легкой формой преэклампсии (7,4%), чем в контрольной группе (0,0%). При этом частота аллели  $(CSTTT)_{10}$  была достоверно выше у больных с легкой формой заболевания (29,6%), чем с тяжелой (10,0%).

Полиморфизм  $(CSTTT)_n$  промоторной области гена *NOS2* связан с различным уровнем индукции транскрипции в ответ на действие медиаторов воспаления. При этом

прогрессирующее возрастание активности NOS2 коррелирует с увеличением количества ССТТТ-повторов (Warpeha et al., 1999). Наличие аллели (ССТТТ)<sub>10</sub> гена NOS2, ассоциированное с более низким уровнем фермента NOS2, может приводить к снижению индукции синтеза NO (Murray et al., 1991, Snyder, 1993, Cabrera, Bohr, 1995). Можно предположить, что на фоне снижения индукции синтеза оксида азота, обладающего выраженным противовоспалительным и эндотелий-релаксирующим эффектом, происходит развитие легкой формы преэклампсии.

При сравнении частот аллелей гена *TNF-α* между подгруппами больных с преэклампсией и контрольной группой из греческой популяции показано, что частота аллели –308А в 5 раз выше в подгруппе больных с тяжелой степенью преэклампсии (8,0%) по сравнению с контролем (1,7%) (рис. 4).

В исследованиях британских ученых показано, что уровень экспрессии гена выше у индивидуумов гомозиготных по редкой аллели, чем лиц с генотипом G/G, а у гетерозигот наблюдается промежуточный уровень мРНК *TNF-α* (Wilson et al., 1992).

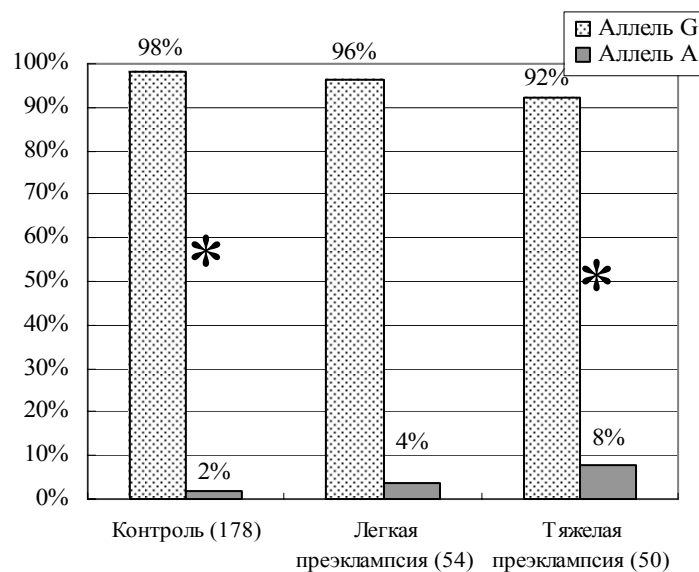


Рис. 4. Частоты аллелей гена *TNF-α* (–308 G>A полиморфизм) в подгруппах больных с преэклампсией и в контрольной группе в популяции из Греции.

\* - p<0,05

В нашей работе выявлена ассоциация аллели –308А гена *TNF-α* с развитием, по крайней мере, тяжелых форм преэклампсии в популяции Северо-западного региона Греции. Аналогичные результаты были получены для популяции из Великобритании (Wilson et al., 1992, Chen et al., 1996). Факт более высокой частоты аллели–308А гена *TNF-α* у больных с преэклампсией хорошо согласуется с ранее известными представлениями о патогенезе заболевания, в том числе с данными биохимических, генетических и клинических исследований. На генетическом уровне показана ассоциация аллели –308А с повышенной

экспрессией гена *TNF-α* (Wilson et al., 1992, Chen et al., 1996). На биохимическом уровне выявлено увеличение содержания данного цитокина у матерей и в плацентах с преэклампсией по сравнению с нормальной физиологической беременностью (Wang, Walsh, 1996, Visser et al., 2002). И наконец, на клиническом уровне существует теория о том, что нарушение плацентации при беременности может приводить к избыточному синтезу *TNF-α*, вызывающему системное повреждение сосудов материнского эндотелия и развитие преэклампсии (Vince et al., 1995, Kilpatrick, 1999).

Полученные нами результаты свидетельствуют о важной роли определенных аллельных вариантов некоторых генов «эндотелиальной дисфункции» в возникновении и прогрессировании преэклампсии. Однако в популяциях из разных стран (России и Греции) развитие заболевания может быть связано с различными генетическими маркерами. Так, для Северо-западного региона России нами выявлены ассоциации между развитием преэклампсии, а также ее форм, с полиморфизмом генов *NOS1* и *NOS3*. В то же время в популяционной выборке Северо-запада Греции помимо указанных двух генов нами обнаружена ассоциация заболевания с полиморфизмом генов *NOS2* и *TNF-α*. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что развитие преэклампсии ассоциировано с генетическими маркерами дисфункции эндотелия вне зависимости от этнического происхождения пациента. Однако спектр аллельных вариантов генов «эндотелиальной дисфункции», ассоциированных с развитием преэклампсии, отличается в разных популяциях.

