

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»**

**Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
кафедра генетики**

Новикова Ирина Алексеевна

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
ОБМЕНА И АНГИОГЕНЕЗА У ЖЕНЩИН НА РАЗВИТИЕ ПЛОДА**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

По направлению 06.04.01 – Биология

Научный руководитель

Доцент кафедры генетики

Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, к.б.н.

Покудина Инна Олеговна

Рецензент

В.н.с Лаборатории "Нейротехнологии восприятия и распознавания"

Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, к.б.н.

Косенко Петр Олегович

Ростов-на-Дону – 2020

РЕФЕРАТ

Объем работы – 61 страница, 12 рисунков, 10 таблиц, 112 использованных источников.

ЗАДЕРЖКА РАЗВИТИЯ ПЛОДА, АНГИОГЕНЕЗ, ИНДЕКС МАССЫ ТЕЛА, *NOS3*, *LEPR*, *FTO*, *VEGFA*, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Целью данной работы является исследование функциональной значимости однонуклеотидных полиморфизмов генов энергетического обмена, таких как *LEPR* и *FTO*, и гена ангиогенеза – *NOS3* у женщин в патогенезе задержки развития плода.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- Провести анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *Arg223Gln* гена *LEPR* в крови женщин, больных ЗРП
- Провести анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *A23525T* гена *FTO* в крови женщин, больных ЗРП
- Провести анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *C786T* гена *NOS3* в крови женщин, больных ЗРП
- Провести анализ межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных локусов при задержке развития плода

В работе использовались молекулярно-генетические и статистические методы исследования. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенной из цельной крови больных ЗРП и здоровых женщин.

Были выявлены статистически значимые различия при наличии у женщин генотипов *CT* и *TT* полиморфизма *C786T* гена *NOS3* (CI 95 % $p < 0,001$ $\chi^2 = 16,22$). Отношение шансов развития ЗРП у женщин с генотипом *CT* составляет 0,309 (CI 95 % 0,110-0,868 $p < 0,001$). Это свидетельствует о том, что данный генотип можно назвать протекторным, так как он связан с низким уровнем риска развития ЗРП. Отношение шансов развития ЗРП у женщин с *TT* генотипом

составляет 2,4 (CI 95 % 1,462-3,339 $p < 0,001$). Таким образом, генотип *TT* связан с высоким уровнем риска развития заболевания.

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизмов *Arg223Gln* гена *LEPR* и *A23525T* гена *FTO* среди больных ЗРП и контрольной группой не выявил статистически значимых различий.

Анализ межгенных взаимодействий позволил выявить выраженный синергизм между полиморфизмами *C786T* гена *NOS3* и *Arg223Gln* гена *LEPR* (21,74 %), а также умеренный синергизм между полиморфизмами *C786T* гена *NOS3* и *A23525T* гена *FTO* (8,28 %). Сочетание полиморфизмов *Arg223Gln* (*LEPR*) и *A23525T* (*FTO*) имело аддитивный эффект (2,39 %).

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ОГЛАВЛЕНИЕ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Задержка развития плода и факторы, влияющие на неё	8
1.2 Вклад полиморфизма <i>Arg223Gln</i> гена <i>LEPR</i> матери в развитие ЗРП...	10
1.3 Влияние полиморфизма <i>A23525T</i> гена <i>FTO</i> матери на развитие ЗРП...	15
1.4 Эндотелиальная синтаза азота. Вклад полиморфизма <i>C786T</i> гена <i>NOS3</i> матери на развитие ЗРП.....	19
1.5 Фактор роста эндотелия сосудов. Вклад полиморфизма <i>C634G</i> гена <i>VEGFA</i> матери на развитие ЗРП	24
2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Материал исследования.....	28
2.2 Выделение ДНК методом сорбционной экстракции на silica-spin колонках	28
2.3 Постановка аллель-специфической ПЦР в реальном времени	29
2.4 Постановка аллель-специфической ПЦР в реальном времени одношаговым методом	31
2.5 Методы статистического анализа результатов исследования.....	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Исследование частоты регистрации генотипов и аллелей по полиморфизму <i>Arg223Gln</i> гена <i>LEPR</i> у женщин с задержкой развития плода.....	34
3.2 Исследование частоты регистрации генотипов и аллелей по полиморфизму <i>A23525T</i> гена <i>FTO</i> у женщин с задержкой развития плода	37
3.3 Исследование частоты регистрации генотипов и аллелей по полиморфизму <i>C786T</i> гена <i>NOS3</i> у женщин с задержкой развития плода.....	41
3.4 Анализ межгенных взаимодействий	44
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ЗРП – задержка развития плода

NOS3 – эндотелиальная NO-синтаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов

ИМТ – индекс массы тела

LEPR – рецептор лептина

FTO – ген, ассоциированный с жировой массой и ожирением

РНК – рибонуклеиновая кислота

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

NO – оксид азота

OR – отношение шансов

ВВЕДЕНИЕ

Задержка развития плода (ЗРП), осложняющая течение беременности, остается одной из ведущих проблем акушерства и гинекологии. Данная патология приводит к развитию серьезных патологий плода и младенца, вплоть до летального исхода.

Среди причин перинатальных потерь задержка развития плода встречается примерно в 50 % случаев. Перинатальная смертность доношенных детей с задержкой внутриутробного развития в 3-8 раз превышает таковую у детей с нормальной массой при рождении.

Частота ЗРП в России колеблется в широких пределах и составляет 3,5-17,5 % (Радзинский, 2017). В других странах этот показатель несколько отличается и составляет 3-26 % (Sharma, 2016).

В настоящее время проводится значительное число исследований, посвященных поиску наследственных детерминант, предрасполагающих к неблагоприятному протеканию беременности. Одним из направлений в таких исследованиях можно назвать поиск генов-кандидатов нарушений различных систем организма. Грамотный анализ межгенных взаимодействий и адекватная интерпретация полученных данных стать важным инструментом в диагностике ранних патологий беременности и эмбрионального развития, а также в выборе эффективной тактики ведения пациентки.

Слишком большая прибавка массы тела матери во время беременности является фактором риска развития различных нарушений, влияющих на рост плода. Гены энергетического обмена играют важную роль в регуляции массы тела как матери, так и будущего ребенка. Следовательно, они вносят свой вклад в развитие ЗРП.

Ангиогенез, определяемый как процесс развития новых сосудистых структур, является плацентарным фактором, играющим значимую роль в развитии ЗРП. Данный процесс характеризуется ветвлением новых микрососудов из более крупных кровеносных сосудов. Повреждение эндотелия кровеносных сосудов приводит к усилению свертываемости крови и

тромбоцитарному гемостазу. Такие состояния можно наблюдать при различных гестационных осложнениях, в том числе, ЗРП.

Таким образом, изучение полиморфизмов генов энергетического обмена, отвечающих за регуляцию аппетита и массу тела, и генов, участвующих в ангиогенезе, вызывает особый интерес.

Цель работы – исследование функциональной значимости однонуклеотидных полиморфизмов генов энергетического обмена, таких как *LEPR* и *FTO*, и гена ангиогенеза – *NOS3* у женщин в патогенезе задержки развития плода.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Провести анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *Arg223Gln* гена *LEPR* в крови женщин, больных ЗРП
- 2) Провести анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *A23525T* гена *FTO* в крови женщин, больных ЗРП
- 3) Провести анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма *C786T* гена *NOS3* в крови женщин, больных ЗРП
- 4) Провести анализ межгенных взаимодействий исследуемых полиморфных локусов при задержке развития плода

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Задержка развития плода и факторы, влияющие на неё

Задержка развития плода – состояние, при котором происходит замедление или прекращение роста плода, фактический рост которого меньше обычного, соответствующего данному сроку беременности.

ЗРП – это совокупность нарушений состояния плода в результате изменений обменных процессов в фетоплацентарном комплексе, когда плод не в состоянии достигнуть необходимых антропометрических параметров к определенному гестационному возрасту (Макаров, 2012).

В Международной Классификации Болезней (МКБ-10) (<https://mkb-10.com/>) существует несколько рубрик, классифицирующих ЗРП, наиболее значимой из которых при постановке диагноза является «Замедленный рост и недостаточность питания плода».

Однако, существует классификация, более адаптированная к практической работе врача. Согласно этой классификации ЗРП может иметь три формы:

- Ассиметрическая (гипотрофическая) форма: плод имеет низкую массу тела и нормальную длину;
- Симметрическая (гипопластическая) форма: у плода наблюдается пропорциональное уменьшение длины и массы тела;
- Смешанная (диспластическая) форма: наблюдается отставание всех антропометрических параметров (особенно, длины рук и ног и размеров живота), однако, оно непропорциональное.

Среди причин ЗРП самыми важными выделяют следующие:

1. Материнские (обуславливают около 25 % случаев ЗРП плода).

По данным Волгина (2002), явная или скрытая патология матери может быть причиной рождения детей со сниженными антропометрическими показателями. Вероятность летального исхода у детей с массой тела менее 2,5 кг в 40 раз выше, чем у детей с нормальной массой тела, а при весе тела 1,5 кг – выше в 200 раз.

Согласно теории «экономного фенотипа» задержке развития плода способствует нарушение липидного обмена, гипоксия, стресс, анемия и ряд других факторов (Нетребенко, 2011).

D. Robajas и соавторы (2016) указывают, что наиболее часто к причинам соматического статуса матери относят артериальную гипертензию, наличие метаболических нарушений (например, сахарный диабет), тромбофилии, аутоиммунные заболевания.

J. Liu и соавторы (2014) сообщают, что на формирование синдрома ЗРП влияют такие патологии, осложняющее течение беременности, как фетоплацентарная недостаточность, преэклампсия, облитерирующая васкулопатия.

E. Milnerowicz-Nabzdyk и соавторы (2016) считают, что наличие вредных привычек у матери является главным фактором, влияющим на развитие ЗРП в развитых странах мира.