В результате исследования аллельных вариантов генов «эндотелиальной дисфункции» и «сосудистой системы» выявлены ассоциации «функционально неблагоприятных» генотипов и аллелей с развитием преэклампсии и ее тяжестью. Также выявлены некоторые различия в частотах генотипов в группах и подгруппах пациентов, которые, однако, не являлись статистически значимыми при анализе отдельных аллельных вариантов. Поскольку в развитие мультифакториальных заболеваний вовлечены в большей степени не единичные гены, а целые группы, и, как правило, некоторые аллельные варианты вносят свой вклад лишь в сочетании с другими генами, мы провели сравнительный анализ сочетаний «функционально неблагоприятных» и «протективных» генотипов в контрольной группе, в группе и подгруппах больных с преэклампсией.

В популяции из Северо-западного региона России частота сочетанного генотипа по двум генам NO-синтаз (*NOS1 15/- + NOS3 4a/-*) была достоверно выше у больных с преэклампсией по сравнению с контролем (17,4% и 4,0%, соответственно). Рассчитанный коэффициент соотношения шансов показал, что риск развития преэклампсии у носителей генотипа *NOS1*

15/- + NOS3 4a/- увеличивается в 5 раз (OR=5,05; 95% CI: 1,79-14,26). Проведенный анализ сочетаний «функционально неблагоприятных» генотипов у больных с преэклампсией и в контрольной группе из Северо-западного региона Греции выявил статистически значимое увеличение частоты сочетанного генотипа NOS3 4b/4b + PAI1 4G/- в группе больных по сравнению с контролем (56,9% и 40,9%, соответственно). Рассчитанный коэффициент соотношения шансов показал повышение риска развития преэклампсии у носителей генотипа NOS3 4b/4b + PAI1 4G/- почти в 2 раза (OR=1,91; 95% CI: 1,06-3,45) (табл. 2).

Таблица 2. Риск развития преэклампсии у носителей некоторых сочетанных генотипов по исследуемым генам в популяциях России и Греции

Генотип	Россия		Греция	
	OR	95% CI	OR	95% CI
NOS1 15/- + NOS3 4a/-	<b>5,05*</b>	<b>1,79-14,26*</b>	2,08	0,93-5,37
NOS3 4b/4b + PAI1 4G/-	0,61	0,30-1,22	<b>1,91</b>	<b>1,06-3,45</b>

\* - **Жирным** выделены значения OR и CI, полученные для  $p < 0,05$ .

Для ряда сочетаний генотипов была выявлена ассоциация с развитием определенной формы заболевания. Частота сочетанного генотипа по двум генам NO-синтаз (NOS1 15/- + NOS3 4a/-) увеличивалась в ряду контроль (4,0%) – легкая преэклампсия (11,1%) – тяжелая преэклампсия (22,2%). Риск развития легкой формы преэклампсии в русской популяции был повышен у носителей генотипа NOS3 4a/- в сочетаниях с определенными генотипами по генам «сосудистой системы», такими как ACE D/- или PAI 4G/- (табл. 3).

Таблица 3. Риск развития легкой формы преэклампсии у носителей некоторых сочетанных генотипов по исследуемым генам в популяциях России и Греции

Генотип	Россия		Греция	
	OR	95% CI	OR	95% CI
NOS3 4a/- + ACE D/-	<b>2,31*</b>	<b>1,02-5,57*</b>	0,71	0,35-1,43
NOS3 4a/- + PAI1 4G/-	<b>3,23</b>	<b>1,47-7,10</b>	0,68	0,32-1,45
NOS3 T/T + NOS3 4b/-	1,23	0,52-2,92	<b>6,27</b>	<b>2,59-15,14</b>
NOS2 9/- + NOS3 4b/-	0,91	0,10-8,52	<b>5,22</b>	<b>1,09-24,97</b>
NOS2 9/- + PAI1 4G/-	1,72	0,15-19,77	<b>12,00</b>	<b>1,19-120,50</b>
NOS2 10/- + NOS1 <12/<12	0,91	0,10-8,52	<b>3,41</b>	<b>1,01-11,52</b>

\* - **Жирным** выделены значения OR и CI, полученные для  $p < 0,05$ .

Частота сочетанного генотипа NOS2 12/12 + PAI1 4G/4G была в 5 раз выше у больных с тяжелой преэклампсией по сравнению с контролем (16,7% и 3,2%, соответственно). В связи с полученными данными следует отметить, что анализ аллельных вариантов генов *E*, *PAI1* и *NOS2* по отдельности не показал ассоциации между «функционально неблагоприятными» генотипами и развитием преэклампсии или ее форм в русской популяции.



При изучении греческой популяции нами показано, что носительство хотя бы одного из следующих генотипов – NOS3 T/T + NOS3 4b/-, NOS2 9/- + NOS3 4b/-, NOS2 9/- + PAI1 4G/- и NOS2 10/- + NOS1 <12/<12 увеличивает риск развития легкой формы преэклампсии по сравнению с контролем. Причем при сочетании T/T + 4b/- по гену *NOS3* риск увеличивался более чем в 6 раз (OR=6,27; 95% CI: 2,59-15,14) (табл. 3).