2. Фетальные причины:

- патологии генетического характера (синдромы Дауна, Патау, Эдвардса, Клайнфельтера, Секкеля и др.);
- врожденные аномалии;

В настоящее время имеется значительное количество исследований, посвященных изучению генетических причин развития ЗРП, доказывающих существование множества однонуклеотидных замен и их сочетаний, влияющих на осложненное течение беременности, в частности, ЗРП.

- Ряд исследователей – F. Mirza и соавторы, A. Vouman (2015) – сообщают, что ЗРП может быть проявлением течения таких инфекционных заболеваний, как ВИЧ, цитомегаловия, герпес, токсоплазмоз, сифилис.

- Исследования C. Machado и соавторов (2017) свидетельствуют, что ЗРП является сопутствующей патологией при многоплодной беременности.

3. Аномалии матки и плаценты:

- грубые структурные дефекты плаценты;
- недостаточность или избыточность трофобласта;

- нарушения маточно-плацентарной перфузии;
- аномалии сосудов (единственная артерия пуповины, хорионангиомы или гемангиомы плаценты);
- аномалии расположения и прикрепления плаценты

В 1989 W. Roberts с соавторами предложил идею о том, что патология эндотелия лежит в основе основных осложнений беременности. На этапе имплантации и формирования плаценты любой дефект плацентации может привести к нарушению маточно-плацентарного кровотока и развитию ишемии плаценты.

4. Демографические факторы:

- возраст матери (очень юный и пожилой);
- материнский рост и вес (масса тела до 50 кг)
- расовая принадлежность;
- рождение детей с ЗРП в анамнезе.

Несбалансированность питания во время беременности может привести к увеличению частоты гестационных осложнений и гипогалактии в послеродовом периоде.

1.2 Вклад полиморфизма *Arg223Gln* гена *LEPR* матери в развитие ЗРП

Лептин – гормон белковой природы, являющийся продуктом секреции жировых клеток – адипоцитов, кодируется генов *ob*. Фридман (1995) первым сформулировал постулат о том, что концентрация лептина в крови пропорциональна массе жировой ткани на 23 конгрессе Федерации европейских биохимических обществ. Молекула лептина состоит из 167 аминокислот, общая масса которых составляет 16 кД. Основной функцией гормона является регуляция массы тела и аппетита. Интересным является тот факт, 22–56 фрагменты полипептидной цепочки активно тормозят потребление пищи; фрагменты 116–167 снижают потребление пищи незначительно, а фрагменты 57–92 не оказывают никакого влияния на аппетит.

Исследования кристаллической структуры лептина показали, он относится к спиральным белкам. К этой же группе относят цитокины, гормон роста и пролактин (Zhang, 1994). Лептин также обнаружен в слизистой оболочке желудка, плаценте, репродуктивных органах и эпителии молочных желез (Bado, 1998). Ген *ob*, экспрессируется в белой жировой ткани, желудке, плаценте и, возможно, в молочных железах (Hoggard, 1997).

Содержание лептина в крови повышается под влиянием инсулина, глюкокортикоидов, эстрогенов, фактора некроза опухоли-альфа и снижается под влиянием андрогенов, гормона роста, грелина, свободных жирных кислот. Лептин может циркулировать в крови как в свободном состоянии, так и вместе с белком-носителем, состоящим из 146 аминокислот (Беляков, 2005).

Рецепторы лептина обнаружены в гипоталамусе, передней доле гипофиза, а также в периферических органах и тканях: печени, почках, поджелудочной железе, сердце, легких, яичниках, эндометрии, клетках Лейдига, трофобласте, скелетных мышцах и стволовых клетках костного мозга (Kitawaki, 2000). Рецепторы лептина относят к семейству рецепторов цитокинов gp130, к которой также относят рецепторы интерферона, интерлейкинов и гормона роста. (Tartaglia, 1995).

Существует несколько изоформ рецептора, которые образуются путем альтернативного сплайсинга и посттрансляционного процессинга: ObRa, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf. Каждая из них содержит лиганд-связывающий внеклеточный домен, но только в четырех имеется трансмембранный участок, необходимый для встраивания в цитоплазматическую мембрану. Единственной изученной изоформой рецептора лептина является Ob-Rb, являющаяся самой длинной.

Полагают, что в кровотоке растворимые формы рецептора лептина выполняют функцию транспортных лептинсвязывающих белков, тогда как другие изоформы этой рецепторной молекулы участвуют в процессе переноса этого гормона в головной мозг и спинномозговую жидкость через гематоэнцефалический барьер. Рецептор лептина лишен собственной киназной

активности. При связывании его длинной формы Ob-Rb с лептином активируется киназа JAK-2, которая фосфорилирует факторы транскрипции STAT-1, STAT-3 и STAT-5. После активации JAK-2 факторы STAT-белки переходят в ядро и стимулируют экспрессию специфических генов. Ob-Rb был обнаружен только в паравентрикулярных, латеральных, вентромедиальных и дорсомедиальных ядрах гипоталамуса (Романцова, 2005) (рис. 1).

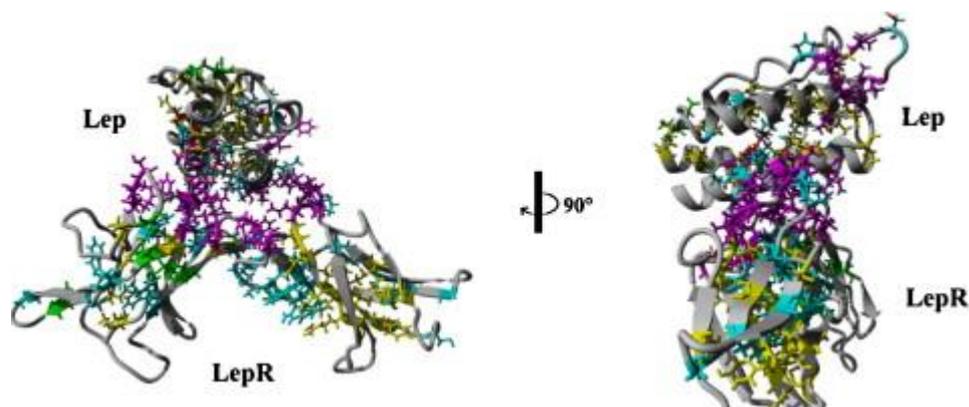


Рисунок 1 – Молекулы лептина (LEP) и рецептора лептина (LEPR). Линейная модель

Концентрация лептина в мозге и спинномозговой жидкости не увеличивается, при содержании лептина в сыворотке крови выше 30 нг/мл, что является одной из причин развития лептинорезистентности.

Регуляция пищевого поведения лептина осуществляется посредством торможения синтеза нейропептида Y в аркуатных ядрах гипоталамуса. Нейропептид Y стимулирует прием пищи и снижает термогенез, стимулом к его высвобождению служит гипогликемия и чувство голода. Торможение продукции этого пептида лептином приводит к снижению аппетита и увеличению энергозатрат за счет изменения тонуса симпатической и парасимпатической системы.

В процессе регуляции липидного обмена лептин взаимодействует с меланоконцентрирующим гормоном и кокаин/амфетамин регулирующим пептидом, которые обладают аноректическим действием (Sinha, 1998). Действие лептина на рецепторы мозга инициирует целый каскад реакций, включая:

- снижение продукции белка, отвечающего за развитие белой жировой ткани;
- нарушение метаболизма митохондрий и повышение продукции;

– продукции активных форм кислорода, что приводит к усилению транскрипции и активации эндонуклеаз, протеаз и фосфорилаз. Они способствуют инициации и развитию проапоптических реакций в жировых клетках (Mantzoros, 1999).

Таким образом, лептин является гормоном, осуществляющим регуляцию количества жировой ткани по принципу обратной связи.

Доказано, что рецепторы лептина присутствуют в эндометрии. На протяжении менструального цикла количество рецепторов постепенно повышается, достигая максимума в ранней секреторной фазе (Wang, 2009). Недостаточное количество лептиновых рецепторов в эндометрии выявлено у женщин с бесплодием и нормальной функцией яичников (Alfer, 1997). Лептин входит в группу гормонов, обеспечивающих пролиферативные процессы эпителия и стромы эндометрия (Patho, 2007). Несостоятельность лептиновых рецепторов в эндометрии может вносить свой вклад в формирование так называемого «эндометриального фактора бесплодия» (Alfer, 2000).

В яичниках рецепторы лептина присутствуют во всех структурах и типах клеток. мРНК лептинового рецептора идентифицирована в ооцитах, премордиальных фолликулах, в гранулезных клетках фолликулов на различных стадиях созревания, в цитоплазме клеток желтого тела и в текальных клетках (Abir, 2005)

Уровень лептина в крови пуповины новорожденных прямо пропорционален массе тела и массе жировой ткани, снижен при курении матери, недоношенности, гипотрофии и повышен у крупных новорожденных (Schubring, 1996).

В последнее время появились данные о плейотропном влиянии лептина на репродукцию в течение беременности. Экспрессия лептина в плаценте усиливает пролиферацию и дифференцировку трофобластов. Продукция лептина в плаценте регулируется 17β -эстрадиолом, который играет ключевую роль в имплантации blastocyst, в дифференцировке и инвазии трофобласта, а также в

регуляции роста сосудистой сети матки и в активации протеинкиназных сигнальных путей (Gambino, 2012).

Переход лептина от матери к плоду через плаценту маловероятен, так как уровень лептина в их крови существенно отличается. Секретируемый плацентой лептин поступает в кровотоки матери (Masuzaki, 1997). Во время беременности уровень лептина в крови повышается вместе со сроком гестации в большей степени, чем это соответствует увеличению массы тела. Это позволяет сделать вывод о том, что беременность представляет собой состояние физиологической гиперлептинемии и лептинорезистентности (Mukherjta, 1999). После родов уровень лептина в крови резко снижается, что отражает энергетические затраты лактационного процесса.

Роль повышения материнского лептина во время беременности неясна, однако, была выдвинута гипотеза о важной роли адипоцитокинов в развитии плода, и считают, что изменение их концентрации может служить возможным маркером раннего изменения материнского метаболизма. Нарушение экспрессии гена *Ob-Rb* в гипоталамусе приводит к частичной или полной резистентности к лептину. В период лактации количество *Ob-Rb* рецепторов возвращается к прежнему уровню, но в раннем периоде лактации повышается количество рецепторов *Ob-Re*, и *Ob-Rf* (Altman, 2002).

Тришкин в своем исследовании (2012) показал статистически значимое снижение концентрации лептина у беременных с ЗРП по сравнению с беременными, имеющими нормальную массу плода.

Steinbrekera в своем исследовании (2016) описывает связь низких концентраций лептина в крови матери с задержкой развития плода. В работе также была оценена плацентарная экспрессия лептина во время беременности близнецов, при которой один плод имел нормальную массу тела, а у другого была задержка роста: более низкие концентрации лептина были обнаружены в образцах плаценты плода с задержкой роста.

Tsai и Vela-Huerta (2008) обнаружили более высокие уровни лептина у больших по гестационному возрасту младенцев, чем у их сверстников, рожденных с ЗРП.

Лептин положительно связан с такими факторами как инсулин и IGF-I, которые, как хорошо известно, связаны с внутриматочным ростом.

Claudiu Marginean в своем исследовании (2016) доказал, что ИМТ матери оказывает значительное влияние на ИМТ новорожденных за счет полиморфизма rs1137101.

Ген *LEPR* (*Ob-Rb*) расположен на коротком плече 1 хромосомы (1p31.3). Данный ген кодирует рецептор трансмембранной области, с помощью которого ген лептина (*LEP*) участвует в липидном обмене. Мутации в гене *LEPR* приводят к нарушению сплайсинга и нарушают экспрессию формы *Ob-Rb*. Для гена *LEPR* описано 22.792 мутаций.

Наиболее распространенной и изучаемой мутацией гена *LEPR* считается замена аденина гуанином в 668-м положении (rs1137101), что приводит к замене глутамина аргинином в 223-й позиции в белке (*Gln223Arg*), а также снижению аффинности его к лептину. Данная мутация приводит к нарушению проведения гормонального сигнала.

Распространенность полиморфизма в популяциях европейского типа составляет – 55 % (Huang, 2002).

1.3 Влияние полиморфизма A23525T гена *FTO* матери на развитие ЗРП

FTO - белок, ассоциированный с жировой массой и ожирением, является ферментом, кодируемым геном *FTO*.

FTO принадлежит к суперсемейству Fe(II) 2- α -кетоглутаратзависимых диоксигеназ (деметилаз). Его гомологи (*AlkB* у кишечной палочки и *ABH 2* и *3* у млекопитающих) участвуют в репарации поврежденной алкилированием ДНК, деметилируя ее. Доказано, что *FTO in vitro* тоже может катализировать деметилирование 3-метилтимина и 3-метилурацила в одноцепочечных ДНК и РНК, превращая их, в тимин и урацил (Gerken, 2007).

Исследование кристаллической структуры белка свидетельствует о том, что он является деметилазой азотистых нуклеиновых кислот, осуществляя регуляцию активности генов на эпигенетическом уровне (Zabena, 2009). Линейная модель молекулы белка FTO представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Линейная модель молекулы белка FTO

Белок состоит из двух доменов, N-концевой домен содержит каталитический центр. Роль С-концевого домена в настоящее время неизвестна. Каталитический домен включает в себя пять аминокислотных остатков, которые обнаруживают у всех белков семейства 2- α -кетоглутаратзависимых деметилаз. Они нужны для связывания α -кетоглутарата и двухвалентного железа. У белка FTO есть уникальный участок, так называемая «Петля 1», высоко консервативный у белков FTO различных видов животных. Существует мнение, что эта петля обуславливает специфичность FTO к одноцепочечным ДНК (Han, 2010). Белок FTO участвует в энергетическом обмене и метаболизме клеток организма (Насибулина, 2012).

Ген *FTO*, локализованный на длинном плече 16 хромосомы, был получен методом клонирования Peters (1999). Ген состоит из 502 аминокислот с массой 58 kD. Используя ПЦР в реальном времени, Frayling (2007) обнаружил, что *FTO*

экспрессируется в мышцах, островках поджелудочной железы, жировой ткани и надпочечниках), но особенно высок уровень его экспрессии в мозге.

Нарушение нормальной работы гена *FTO* приводит к разнообразным патологиям. При недостаточной его экспрессии у мышей обнаруживают нарушения развития, замедление постнатального роста, сниженную массу тела, высокий уровень гибели новорожденных мышат (Fischer, 2009, McMurray, 2016). Исследование Livingstone (2016) показало увеличение общей и жировой массы у животных при чрезмерной экспрессии гена. Утрата одной функциональной копии *FTO* не связана с каким-либо патологическим фенотипом, а гетерозиготные мутации в экзоне, ведущие к потере функции гена, можно обнаружить не только у людей с повышенным ИМТ, но и у людей с нормальным ИМТ (Meure, 2010).

Изучая уровень экспрессии *FTO* в гипоталамусе Gulati (2013) предположил, что *FTO* может регулировать липидный обмен посредством гипоталамо-гипофизарной системы. Геркен, проводя своё исследование на мышцах (2007), установил, что экспрессия *FTO* в аркуатном ядре снижается в течение двух суток после голодания, и восстанавливается после жировой диеты.

Группа ученых из Кембриджа по руководством Yeо (2012) предложила гипотезу, согласно которой *FTO* можно назвать «датчиком насыщения», который работает на уровне клетки. В ходе исследований выяснилось, что количество иРНК и белка *FTO* резко падает при недостаточном поступлении в клетку незаменимых аминокислот и восстанавливается при возобновлении их получения. Падение количества иРНК при этом происходит быстрее, чем при естественной деградации (Cheung, 2011). От количества аминокислот в клетке зависит активация белкового комплекса mTORC1 (комплекс белков-мишеней рапамицина у млекопитающих). Он является одним из главных регуляторов роста клетки и трансляции иРНК. Комплекс активизируется при условии достаточного количества ресурсов для роста в клетке. Если же их недостаточно синтез белков нарушается вследствие отсутствия транскрипции (Shimobayash, 2014, Zeng, 2016, Castellano, 2017).

Фенотип мышей с локально нарушенной экспрессией *FTO*, например, в ЦНС, схож с фенотипом, при котором количество транскрипта снижено во всем организме. У них наблюдалась задержка роста, уменьшение размеров тела, снижение плотности костей, увеличение относительной массы жировой ткани (Yan, 2018).

Исследование Tung (2010) показало повышение количества количество иРНК Stat3 при усилении экспрессии *FTO* в аркуатном ядре, что может говорить о потенциальной роли этого сигнального белка в регуляции пищевого поведения с помощью *FTO*.

Возможно, *FTO* может участвовать в управлении метаболизмом клетки, выполняя свою каталитическую функцию деметилазы. Показано, что кратковременная чрезмерная экспрессия *FTO* в клетках НЕК293 приводит к уменьшению общего количества N6-метиладенозина в синтезируемых ими транскриптах. Кроме того, *FTO* привлекается к метилированным и неметилированным промоторам и усиливает присоединение к ДНК ССААТ-связывающих энхансерных белков (С\EBPs), одних из главных транскрипционных регуляторов адипогенеза. Таким образом, *FTO* служит ко-активатором транскрипции не только с активных, но и с заблокированных метилированием промоторных участков ДНК (Su, 2018).

FTO может деметилировать гены, участвующие в регуляции пищевого поведения и активировать их. Например, повышенная экспрессия *FTO* в культуре клеток MGN-3 и НЕК293Т уменьшает метилирование гена грелина, что ведет к увеличению количества его иРНК и ее белкового продукта. Грелин – один из гормонов, регулирующих пищевое поведение, усиливающий чувство голода (Wiemerslage, 2016).

Однонуклеотидные замены в гене *FTO* влияют на факторы транскрипции, регулирующие развитие адипоцитов. Адипоциты с полиморфизмом в *FTO* имеют измененный энергетический баланс - хранят больше энергии и производят меньше тепла (Wagner, 2017).

Существует несколько SNP гена *FTO*, связанных с регуляцией энергетического обмена и массы тела: rs992689, rs9939609, rs9930501, rs9930506, rs9940646, rs1421085, (Yang, 2017, Melhorn, 2018). Все они имеют интронное происхождение. Считается, что данные полиморфизмы не вызывают функциональные мутации и выполняют только регуляторную роль (Gulati, 2013).

Одним из самых важных и наиболее изучаемых в настоящее время однонуклеотидных полиморфизмов является *A23525T*, при котором в первом интроне гена *FTO* могут присутствовать аденин, либо тимин. Аллельная частота аллели А составляет в 39 % европейской популяции (Frayling, 2007). Исследования Verulava (2010) показали большее число первичных транскриптов гена *FTO* в клетках с А-аллелью, чем в гомозиготах по аллели Т.

Во многих работах указывают на связь полиморфизма *A23525T* с метаболическим синдромом (Шарипова, 2003, Wang, 2012, Liguori, 2014).

Полиморфизм *A23525T* гена *FTO* был связан с повышением массы тела и ИМТ у матерей до и после беременности (Kroll, 2018).

1.4 Эндотелиальная синтаза азота. Вклад полиморфизма *C786T* гена *NOS3* матери на развитие ЗРП

Оксид азота (NO) –важный биологический медиатор. Он запускает каскад биохимических реакций, которые приводят к расслаблению мускулатуры сосудов и увеличению кровотока, участвует в нейротрансмиссии, а также вырабатывается фагоцитами при уничтожении бактерий (Кириченко, 2019)

NO может регулировать концентрации гомоцистеина в плазме двумя способами: путем прямого ингибирования метионинсинтазы и через косвенное воздействие на катаболизм фолата. Таким образом, нормальная выработка оксида азота обеспечивает полноценное протекание клеточных процессов, а любое отклонение от нормы, как в меньшую, так и в большую сторону, будет приводить к развитию патологий.