При анализе частот генотипов по генам «сосудистой системы» было показано, что риск развития тяжелой формы преэклампсии повышен при сочетании определенных аллельных вариантов (генотип ACE D/- + PAI1 4G/-), тогда как по отдельности не было показано вклада полиморфизма генов *ACE* и *PAI1* в развитие патологии в греческой популяции (табл. 4).

Таблица 4. Риск развития тяжелой формы преэклампсии у носителей некоторых сочетанных генотипов по исследуемым генам в популяциях России и Греции

Генотип	Россия		Греция	
	OR	95% CI	OR	95% CI
NOS1 15/- + NOS3 4a/-	<b>6,86*</b>	<b>2,22-21,22*</b>	1,98	0,54-7,20
NOS2 12/12 + PAI1 4G/4G	<b>6,13</b>	<b>1,13-33,28</b>	0,41	0,02-7,82
ACE D/- + PAI1 4G/-	1,35	0,62-2,94	<b>2,75</b>	<b>1,04-7,28</b>

\* - **Жирным** выделены значения OR и CI, полученные для  $p < 0,05$ .

Несмотря на существование межэтнических различий по генетическим маркерам преэклампсии и ее форм, можно предложить механизм аддитивного взаимодействия метаболитов, кодируемых исследуемыми генами, при сочетании «функционально неблагоприятных» генотипов по генам «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с учетом патогенеза данного заболевания.

Повышение риска развития эндотелиальной дисфункции при сочетании «функционально неблагоприятных» аллельных вариантов различных генов NO-синтаз можно объяснить следующим образом: во-первых, сам механизм синтеза оксида азота одинаков у всех трех изоформ NOS (Forstermann et al., 1994, Журавлева и др., 1997). Соответственно, можно предположить, что снижение уровня экспрессии генов *NOS* в равной степени может приводить к уменьшению уровня оксида азота и, следовательно, к развитию дисфункции эндотелия. Кроме того, показано, что все три гена экспрессируются в эндотелии, и таким образом при увеличении числа «функционально неблагоприятных» генетических вариантов (то есть связанных со снижением уровня NO, пониженной экспрессией гена или ассоциированных с различными сосудистыми патологиями) в различных генах NO-синтаз можно прогнозировать усиление эндотелиальной дисфункции, которое впоследствии может выражаться в развитии преэклампсии или ее форм (Bachmann, Mundel, 1994, Forstermann et al., 1994). К сожалению, при анализе литературы нам не удалось обнаружить работ, в которых был проведен анализ сочетаний аллельных вариантов разных генов *NOS*. Вместе с

тем, следует отметить, что полученные нами данные по значительному увеличению риска развития легкой формы преэклампсии у носителей сочетанного генотипа T/T + 4b/- по гену *NOS3* полностью согласуются с исследованием испанских ученых, в котором был выявлен ассоциированный с преэклампсией «T - 4b» гаплотип по гену *NOS3* (Serrano et al., 2004).

Аддитивное взаимодействие аллельных вариантов генов *ACE* (D/-) и *PAII* (4G/-), ассоциированное с повышением риска развития тяжелой преэклампсии во многом объясняется функциональными особенностями данных аллельных вариантов и взаимодействием продуктов генов *ACE* и *PAII*. Полиморфизм гена *ACE*, представляющий собой отсутствие (аллель D) или наличие (аллель I) Alu-повтора в 16-м интроне гена связан с уровнем ангиотензин-превращающего фермента (продукт гена *ACE*) в сыворотке крови, и, таким образом, является функционально значимым. При этом фенотипически по отношению к уровню ACE, аллели взаимодействуют по принципу неполного доминирования, то есть у индивидуумов, гомозиготных по D аллели, содержание АПФ почти в два раза выше, чем у гомозиготных по I аллели и имеет среднее значение у гетерозиготных – I/D генотип (Rigat et al., 1990, Tiret et al., 1992). При исследовании полиморфизма 4G/5G гена *PAII* показано, что аллель 5G коррелирует со снижением уровня экспрессии гена. Этот факт связан с тем, что при наличии 5 гуанинов помимо сайта связывания активатора (как в случае аллели 4G) образуется сайт связывания для репрессора транскрипции (Dawson et al., 1993, Eriksson et al., 1995). Показана ассоциация между 4G/4G генотипом и увеличением PAII в плазме крови (Margaglione et al., 1997). Таким образом, можно предположить, что именно повышение уровня соответствующих белковых продуктов, ассоциированное с «функционально неблагоприятными» аллельными вариантами генов *ACE* и *PAII*, приводит к развитию тяжелой преэклампсии. Продуцируемый под воздействием ACE, ангиотензин II, трансформируясь в ангиотензин IV, взаимодействует с рецепторами эндотелиоцитов и стимулирует продукцию PAII. Ридкер с соавторами изучали влияние инфузии различных доз ангиотензина II на плазменный уровень PAII у больных гипертонической болезнью и здоровых добровольцев и обнаружили достоверное дозозависимое повышение PAII в плазме в ответ на инфузию в обеих группах (Ridker et al., 1993). Показано, что блокада ACE увеличивает продукцию плазминогена в культуре эндотелиальных клеток (Bell, 1992). ACE может оказывать протромботическое действие, увеличивая экспрессию PAII и подавляя продукцию тканевого активатора плазминогена (Vaughan, 1997). Таким образом, повышенный риск развития тяжелой преэклампсии при носительстве «функционально неблагоприятного» сочетанного генотипа ACE D/- + PAII 4G/- по генам «сосудистой системы» обусловлен функциональными особенностями данных аллельных вариантов и