NO был обнаружен в ткани плаценты в 1991 году. Оксид азота запускает релаксацию (вазодилатация) плацентарных сосудов, а также блокирует адгезию

тромбоцитов в межворсинчатом пространстве плаценты. Эндоплазматический ретикулум и ядерная оболочка поверхностного слоя трофобласта принимают участие в синтезе оксида азота. Имеется несколько исследований, доказывающих, что снижение уровня оксида азота приводит к началу маточной сократительной деятельности до 37 недели гестации (Duckitt, 2014, Tripathi, 2016). Во время беременности NO выполняет функции вазодилатации системной циркуляции матери и повышения маточного и фетоплацентарного кровотока в зависимости от потребностей плода. Также предполагают, что данный метаболит незначительно влияет на пупочный кровоток во время беременности. В оптимальной концентрации NO стимулирует процессы внутриутробного развития, дефицит приводит к остановке развития эмбриона, а избыток вызывает дегенерацию зародыша (Блашкив, 2004, Krause, 2011).

Исследования Tallares (2010) установили, что на протяжении беременности концентрация оксида азота в организме женщины возрастает, а снижение наступает только перед родами. При исследовании плаценты оксид азота выявляется в эндотелии сосудов пуповины и опорных ворсин, синцитиотрофобласте терминальных ворсин (Курочка, 2014). NO участвует в поддержании низкого маточноплацентарного давления и предотвращает развитие тромбоза межворсинчатого пространства (Tallares, 2010, Курочка, 2016).

В исследовании Бебяковой (2018) было обнаружено значительное снижение активности синтеза оксида азота в плацентах у женщин с задержкой развития плода и преэклампсией.

В синтезе NO принимают участие синтазы оксида азота (NOS). Данные ферменты катализируют реакцию L-аргинина с молекулярным кислородом в присутствии кофактора NADPH. В результате этой реакции образуются оксид азота и L-цитруллин. Кислород одновременно является и субстратом, и активатором NO- синтазы. Активность этого фермента также регулируется конечным продуктом, оксидом азота, что обеспечивает предотвращение повреждения тканей (Кириченко, 2019).

Субстратом для NOS может служить не только L-аргинин. Беловешкин в своей работе (2018) сообщает о том, что гомоаргинин, аргиниласпарагин, метиловый эфир аргинина, гуанидинотиолы также выполняют эту функцию. В случае недостатка субстрата синтаза оксида азота восстанавливает кислород с образованием супероксид-радикала и пероксида водорода. Такие условия могут быть следствием как нарушения транспорта аминокислоты (в некоторых тканях она не синтезируется), так и недостатка в пище, поскольку синтез L-аргинина при этом в организме не увеличивается.

NO-синтаза – это сложно устроенный гомодимер, состоящий из двух одинаковых субъединиц, к каждой из которых присоединено несколько кофакторов, определяющих каталитические свойства фермента: : НАДФ, ФАД, ФМН, гемовая группа, содержащая железо, кальмодулин, и тетрагидробиоптерин (BH4). Активным фермент становится только после объединения этих субъединиц (рисунок 3) (Сосунов, 2000).

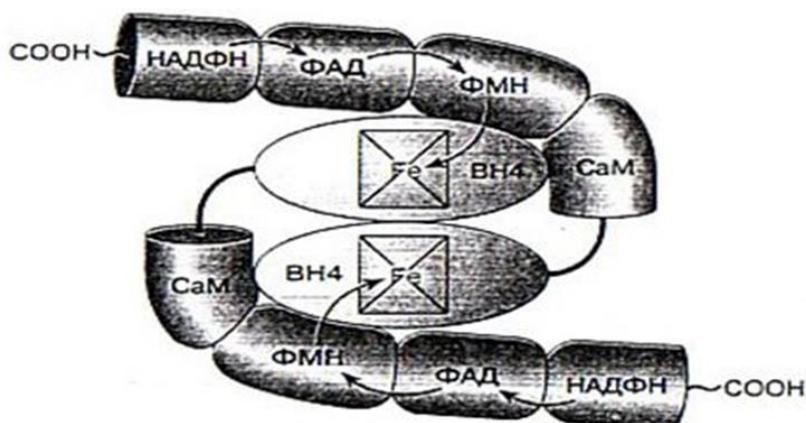


Рисунок 3 - Схематическое строение NOS

NO-синтазы представляют собой группу ферментов, которые различаются по аминокислотной последовательности белковой части молекулы и механизмам, регулирующим их активность. Тем не менее все ферменты данной группы катализируют одну и ту же реакцию с образованием NO. Впервые они были описаны в 1989 году (Юлдашева, 2004). В настоящее время хорошо изучена структура разных изоформ NO-синтазы, известны механизмы, регулирующие их

активность, и хромосомная локализация генов, ответственных за синтез ферментов, проведено клонирование (получение большого числа копий) этих генов, получены генетические модификации мышей без генов разных изоформ фермента (так называемые нокаут мыши) (Сосунов, 2000).

Существует множество групп клеток, способных синтезировать оксид азота. Наиболее изучены три группы клеток: нейроны, макрофаги, обладающие фагоцитарной активностью, и клетки эндотелия кровеносных сосудов. В соответствие с этим выделяют три основные изоформы NO-синтаз: нейрональную, макрофагальную и эндотелиальную (NOS1, NOS2, NOS3). Нейрональную и эндотелиальную изоформы (NOS1 и NOS3) называют конститутивными, так как они присутствуют в клетках постоянно. NOS2 синтезируется в ответ на внешние факторы, поэтому её называют индуцибельной.

Молекулы всех изоформ фермента NOS содержат N-терминальный оксигеназный домен и C-терминальный домен редуктазы. Домен оксигеназы с примерно 500 аминокислотными остатками включает участки для связывания гемовой группы, кофактора H4B и субстрата L-аргинина. Домен с редуктазной активностью, состоящий из 570-625 аминокислотных остатков, участвует в связывании молекул ФАД, ФМН и НАДФН. между этими доменами расположена последовательность из 30 аминокислотных остатков для связывания белка кальмодулина (CaM) – переносчика электронов с флавина на железо гемовой группы оксигеназы (Серая, 2002). При повышении содержания ионов кальция в клетке он присоединяется к молекуле NO-синтазы, что приводит к активации фермента и синтезу NO. Такое свойство фермента имеет большое значение для клеток, поскольку ферментативная активность, а значит, и синтез NO прямо зависят от функционального состояния клетки, определяющегося во многом внутриклеточным уровнем ионов кальция – высокоактивных посредников, влияющих на многие процессы в клетках.

Активность конститутивных изоформ фермента прямо зависит от внутриклеточной концентрации ионов кальция или кальмодулина и, таким

образом, повышается под влиянием различных агентов, приводящих к увеличению их уровня в клетке. Конститутивные изоформы NO-синтазы имеют преимущественно физиологическое значение, поскольку количество образуемого NO относительно невелико (Сосунов, 2000).

В настоящее время самой изучаемой является эндотелиальная NO-синтаза 3-го типа (NOS3). Она участвует в регуляции тонуса сосудов и кровотока, а также артериального давления.

Ангиогенез, определяемый как процесс развития новых сосудистых структур, является плацентарным фактором, играющим значимую роль в развитии ЗРП. Данный процесс характеризуется ветвлением новых микрососудов из более крупных кровеносных сосудов. Повреждение эндотелия приводит к усилению свертываемости крови и тромбоцитарному гемостазу. Такие состояния можно наблюдать при невынашивании беременности, плацентарной недостаточности, тяжелой преэклампсии, а также - антифосфолипидном синдроме (Бышевский, 1997).

Эндотелиальную NO-синтазу кодирует ген *NOS3*, локализован на хромосоме 7 в положении 7q36.1. Ген содержит 26 экзонов. Альтернативный сплайсинг и использование альтернативных промоторов могут приводить к множественным вариантам транскрипции. Промотор гена содержит несколько доменов, что означает возможность регуляции несколькими факторами транскрипции.

Экспрессия *NOS3* показана в тканях эмбриона и его оболочках (Al-Hijji, 2003). Исследование Pallares в 2010 по отключению гена *NOS3* в тканях эмбриона позволило ему сделать вывод, что ген является жизненно важным для развивающегося плода.

В гене *NOS3* выявлено несколько полиморфных сайтов. Одними из самых изученных являются полиморфизмы 4a/4b в 5-м интроне и в 7-й экзоне *G894T*, ведущий к замене глутаминовой кислоты на аспаргиновую (*Glu298Asp*).

Особое внимание следует уделить полиморфизму *786C/T* в промоторной области. Эта замена приводит к значительному угнетению активности гена и,

соответственно, к снижению синтеза эндотелиального NO, что может влиять на состояние гладкомышечных клеток сосудистой стенки (Rossi, 2003).

Вероятно, этот полиморфизм оказывая влияние на уровень активности NO, увеличивает риск развития ЗПП (Радьков, 2018).

1.5 Фактор роста эндотелия сосудов. Вклад полиморфизма C634G гена VEGFA матери на развитие ЗПП

Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) — группа сигнальных белков, основной функцией которых является участие в процессах ангио- и васкулогенеза.

Белки VEGF служат частью системы, отвечающей за восстановление подачи кислорода к тканям в ситуации, когда циркуляция крови недостаточна. К основным функциями VEGF можно отнести: создание новых кровеносных сосудов, усиление роста мышц после физических нагрузок. Белки VEGF играют важную роль в плацентарном росте и ее сосудистой системы.

Семейство VEGF состоит из пяти родственных белков — VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и плацентарного фактора роста (PlGF). Также был открыт белок VEGF, кодируемый вирусами (VEGF-E), и белок VEGF, который содержится в яде змей (VEGF-F).

На сегодняшний момент известно три тип рецепторов VEGF: VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3, которые относят к тирозинкиназной группе. Рецепторы данного семейства могут трансформироваться и фосфорилировать белки. Каждый рецептор имеет внеклеточную часть, состоящую из 7 иммуноглобулин-подобных областей, один трансмембранный участок и внутриклеточную часть с тирозинкиназным доменом.

Рецепторы VEGF локализуются преимущественно в эндотелиальных клетках и участвуют в регуляции ангиогенеза.

Взаимодействие VEGFA с рецептором VEGFR2 вызывает его фосфорилирование и активизацию, запуская внутриклеточные сигнальные механизмы, что ведет к увеличению пролиферации, миграции и

дифференциации эндотелиальных клеток, повышению сосудистой проницаемости и мобилизации предшественниц эндотелиальных клеток из костного мозга (Maharaj, 2007).

Нарушение ангио- и васкулогенеза по причине избытка или недостатка VEGF может привести к смерти эмбриона. Также к летальному исходу приводят гомозиготные мутации в рецепторах. Уровень экспрессии VEGF прогрессивно уменьшается после рождения, но он сохраняет большое значение в течение всей жизни (Гавриленко, 2017).

Наиболее важную роль в организме человека играет белок семейства VEGF, называемый VEGFA (рисунок 4). Это гликозилированный митоген, специфически действующий на эндотелиальные клетки. К эффектам VEGFA можно отнести опосредование повышенной сосудистой проницаемости, индуцирование ангио- и васкулогенеза, рост эндотелиальных клеток, стимулирование миграции клеток и ингибирование апоптоза. Он может перепрограммировать экспрессию генов, активизирующих ангиогенез и лимфангиогенез (Dvorak, 2002). VEGFA оказывает существенное влияние на развитие опухолевых, нервных и макрофагальных клеток.

VEGFA стимулирует высвобождение оксида азота и повышение уровня мРНК и белка NOS3 (Bouloumie, 1999). Активизация лигандом VEGFR2 стимулирует внутриклеточные PI3K/Akt, фосфорилирование серина и стабилизацию NOS3, повышая синтез NO в эндотелии и гладкомышечных клетках с активизацией гуанилаткасады и увеличением содержания цГМФ (циклического гуанозинмонофосфата), что индуцирует вазодилатацию. Повышение напряжения сдвига также стимулирует образование оксида азота (Hudlicka, 2009).

Аномалии васкулогенеза, ангиогенеза и псевдоваскулогенеза коррелируют с нарушениями плацентарного и фетального развития, наблюдаемыми при осложненных беременностях, таких как ЗРП.

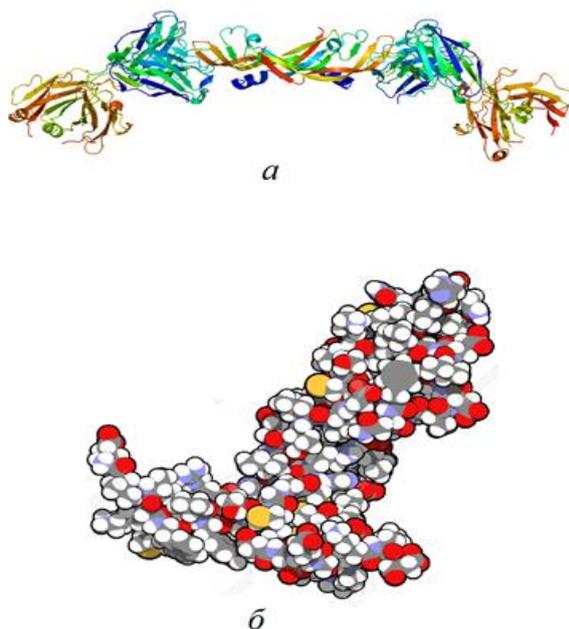


Рисунок 4 - VEGFA. а – линейная модель, б - атомы представлены в виде сфер

В исследованиях *in vitro* было показано, что VEGFA стимулирует митогенез эндотелиальных клеток и их миграции. VEGFA первоначально назвали «Сосудистым фактором проницаемости», так как он может усиливать и увеличивать проницаемость микрососудов» (Заридзе, 2000).

Считается, что VEGFA играет двойную роль в плаценте, действуя как на ангиогенез, так и на функцию трофобласта во время плацентарного развития. Вполне вероятно, что нормальный плацентарный ангиогенез зависит от регуляции сосудистого развития посредством сложных взаимосвязей между этими факторами и что они играют важную роль в развитии ЗРП.

Ген *VEGFA* располагается на коротком плече шестой хромосомы, имеет 8 экзонов. В результате альтернативного сплайсинга образуется несколько изоформ: *VEGF121*, *VEGF145*, *VEGF165*, *VEGF183*, *VEGF189*, *VEGF206*, (цифра обозначает количество аминокислот в составе белка) (Ferrara, 2002). Наиболее распространены изоформы *VEGF121* и *VEGF165*. Изоформа 121 хорошо растворима и не образует связей с HSPG (гепарансульфат протеогликан). Изоформа 165 имеет рН >7, низкий уровень растворимости и хорошо связывается с HSPG (Fuster, 2011). Значительная часть *VEGFA165* остается в

связанном состоянии на поверхности клетки или во внеклеточном матриксе. Нарушение синтеза шести терминальных аминокислот, кодируемых восьмым экзоном гена *VEGFA*, приводит к существенному изменению свойств *VEGFA*, влияя на его соединение с рецепторами и активацию последних. *VEGFA* экспрессируется практически во всех тканях (Grosskreutz, 1999, Sawano, 2001).

В исследовании Szentpeteri (2013) была определена сверхэкспрессия гена *VEGFA* в 101 плаценте при ЗРП в сравнении с 140 плацентами при физиологически протекающей беременности, что авторы объясняют компенсаторным механизмом в ответ на гипоксию.

Известно более тридцати вариантов полиморфизма единичного нуклеотида гена *VEGFA*.

С развитием ЗРП и других гестационных осложнений (самопроизвольный выкидыш, кровотечение во время беременности, преждевременные роды, преэклампсия) связаны два полиморфизма: *VEGFA* -2578 *A>C* и *VEGFA* -634 *G>C* (Александрова, 2013).

Эти однонуклеотидные вариации в области промотора сопровождается снижением уровня экспрессии белка. В работе Salimi (2016) была доказана взаимосвязь полиморфизма *G(-634)C* с развитием тяжелой ранней преэклампсии. По данным проекта «1000 Genomes» частота встречаемости минорного аллеля *G(-634)C* составляет до 40 % и связана с серьезными гестационными осложнениями.

А исследованиях Ганьжа (2017) в группе пациенток с ПНБ отмечалось статистически значимое повышение частоты генотипа *(-634)C/C* гена *VEGFA* по сравнению с контрольной группой.

По данным российских исследователей (Самоходская, 2009, Чуманова, 2017) выявлена ассоциация аллели *C* полиморфизма *G(-634)C* с развитием таких осложнений беременности, как преэклампсия, синдром потери плода, ЗРП, ФПН.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Объектом исследования служили образцы ДНК, выделенной из цельной крови 66 беременных женщин в возрасте от 18 до 43 лет. Среди них – 36 женщин с задержкой развития плода и 30 здоровых женщин. Работа проводилась на базе лаборатории «Биомедицина» Академии биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского Южного Федерального университета.

2.2 Выделение ДНК методом сорбционной экстракции на silica-spin колонках

Использовали метод колоночного выделения ДНК из цельной крови. Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Основные этапы выделения ДНК:

1. Раствор для лизиса прогрели до полного растворения кристаллов при 65 °С.
2. Отобрали необходимое количество одноразовых пробирок типа «Эппендорф» с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль выделения). Добавили в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса и промаркировали их.
3. В пробирки с раствором для лизиса внесли по 100 мкл цельной крови, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку с отрицательным контролем внесли 100 мкл ОКО.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешали на вортексе, центрифугировали в течение 5 с для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогрели 5 мин при 65 °С в термостате.
5. Добавили в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешали на вортексе.
6. Центрифугировали пробирки на вортексе в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

7. Отобрали надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

8. Добавили в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыли крышки, осторожно промыли осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

9. Процентрифугировали при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на вортексе.

10. Осторожно отобрали надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

11. Добавили в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыли крышки и осторожно промыли осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Процентрифугировали при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на вортексе.

13. Осторожно отобрали надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

14. Поместили пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка.

15. Добавили в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешали на вортексе. Поместили в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

16. Процентрифугировали пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР. Очищенная РНК/ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

2.3 Постановка аллель-специфической ПЦР в реальном времени

Для успешного осуществления ПЦР необходимо, чтобы 3'-концевой нуклеотид праймера был комплементарен соответствующему нуклеотиду матричной цепи ДНК. В противном случае эффективность удлинения цепи во время анализа резко снижается и может полностью отсутствовать при определенных сочетаниях ошибочно спаренных нуклеотидов. Данная

особенность полимеразной цепной реакции является основой метода обнаружения полиморфизмов с помощью аллель-специфической ПЦР.

Детекцию однонуклеотидного полиморфизма *A23525T* гена *FTO* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флюоресцентными метками и автоматической регистрацией результатов реакции в режиме реального времени (RT-PCR) с использованием набора реагентов SNP-экспресс (Литех, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Ход работы:

1. Подготовили пронумерованные пробирки емкостью 0,2 мл для проведения амплификации. Использовали две пробирки для каждой пробы – 1 (аллель 1) и 2 (аллель 2).

2. Готовили рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

17,5 мкл разбавителя;

2,5 мкл реакционной смеси;

0,2 мкл красителя SYBB Green;

0,2 мкл Таq-полимеразы.

Готовили две рабочие смеси: с реакционной смесью «аллель 1» и с реакционной смесью «аллель 2». Перемешивали смесь пипетированием.

3. Добавляли по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки для амплификации.