синергичным взаимодействием продуктов генов *ACE* и *PAII*, приводящих к развитию эндотелиальной дисфункции.

В популяционной выборке из Северо-запада России сочетания генотипов по ряду исследованных генов ассоциированы с развитием преэклампсии. При этом наличие сочетанного генотипа NOS1 15/- + NOS3 4a/- ассоциировано с повышением, а генотипа NOS1 14/- + PAI1 5G/- – со снижением риска развития и прогрессирования данной патологии. В то же время, другие сочетания генотипов ассоциированы только с определенной формой преэклампсии (легкой или тяжелой). В популяции из Северо-западного региона Греции развитие преэклампсии, по-видимому, обусловлено одними сочетаниями аллельных вариантов исследуемых генов, а прогрессирование заболевания – другими. Примечательно, что развитие легкой формы заболевания было ассоциировано в основном с различными комбинациями генотипов всех трех генов NO-синтаз, а тяжелая преэклампсия чаще развивалась у лиц с сочетанием «функционально неблагоприятных» аллельных вариантов генов «сосудистой системы».

Наряду с большим количеством исследований, посвященных поиску ассоциации генетических маркеров с развитием преэклампсии, при анализе литературы не найдено работ по изучению ассоциации полиморфизма генов с патогенетически значимыми показателями, отражающими функционирование почек, печени и других органов при этом заболевании.

В нашей работе выявлена ассоциация определенных аллельных вариантов генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с некоторыми клиническими и биохимическими параметрами у больных с преэклампсией.

Показано, что для носителей аллели D и/или генотипа D/D по гену характерно изменение значений ряда биохимических показателей, связанных с функцией почек и печени. Так, об измененной инфильтрации в почках может свидетельствовать повышение уровня мочевины и общего белка в сыворотке крови, а повышение общего билирубина и сахара в крови может отражать нарушение функционирования печени. Эти патологические изменения характерны для прогрессирующей преэклампсии (Ариас, 1989, Серов и др., 1997, Нагнибеда, Павлова, 1998).

Для пациенток с преэклампсией, гетерозиготных или гомозиготных по аллели 4G гена *PAII*, отмечено повышение уровня биохимических маркеров почечной дисфункции (креатинина и мочевины). Кроме того, у лиц с данными генотипами отмечалось повышение скорости оседания эритроцитов и содержания лейкоцитов, что может свидетельствовать о воспалительном процессе при прогрессировании заболевания (Шарабчиев, Дудина, 2004).

В группе больных с преэклампсией у женщин с генотипом 4b/4b по гену *NOS3* был повышен уровень белка в моче и снижен тромбоцит в крови, а значения веса, индекса массы тела и шкалы Апгар у детей этих пациенток были ниже, чем у лиц с генотипом 4a/4b.

У носителей генотипа G/G по гену *TNF-α* (-238G>A полиморфизм) уровень мочевины и калия в сыворотке крови достоверно выше, чем у лиц с генотипом A/G, что может отражать патогенетические процессы в почках при преэклампсии (Ариас, 1989, Серов и др., 1997, Нагнибеда, Павлова, 1998).

Таким образом, анализ ассоциации полиморфизма генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» с клинически и патогенетически значимыми признаками преэклампсии показал, что определенные аллельные варианты исследуемых генов играют модифицирующую роль в изменчивости комплекса параметров, которые определяют течение и прогрессирование заболевания.

Исходя из полученных результатов, можно предложить гипотетическую схему развития преэклампсии (рис. 5). При нормально протекающей беременности при инвазии цитотробласта в спиральные артерии матери происходит трансформация последних в сравнительно крупные сосуды, обеспечивающие потребности растущего плода. При преэклампсии процессы плацентации нарушены и диаметр спиральных артерий матери слишком узкий для обеспечения адекватного обмена между матерью и плодом.