4. Вносили по 5 мкл образца ДНК в пробирку с рабочей амплификационной смесью «аллель 1» и в пробирку с рабочей амплификационной смесью «аллель 2». В качестве отрицательного контрольного образца вносили разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

5. Закрытые пробирки центрифугировали в течение 3-5 секунд при 3000 об/мин при комнатной температуре на вортексе.

6. Переносили пробирки в прибор «CFX 96» (BioRad) для проведения реакции амплификации. Программа амплификации:

93 °С – 1 минута;

35 циклов

93 °С–10 секунд;

64 °С–10 секунд;

72 °С –20 секунд;

При проведении анализа использовали канал детекции красителя FAM. Результат считали положительным, если значение FAM Ct образца меньше 27, и отрицательным, если значение FAM Ct образца больше 30.

2.4 Постановка аллель-специфической ПЦР в реальном времени одношаговым методом

Для исследования полиморфизмов *Arg223Gln (LEPR)* и *C786T (NOS3)* использовали наборов реагентов SNP-экспресс (Литех, Москва) для проведения реакции ПЦР одношаговым методом (OneStep) в соответствии с инструкциями производителя. Особенность данного метода заключается в том, что для проведения анализа требуется внесение только исследуемого образца в готовые к использованию ПЦР пробирки 0,5мл с амплификационной смесью.

В реакционной смеси содержатся праймеры, необходимые для амплификации участка, содержащего полиморфизм, и два аллель-специфичных гидролизных зонда, содержащих полиморфный сайт. Дискриминация аллелей осуществляется за счёт различной эффективности разрушения Taq-полимеразой полностью и неполностью комплементарного зонда.

Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллели №1; гетерозигота; гомозигота по аллели № 2.

Ход работы:

1. Расставили необходимое количество пробирок в соответствии с заранее подготовленным протоколом, полностью разморозили содержимое всех пробирок

2. Добавили во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель из комплекса набора;
- в пробирки положительных контрольных образцов – положительные контрольные образцы ДНК из комплекса используемого набора.

3. Пробирки закрыли и центрифугировали в течение 3-5 секунд при 3000 об/мин на вортексе.

4. Переносили пробирки в прибор «CFX 96» (BioRad) для проведения реакции амплификации.

Программа амплификации для *Arg223Gln (LEPR)*: 94 °C – 1 минута; 35 циклов: 94 °C – 10 секунд, 57 °C – 15 секунд, 74 °C – 20 секунд; 72 °C – 2 минуты.

Программа амплификации для *C786T (NOS3)*: 80 °C- 2 минуты, 94 °C – 3 минуты; далее 40 циклов: 94 °C – 15 секунд, 64°C – 40 секунд.

Зонд, содержащий полиморфизм аллель 1, мечен флуорофором HEX, аллель 2 – флуорофором FAM.

Результат считали положительным, если значение C_t образца меньше 27, и отрицательным, если значение C_t образца больше 30.

2.5 Методы статистического анализа результатов исследования

Репрезентативность выборки оценивали с помощью закона Харди-Вайнберга. Ожидаемые частоты аллелей и генотипов определяли с помощью расчета χ^2 на калькуляторе равновесия Харди-Вайнберга, включающий анализ погрешности определения <http://www.husdyr.kvl.dk>.

Оценку различий в распределении полиморфных вариантов генов в обследованных группах осуществляли по критерию χ^2 при помощи программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль». О риске развития ЗРП судили по отношению шансов OR, которое вычисляли при

помощи программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль». OR указан с 95 %-ым доверительным интервалом CI.

Для оценки межгенных взаимодействий использовали алгоритм снижения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR), который оценивал все возможные комбинации изученных полиморфных локусов в отношении риска развития ЗРП. Метод MDR применяется для изучения характера межгенных взаимодействий, генетических исследований мультифакториальных полигенных заболеваний с использованием относительно небольших объемов выборок больных и здоровых.

Эффекты различных комбинаций SNP трансформируются в суммарные статистики повышенного и пониженного риска по каждой n- комбинации маркеров. Затем на основании лучшей модели генерируется 10 случайных выборок, для каждой из которых рассчитывается по 2 параметра: воспроизводимость модели и точность предсказания. Осуществляется переход от n- мерного пространства всех единичных полиморфных участков и фенотипа к двумерному.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование частоты регистрации генотипов и аллелей по полиморфизму *Arg223Gln* гена *LEPR* у женщин с задержкой развития плода

Лептин- гормон, чьей основной функцией является регуляция аппетита и массы тела. В процессе регуляции липидного обмена он взаимодействует с меланоконцентрирующим гормоном, который обладают аноректическим действием (Sinha, 1998).

Наблюдается тенденция снижения концентрации лептина в крови беременных женщин, имеющих задержку развития плода (Тришкин, 2012).

Было неоднократно обнаружено, что лептин положительно связан с другими факторами (например, инсулином и IGF-I), которые, как хорошо известно, связаны с внутриматочным ростом.

Исследование распределения частот генотипов и аллелей по полиморфизму *Arg223Gln* гена *LEPR* оказалось, указывает на соответствие равновесию Харди-Вайнберга в обеих группах (таблицы 1,2).

Таблица 1 – Тест Харди-Вайнберга для здоровых женщин

Генотипы	Контроль	Равновесие Харди-Вайнберга	χ^2	p
	n = 26			
A/A	0,42	0,36	2.05	0.6
G/A	0,35	0,48		
G/G	0,23	0,16		

Было установлено преобладание аллели А как у больных (52 %), так и у здоровых женщин (60 %). Отношение шансов составило 0,726 (CI 95 % 0,647-2,935) (рисунок 5)

Таблица 2 – Тест Харди-Вайнберга для женщин с ЗРП

Генотипы	ЗРП	Равновесие Харди-Вайнберга	χ^2	p
	n = 29			
A/A	0,34	0,2704	2.78	0.52
G/A	0,34	0,4992		
G/G	0,31	0,2304		

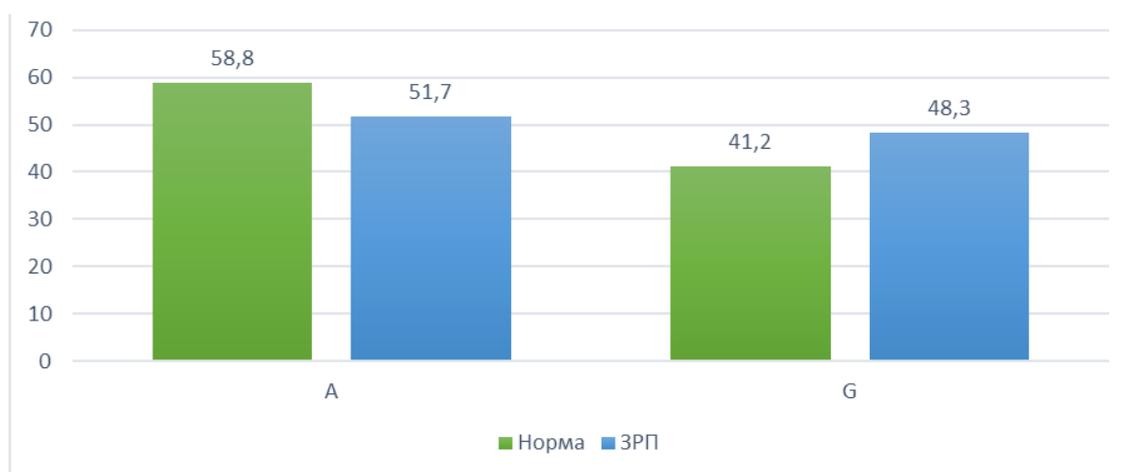


Рисунок 5 – Распределение частот аллелей полиморфизма *Arg223Gln* гена *LEPR* у женщин с ЗРП и в контрольной группе (в %)

Частота встречаемости доминантный гомозиготного генотипа *AA* в контрольной группе примерно на 8 % выше, чем в группе женщин с ЗРП. Встречаемость гетерозигот *AG* в группе с ЗРП ниже на 1 %. Частота встречаемости гомозигот *GG* среди больных женщин в 1,35 раза выше, чем частота таких же гомозигот в группе здоровых женщин (рисунок 6).



Рисунок 6 – Распределение частот генотипов полиморфизма *Arg223Gln* гена *LEPR* у женщин с ЗРП и в контрольной группе (в %)

В результате анализа нами не было выявлено статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов по полиморфизму *Arg223Gln* гена *LEPR* между группой женщин с ЗРП и контрольной группой ($\chi^2 = 0.691(0.538)$, $p = 0.406 (0.765)$) (таблица 3).

Таблица 3 - Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму *Arg223Gln* гена *LEPR*

Аллели	ЗРП	Контрольная группа	χ^2	p	OR	
	n = 29	n = 26			Знач.	95 % CI
G	0.48	0.40	0.691	0.406	0,726	0,647-2,935
A	0.52	0.60			1,378	0,341-1,546
A/A	10 (0.34)	11 (0.42)	0.538	0.765	1.393	0.468-4.151
A/G	10 (0.34)	9 (0.35)			1.006	0.330-3.062
G/G	9 (0.31)	6 (0.23)			0.667	0.200-2.224

OR-отношение шансов, CI – 95 % доверительный интервал

Распространенность полиморфизма *Arg223Gln* гена *LEPR* в европейской популяции – 55 %.

Работ, демонстрирующих связь между полиморфизмом *Arg223Gln* гена *LEPR* и задержкой развития плода немного, однако, некоторые из них вызывают особый интерес.

Например, исследование Marginean (2016) показало статистически значимую связь между наличием у матери генотипа *GG* полиморфизма *Arg223Gln* и низкой массой плода и новорожденного. Дети, рожденные от матерей с генотипом *GG* имели более низкую массу тела при рождении, в то время как женщины с генотипом *AA* рожали с высоким ИМТ. Кроме того, в работе было замечено, что ИМТ матери оказывал существенное влияние на ИМТ новорожденных, изменяя эффект *LEPR*.