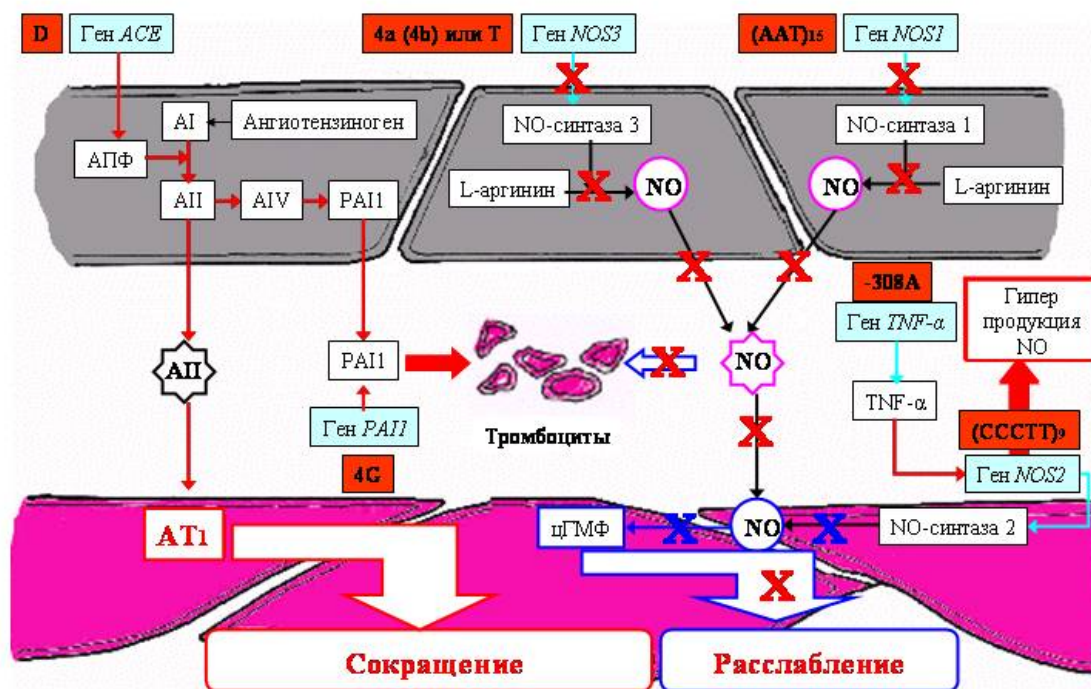


Рис. 5. Гипотетическая схема развития преэклампсии у носителей «неблагоприятных» аллельных вариантов генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции».

В норме функционирование эндотелиальной системы обеспечивается балансом между вазоконстрикторами, к которым относится ангиотензин 2 и вазодилаторами, главным из которых является оксид азота. Кроме того, эндотелиальная дисфункция может развиваться при нарушениях в системе фибринолиза и при гиперпродукции NO. Одними из ключевых звеньев в системах, обеспечивающих синтез и регуляцию содержания данных метаболитов, являются продукты исследуемых в нашей работе генов *ACE*, *PAII*, *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *TNF- $\alpha$*  (рис. 5).

При носительстве функционально «неблагоприятных» аллельных вариантов по указанным генам, оптимальное состояние системы может быть нарушено. Гиперпродукция одних соединений и снижение уровня других может привести к повышению тонуса сосудов вследствие их сокращения и далее к повышению АД, к повреждению эндотелия пероксидными соединениями из-за гиперпродукции NO, к усилению агрегации тромбоцитов и развитию тромбофилических осложнений. Указанные нарушения в полной мере могут определять патогенез преэклампсии (рис. 5).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В настоящее время существует две гипотезы, на первый взгляд противоречащие друг другу. Согласно первой из них, преэклампсия рассматривается как единый патологический процесс с различной степенью тяжести манифестации. Во второй гипотезе предполагается, что преэклампсия – это скорее синдром, объединяющий разные заболевания со сходным клиническим проявлением. На основании полученных нами данных как по отдельным аллельным вариантам, так и по сочетаниям определенных генотипов изученных генов, можно предположить, что с одной стороны, существует единая причина развития двух степеней тяжести преэклампсии, однако впоследствии модифицирующий вклад определенных генетических детерминант и внешних факторов может приводить к различным формам заболевания.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии зависимости возникновения преэклампсии и ее форм от функционального состояния генов «сосудистой системы» и генов «эндотелиальной дисфункции».

При исследовании двух разных популяций (Россия и Греция) показано, что развитие преэклампсии ассоциировано с дисбалансом в одних и тех же системах генов («сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции»), но при этом молекулярные маркеры заболевания в разных странах различные.

Дальнейшее изучение факторов предрасположенности к преэклампсии с учетом межпопуляционных различий, разработка системы молекулярных маркеров, определяющих высокий риск развития патологии, позволит оптимизировать лечение и профилактику этого тяжелого заболевания.