Souren с коллегами в своем исследовании (2008) на 396 монозиготных и 232 дизиготных близнецах заметили, что дети, рожденные от матерей-носителей *G*-аллели имели более низкую массу тела при рождении. Однако, исследование Rand с соавторами (2001) не выявило никакой корреляции между полиморфизмом *Arg223Gln* гена *LEPR* у матери и массой тела ребенка при рождении.

3.2 Исследование частоты регистрации генотипов и аллелей по полиморфизму *A23525T* гена *FTO* у женщин с задержкой развития плода

Белок *FTO*, кодируемый геном *FTO*, относится к группе 2- α -кетоглутаратзависимых диоксигеназ. Нарушение нормальной работы гена *FTO* приводит к разнообразным патологическим последствиям, в том числе к замедлению постнатального роста, снижению массы, различным патологиям внутренних органов (Voissel, 2009).

Распределение частот генотипов по полиморфизму *A23525T* гена *FTO* соответствует равновесию Харди-Вайнберга в контрольной группе (таблица 4).

Таблица 4 – Тест Харди-Вайнберга для контрольной группы

Генотипы	Здоровые женщины	Равновесие Харди-Вайнберга	χ^2	p
	n = 21			
<i>A/A</i>	0,43	0,4096	0.09	0.64
<i>G/A</i>	0,43	0,4608		
<i>G/G</i>	0,14	0,1296		

Как следует из данных таблице 5, среди женщин с ЗРП равновесие Харди-Вайнберга также соблюдается.

Таблица 5 – Тест Харди-Вайнберга для женщин с ЗРП

Генотипы	ЗРП	Равновесие Харди-Вайнберга	χ^2	p
	n = 28			
<i>A/A</i>	0,29	0,3481	1.81	0.59
<i>G/A</i>	0,61	0,4838		
<i>G/G</i>	0,11	0,1681		

Анализ показал преобладание аллели А как у больных (59 %), так и у здоровых женщин (64 %) с отношением шансов равным 0.797 (СІ 95 % 0.349-1.820) (рисунок 7).

Генотип *AA* у женщин с ЗРП встречался на 14 % реже, чем в контрольной группе. Частота встречаемости гетерозиготного генотипа *AT* в группе женщин с ЗРП примерно на 18 % выше, чем в контрольной группе (рисунок 8). Частота встречаемости генотипа *TT* среди здоровых женщин примерно на 3 % выше, чем в группе женщин с задержкой развития плода.

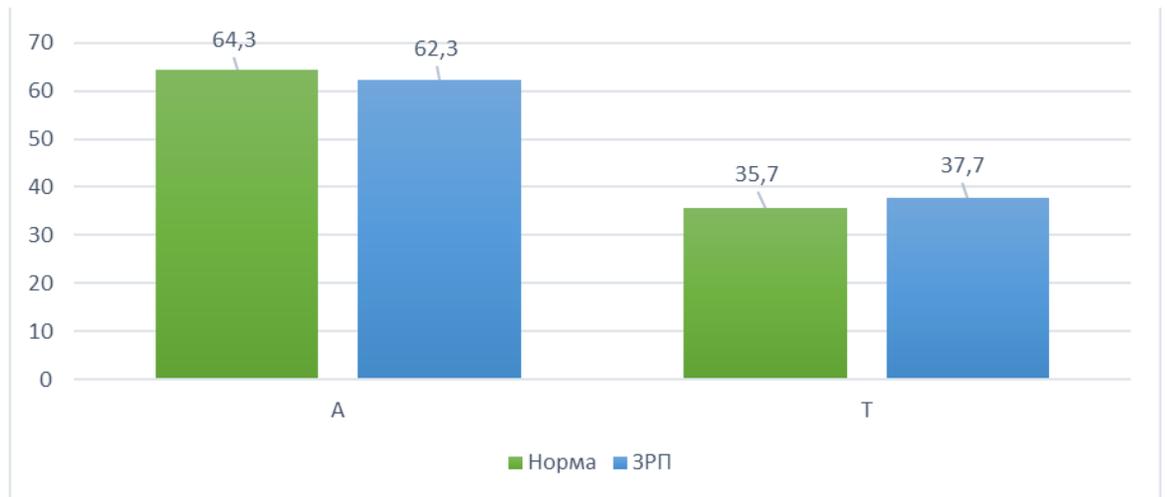


Рисунок 7 – Распределение частот аллелей полиморфизма *A23525T* гена *FTO* у женщин с ЗРП и в контрольной группе (в %)

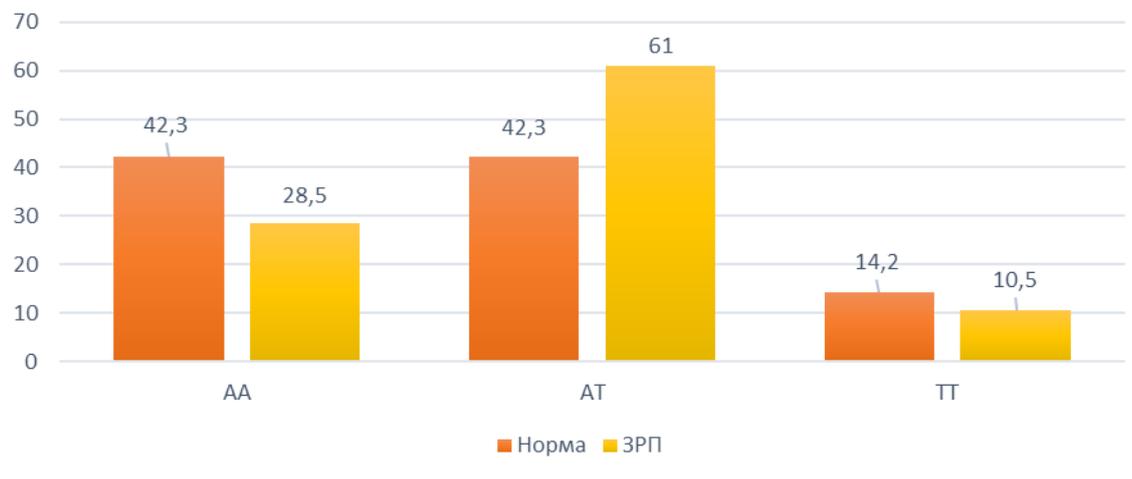


Рисунок 8 – Распределение частот генотипов полиморфизма *A23525T* гена *FTO* у женщин с ЗРП и в контрольной группе (в %)

В распределении частот аллелей и генотипов по полиморфизму *A23525T* гена *FTO* статистически значимых различий между контрольной группой и группой женщин с ЗРП выявлено не было ($\chi^2=0,290$ (1,552), $p=0,591$ (0,461)) (таблица 6).

Таблица 6 - Распределение частот аллелей и генотипов
по полиморфизму *A23525T* гена *FTO*

Аллели	ЗРП	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 28	n = 21			Знач.	95 % CI
<i>A</i>	0.59	0.64	0.290	0.591	0,797	0,349-1.820
<i>T</i>	0.41	0.36			1,255	0,549-2.865
<i>A/A</i>	8 (0.29)	9 (0.43)	1.552	0.461	0.533	0.162-1.755
<i>A/T</i>	17 (0.61)	9 (0.43)			2.061	0.653-6.507
<i>T/T</i>	3 (0.11)	3 (0.14)			0.720	0.130-3.986

Примечание: OR-отношение шансов, CI – 95 % доверительный интервал

Частота встречаемости аллели *A* полиморфизма *A23525T* гена *FTO* в европейской популяции – 39 %. Многие из доступных источников демонстрируют ассоциацию данного полиморфизма с задержкой развития плода, имеются интересные данные относительно носительства генотипа *AA* матери и низкой массой тела новорожденного.

Например, в работе Marginean (2016) была показана связь между носительством аллеля *A* у матери и низкой массой тела ребёнка в румынской популяции. Новорожденные, имеющие генотип *AA* гена *FTO* имели более низкий ИМТ. Кроме того, более низкие показатели ИМТ ($p = 0,042$) наблюдались у новорожденных носителей генотипа *TT*, матери которых имели генотип *AA + AT*.

Также исследования Andraweera (2016) подтверждают то, что генотип *AA* полиморфизма rs9939609 гена *FTO* связан с повышенным риском развития ЗРП. Согласно исследованию, помимо массы плода, материнский генотип *AA* полиморфизма *A23525T* гена *FTO* был ассоциирован со снижением массы плаценты.

3.3 Исследование частоты регистрации генотипов и аллелей по полиморфизму *C786T* гена *NOS3* у женщин с задержкой развития плода

Оксид азота (NO) важный эндогенный вазодилататор, синтезируемый эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) из L-аргинина. NOS3 помимо эндотелия была обнаружена в клетках эпителия и кардиомиоцитах (Tanus-Santos, 2002, Song, 2003). Мутации в гене *NOS3* могут влиять на синтез NO и, соответственно, на ангиогенез.

Как следует из данных в таблице 7, распределение частот генотипов по полиморфизму *C786T* гена *NOS3* не соответствует равновесию Харди-Вайнберга в группе женщин с ЗРП за счет увеличения доли гомозигот по аллелю T. В группе здоровых женщин равновесие Харди-Вайнберга соблюдается (таблица 8).

Таблица 7 – Тест Харди-Вайнберга для женщин с ЗРП

Генотипы	Женщины с ЗРП	Равновесие Харди-Вайнберга	χ^2	p
	n = 36			
<i>CC</i>	0.25	0.08	22.9	0.29
<i>CT</i>	0.08	0.41		
<i>TT</i>	0.67	0.50		

Таблица 8 – Тест Харди-Вайнберга для контрольной группы здоровых женщин

Генотипы	Здоровые женщины	Равновесие Харди-Вайнберга	χ^2	p
	n = 30			
<i>CC</i>	0.40	0.36	0.83	0.60
<i>CT</i>	0.40	0.48		
<i>TT</i>	0.20	0.16		

В таблице 9 приведены частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *C786T* гена *NOS3* среди больных женщин с ЗРП и контрольной группой.