### ВЫВОДЫ

1. Разработана система идентификации ряда молекулярных маркеров преэклампсии.
2. Контрольные группы и группы больных с преэклампсией из России и Греции отличаются по частотам аллелей и генотипов по генам *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *TNF- $\alpha$*  (гены «эндотелиальной дисфункции»).
3. Наличие генотипов *NOS1* 10/15 и *NOS3* 4a/4b и сочетанного генотипа *NOS1* 15/- + *NOS3* 4a/- по генам «эндотелиальной дисфункции» увеличивает риск развития преэклампсии в популяции Северо-западного региона России, а носительство сочетанного генотипа *NOS3* 4b/4b + PAI1 4G/- – в популяции Северо-западного региона Греции.
4. В популяциях из России и Греции развитие легкой и тяжелой форм преэклампсии ассоциировано с носительством различных специфических молекулярных маркеров.
5. Развитие преэклампсии ассоциировано с дисбалансом в одних и тех же системах генов («сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции»), но при этом молекулярные маркеры заболевания в разных странах различные.
6. Аллельные варианты генов «сосудистой системы» и «эндотелиальной дисфункции» ассоциированы с некоторыми патогенетически значимыми клиническими и биохимическими параметрами у больных с преэклампсией.
7. Разработана молекулярно-биологическая модель развития преэклампсии при наличии определенных молекулярных маркеров.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Малышева О.В., Мозговая Е.В., Демин Г.С., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Ассоциация полиморфных аллелей генов ACE и eNOS с развитием гестозов // Медицинская генетика. – 2003. – № 2. – С. 78-82.
2. Ковлен Д.В., Пономаренко Г.Н., Тишаков А.Ю., Глотов О.С., Москаленко М.В., Демин Г.С., Братова Н.И., Иващенко Т.Э., Обрезан А.Г. Роль генных сетей в реализации лечебных эффектов климатотерапии у больных с хронической сердечной недостаточностью // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры – 2006. – №3. – С. 5-9.
3. Ковлен Д.В., Тишаков А.Ю., Глотов О.С., Москаленко М.В., Демин Г.С., Бицадзе А.Н., Чернышев А.В., Братова Н.И., Иващенко Т.Э., Обрезан А.Г., Пономаренко Г.Н.

Генетические детерминанты эффективности климатотерапии больных с хронической сердечной недостаточностью // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2007. – Т.143, №1. – С. 32-37.

4. Козловская М.А., Ярмолинская М.И., **Демин Г.С.**, Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Анализ ассоциации полиморфизма генов *IL4* и *IL4R* с эндометриозом // Медицинская генетика – 2007. – Т.6, №4. – С. 48-51.

5. Beshpalova O.N., Ivashchenko T.E., Tarasenko O.A., **Demin G.S.**, Ajlamazjan E.K., Baranov V.S. The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with pregnancy miscarriage and placental insufficiency // Balkan Journal of Medical Genetics – 2007. – V.10, N.1. – P. 3-9.

6. Иващенко Т.Э., Швед Н.Ю., Беспалова О.Н., Тарасенко О.А., Малышева О.В., **Демин Г.С.**, Баранов В.С. Генетические основы предрасположенности к акушерской и гинекологической патологии // Молекулярная медицина – 2007. – №3. – С. 19-26.

7. **Демин Г.С.** Генетические аспекты предрасположенности к гестозу // Журнал акушерства и женских болезней – 2007. – №4. – С. 74-86.

8. Патентная заявка №2005131568. Глотов О.С., Глотов А.С., **Демин Г.С.**, Баранов В.С., Иващенко Т.Э. Способ диагностики сердечно-сосудистых заболеваний и диагностический набор для его осуществления.

9. **Демин Г.С.** Анализ ассоциации генов eNOS и ACE с развитием гестозов у беременных женщин // Человек. Природа. Общество. Актуальные проблемы / Материалы 12-й международной междисциплинарной конференции молодых ученых 27-30 декабря 2001 г. – СПб, 2001. – С. 626-627.

10. **Демин Г.С.**, Малышева О.В. Анализ ассоциации генов eNOS и ACE с развитием гестозов различной степени тяжести // Пятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей. – СПб, 2002. – С. 69-70.

11. **Демин Г.С.** Генетическое тестирование наследственной предрасположенности к развитию гестозов // Седьмая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов – СПб, 2002. – С.44.

12. Malysheva O.V., Mozgovaya E.V., **Demin G.S.** ACE and eNOS gene polymorphisms among patients with preeclampsia, healthy pregnant women and population of St. Petersburg // 5th Balkan Meeting On Human Genetics, August 29 – September 01, 2002. – 2002. – P. 57.

13. **Демин Г.С.** Ассоциация аллелей генов ангиотензин-конвертирующего фермента и эндотелиальной NO-синтазы с развитием гестозов // Молодые биологи Санкт-Петербурга – 300-летию города. Аничковский вестник. – 2003. – №33. – С. 102-103.

14. **Демин Г.С.** Генетическое тестирование наследственной предрасположенности к развитию гестозов // Восьмая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. – СПб, 2003. – С.41.
15. **Demin G.S.,** Malysheva O.V., Mozgovaya E.V., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Association between polymorphism of microsomal epoxide hydrolase and development of preeclampsia // European Congress of Human Genetic Conference May 3-6, Birmingham, England. – 2003. – P. 235.
16. **Демин Г.С.,** Малышева О.В. Изучение роли гена микросомальной эпоксидгидролазы в связи с развитием гестозов у беременных женщин // Человек и его здоровье / Шестая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей. – СПб, 2003. – С. 49-50.
17. **Демин Г.С.** Анализ полиморфизма гена N-ацетилтрансферазы 2 в популяции Северо-западного региона России // Человек и его здоровье / Седьмая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей. – СПб, 2004. – С. 81.
18. **Demin G.S.,** Malysheva O.V., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Polymorphism of PLAT and PAI genes in development of preeclampsia // European Journal of Human Genetics. – 2004. – V. 12, suppl. 1. – P. 281.
19. **Demin G.S.,** Malysheva O.V., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Polymorphism of vascular system genes (ACE, eNOS, PLAT, PAI-1) in women with preeclampsia. Case-control study // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2004. – V. 42, №8. – P. A45.
20. **Demin G.S.,** Ivashchenko T.E., Mozgovaia H.V., Malysheva O.V., Baranov V.S. Association of some vascular genetic markers with different forms of preeclampsia // European Journal of Human Genetics. – 2005. – V. 13, suppl. 1. – P. 331-332.
21. **Demin G.S.,** Ivashchenko T.E., Mozgovaia E.V., Baranov V.S. Genetic polymorphism of HLA-G in severe preeclampsia // European Journal of Human Genetics. – 2006. – V. 14, suppl. 1. – P. 323.
22. **Demin G.S.,** Bouba I., Ivashchenko T.E., Baranov V.S., Georgiou I.A. Polymorphism of nitric oxide synthases in preeclampsia // European Journal of Human Genetics. – 2007. – V. 15, suppl. 1. – P. 272.



## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамченко В.В., Костюшов Е.В., Щербина Л.А. - СПб: Logos, 1995.
2. Ариас Ф. - М.: Медицина, 1989. - 656 с.
3. Гланц С. - М.: Практика, 1999. - 459 с.
4. Журавлева И.А., Мелентьев И.А., Виноградов Н.А. // Клини.мед. - 1997. - Т. 75, №4. - С. 18-21.
5. Зильбер А.П., Шифман Е.М., Павлов А.Г. - Петрозаводск: 1997. - 52 с.
6. Клинические... - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. - 512 с.
7. Кулаков В.И., Мурашко Л.Е. // Акушерство и гинекология. - 1998. - Т. 5. - С. 3-6.
8. Нагнибеда А.Н., Павлова Л.П. - СПб: Специальная литература, 1998. - 76 с.
9. Реброва О.Ю. - М.: МедиаСфера, 2003. - 312 с.
10. Савельева Г.М., Шалина Р.И., Дживелегова Г.Д. // Акушерство и гинекология. - 1992. - Т. 3. - С. 14-17.
11. Серов В.Н., Стрижаков А.Н., Маркин С.А. - М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 1997. - 424 с.
12. Сидорова И.С., Каложина Л.С. // Акушерство и гинекология. - 1998. - Т. 5. - С. 55-59.
13. Шарабчиев Ю.Т., Дудина Т.В. - Минск: Книжный Дом, 2004. - 320 с.
14. Bachmann S., Mundel P. // Am J Kidney Dis. - 1994. - Vol. 24, N. 1. - P. 112-129.
15. Bell J. // Hum Mol Genet. - 1992. - Vol. 1, N. 3. - P. 147-148.
16. Bussolino F., Benedetto C., Massobrio M., Camussi G. // Lancet. - 1980. - Vol. 2, N. 8196. - P. 702.
17. Cabrera C., Bohr D. // Biochem Biophys Res Commun. - 1995. - Vol. 206, N. 1. - P. 77-81.
18. Chappell S., Morgan L. // Clin Sci (Lond). - 2006. - Vol. 110, N. 4. - P. 443-458.
19. Chen G., Wilson R., Wang S.H., Zheng H.Z., Walker J.J., McKillop J.H. // Clin Exp Immunol. - 1996. - Vol. 104, N. 1. - P. 154-159.
20. Clark C.J., Davies E., Anderson N.H., Farmer R., Friel E.C., Fraser R., Connell J.M. // Hypertension. - 2000. - Vol. 36, N. 6. - P. 990-994.
21. Cnattingius S., Reilly M., Pawitan Y., Lichtenstein P. // Am J Med Genet A. - 2004. - Vol. 130, N. 4. - P. 365-371.
22. Dawson S.J., Wiman B., Hamsten A., Green F., Humphries S., Henney A.M. // J Biol Chem. - 1993. - Vol. 268, N. 15. - P. 10739-10745.
23. Day C.P., Grove J., Daly A.K., Stewart M.W., Avery P.J., Walker M. // Diabetologia. - 1998. - Vol. 41, N. 4. - P. 430-434.
24. Dulek L., Henderson-Smart D.J., Knight M., King J.F. // Cochrane Database Syst Rev. - 2004. - N. 1. - P. CD004659.
25. Eriksson P., Kallin B., van 't Hooft F.M., Bavenholm P., Hamsten A. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1995. - Vol. 92, N. 6. - P. 1851-1855.
26. Fabbro D., D'Elia A.V., Spizzo R., Driuli L., Barillari G., Di Loreto C., Marchesoni D., Damante G. // Gynecol Obstet Invest. - 2003. - Vol. 56, N. 1. - P. 17-22.
27. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. // Hypertension. - 1994. - Vol. 23, N. 6, Pt 2. - P. 1121-1131.
28. Ichihara S., Yamada Y., Fujimura T., Nakashima N., Yokota M. // Am J Cardiol. - 1998. - Vol. 81, N. 1. - P. 83-86.
29. Khalil R.A., Granger J.P. // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. - 2002. - Vol. 283, N. 1. - P. R29-45.
30. Kilpatrick D.C. // Hum Reprod Update. - 1999. - Vol. 5, N. 2. - P. 94-102.
31. Konno S., Hizawa N., Yamaguchi E., Jinushi E., Nishimura M. // J Allergy Clin Immunol. - 2001. - Vol. 108, N. 5. - P. 810-814.
32. Margaglione M., Grandone E., Vecchione G., Cappucci G., Giuliani N., Colaizzo D., Celentano E., Panico S., Di Minno G. // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 1997. - Vol. 17, N. 10. - P. 2082-2087.
33. Mello G., Parretti E., Gensini F., Sticchi E., Mecacci F., Scarselli G., Genuardi M., Abbate R., Fatini C. // Hypertension. - 2003. - Vol. 41, N. 4. - P. 932-937.
34. Mozgovaia E.V., Malysheva O.V., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. // BJMG. - 2002. - Vol. 5, N. 3-4. - P. 19-26.
35. Murray J., Du C., Ledlow A., Bates J.N., Conklin J.L. // Am J Physiol. - 1991. - Vol. 261, N. 3 Pt 1. - P. G401-406.
36. Pipkin B.F. // Biol Neonate. - 1999. - Vol. 76, N. 6. - P. 325-330.
37. Ridker P.M., Gaboury C.L., Conlin P.R., Seely E.W., Williams G.H., Vaughan D.E. // Circulation. - 1993. - Vol. 87, N. 6. - P. 1969-1973.
38. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. // J Clin Invest. - 1990. - Vol. 86, N. 4. - P. 1343-1346.
39. Saarela T., Hiltunen M., Helisalmi S., Heinonen S., Laakso M. // Mol Hum Reprod. - 2005. - Vol. 11, N. 6. - P. 437-440.
40. Serrano N.C., Casas J.P., Diaz L.A., Paez C., Mesa C.M., Cifuentes R., Monterrosa A., Bautista A., Hawe E., Hingorani A.D., Vallance P., Lopez-Jaramillo P. // Hypertension. - 2004. - Vol. 44, N. 5. - P. 702-707.
41. Snyder S.H. // Nature. - 1993. - Vol. 364, N. 6438. - P. 577.
42. Tempfer C., Unfried G., Zeillinger R., Hefler L., Nagele F., Huber J.C. // Hum Reprod. - 2001a. - Vol. 16, N. 8. - P. 1644-1647.
43. Tempfer C.B., Dorman K., Deter R.L., O'Brien W.E., Gregg A.R. // Hypertens Pregnancy. - 2001b. - Vol. 20, N. 1. - P. 107-118.
44. Tired L., Rigat B., Visvikis S., Breda C., Corvol P., Cambien F., Soubrier F. // Am J Hum Genet. - 1992. - Vol. 51, N. 1. - P. 197-205.
45. Vaughan D.E. // Am J Cardiol. - 1997. - Vol. 79, N. 5A. - P. 12-16.
46. Vince G.S., Starkey P.M., Austgulen R., Kwiatkowski D., Redman C.W. // Br J Obstet Gynaecol. - 1995. - Vol. 102, N. 1. - P. 20-25.
47. Visser W., Beckmann I., Knook M.A., Wallenburg H.C. // Acta Obstet Gynecol Scand. - 2002. - Vol. 81, N. 8. - P. 713-719.
48. Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F., McCredie R.M., Wilcken D.E. // Nat Med. - 1996. - Vol. 2, N. 1. - P. 41-45.
49. Wang X.L., Mahaney M.C., Sim A.S., Wang J., Wang J., Blangero J., Almasy L., Badenhop R.B., Wilcken D.E. // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 1997. - Vol. 17, N. 11. - P. 3147-3153.
50. Wang Y., Walsh S.W. // J Reprod Immunol. - 1996. - Vol. 32, N. 2. - P. 157-169.
51. Warpeha K.M., Xu W., Liu L., Charles I.G., Patterson C.C., Ah-Fat F., Harding S., Hart P.M., Chakravarthy U., Hughes A.E. // Faseb J. - 1999. - Vol. 13, N. 13. - P. 1825-1832.
52. Wilson A.G., di Giovine F.S., Blakemore A.I., Duff G.W. // Hum Mol Genet. - 1992. - Vol. 1, N. 5. - P. 353.
53. Wiwanitkit V. // Arch Gynecol Obstet. - 2006. - Vol. 273, N. 6. - P. 322-324.
54. Yoshimura T., Yoshimura M., Tabata A., Yasue H., Okamura H. // Hum Genet. - 2001. - Vol. 108, N. 3. - P. 181-183.