Таблица 9 - Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму *C786T* гена *NOS3*

Аллель, генотип	ЗРП	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 36	n = 30			Знач.	95 % CI
<i>C</i>	0.29	0.60	3,841	0.093	0,696	0,459-1,067
<i>T</i>	0.71	0.40			1,437	0,937-2,203
<i>C/C</i>	9(0.25)	12(0.40)	16.22	<0,001	0,714	0,413-1,236
<i>C/T</i>	3(0.08)	12(0.40)			0,309	0,110-0,868
<i>T/T</i>	24(0.67)	6(0.20)			2,400	1,462-3,339

Примечание: OR-отношение шансов, CI - 95% доверительный интервал

По результатам, которые приведены в таблице 9, наблюдается преобладание аллели *T* у больных женщин (71 %). У здоровых женщин аллель *A* встречалась в 40 % случаев. Частота встречаемости аллели *C* у женщин контрольной группы в 2 раза выше, чем в группе с ЗРП.

У больных с ЗРП частота встречаемости гомозигот *CC* гена *NOS3* на 15 % ниже, чем в контрольной группе. Частота встречаемости гетерозигот *CT* среди здоровых женщин в 5 раз выше, чем в группе женщин с ЗРП. Частота встречаемости гомозигот *TT* среди больных ЗРП в 3,35 раза выше, чем частота встречаемости их в группе здоровых женщин (рисунки 9,10).

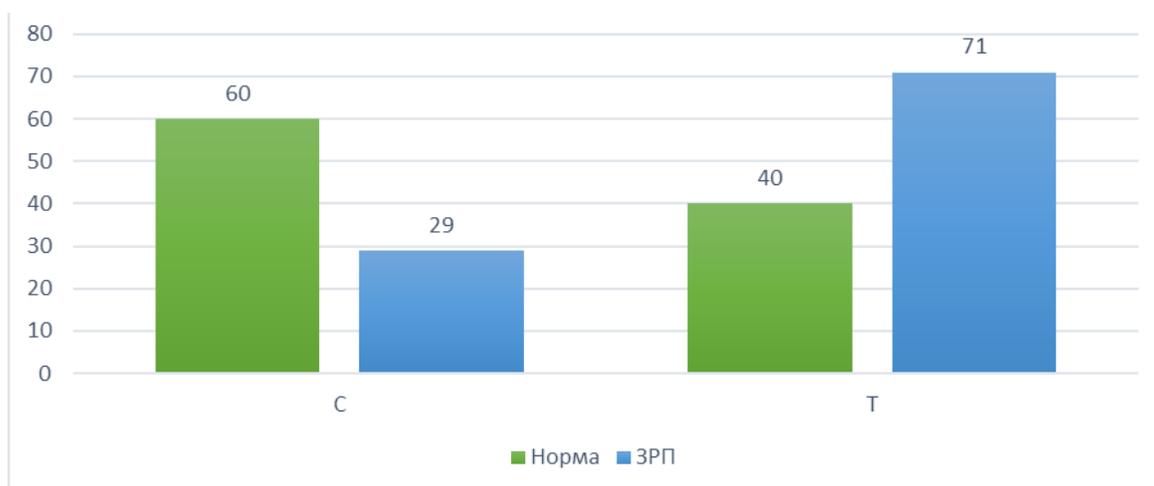


Рисунок 9 – Распределение частот аллелей полиморфизма 786C/T гена NOS3 у женщин с ЗРП и в контрольной группе (в %)

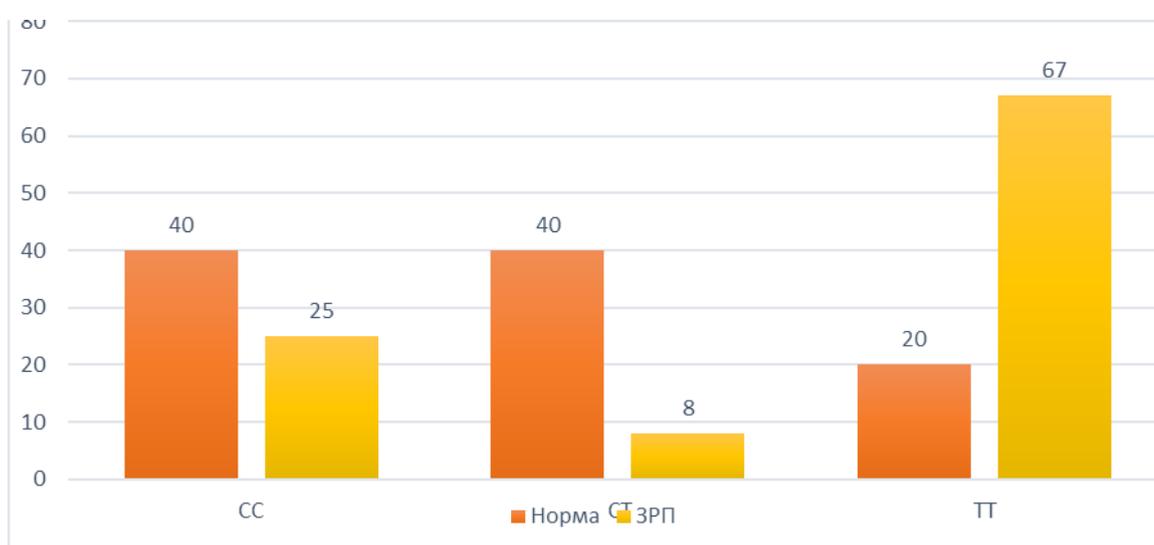


Рисунок 10 – Распределение частот генотипов полиморфизма C786T гена NOS3 у женщин с ЗРП и в контрольной группе (в %)

Были выявлены статистически значимые различия в частоте встречаемости генотипов *CT* и *TT* полиморфизма *C786T* гена *NOS3* у женщин с ЗРП и контрольной группы ($p < 0,001$ $\chi^2 = 16,22$). Отношение шансов развития ЗРП у женщин с генотипом *CT* составляет 0,309 (CI 95 % 0,110-0,868 $p < 0,001$). Это свидетельствует о том, что данный генотип можно назвать протекторным, так как он связан с низким уровнем риска развития ЗРП.

Отношение шансов развития ЗРП у женщин с *TT* генотипом составляет 2,4 (CI 95% 1,462-3,339 $p < 0,001$). Таким образом, генотип *TT* связан с высоким уровнем риска развития заболевания.

Частота встречаемости аллеля Т полиморфизма *C786T* гена *NOS3* в европейской популяции составляет примерно 40 % (Назаренко, 2012).

Исследование Малышкиной (2016) не выявило достоверных отличий в генотипических частотах данного полиморфизма гена *NOS3* у женщин с гестационными осложнениями.

Полиморфизм *C786T* гена *NOS3* связан с фетоплацентарной недостаточностью у беременных женщин с связи со снижением уровня NO, что приводит к нарушению вазодилатации сосудов.

Однако, существуют данные, устанавливающие связь полиморфизма *C786T* гена *NOS3* с различными акушерскими патологиями (невынашивание беременности, преэклампсия, плацентарная недостаточность, ЗРП плода) (Назаренко, 2012).

Аллельный вариант *C786T* гена *NOS3* относится к значимо ассоциированным с преэклампсией в европейской и монголоидной популяциях. Генотип *CC* в якутской популяции является протективным (Трифенова, 2014).

Исследование Заварина (2011) показало более высокую частоту генотипа *TT* гена *NOS3* у женщин с ЗРП по сравнению с контрольной группой, что указывает на взаимосвязь генотипа *TT* гена *NOS3* с задержкой развития плода.

3.4 Анализ межгенных взаимодействий

Задержка развития плода относится к мультифакторным заболеваниям, соответственно, сочетания аллелей генов имеют важное значение для оценки их практической значимости в патогенезе заболевания.

Для оценки совместного вклада полиморфизмов исследуемых генов был проведен анализ межгенных взаимодействий в программе MDR. Если согласованность (Cross Validation Consistency) модели межгенных взаимодействий не меньше 6/10, то её можно считать валидной. Модели

характеризуются коэффициентом перекрестной проверки CV (cross-validation) и степенью взаимодействия генов.

В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов *LEPR*, *FTO* и *NOS3* в развитии ЗРП была установлена одна статистически значимая модель (таблица 10).

Таблица 10 – Модель межгенных взаимодействий при ЗРП. Рассчитано с помощью программы MDR

Комбинации генов в модели	Тестируемое взаимодействие генов	Воспроизводимость модели	χ^2 (p)	OR (95 % CI)
<i>LEPR</i> (<i>Arg223Gln</i>), <i>FTO</i> (<i>A23525T</i>), <i>NOS3</i> (<i>C786T</i>)	0,4071	10/10	11,59 (p = 0,0007)	44,0 (3,38 – 573,4)

Трехлокусную модель «*LEPR* (*Arg223Gln*), *FTO* (*A23525T*), *NOS3* (*C786T*)» можно назвать значимой, так как её воспроизводимость составляет 10/10 (таблица 10).

На рисунке 11 показано распределение частот генотипов для трехлокусного взаимодействия генов *LEPR*, *FTO*, *NOS3* при ЗРП.

Согласно модели, представленной на рисунке 11, повышенный риск развития ЗРП характерен для людей, являющихся гетерозиготами по полиморфизмам *A23525T* гена *FTO* и *Arg223Gln* гена *LEPR* и гомозиготами по аллели *786T* гена *NOS3* (рисунок 11, красная стрелка).

Данный генотип может индуцировать риск развития ЗРП, так как носительство аллели А по полиморфизму *A23525T* гена *FTO* у матери связано с низкой массой плода. Гетерозиготы по полиморфизму *Arg223Gln* гена *LEPR*

имеют промежуточный уровень гормона в крови, который может служить дополнительным фактором в развитии заболевания.

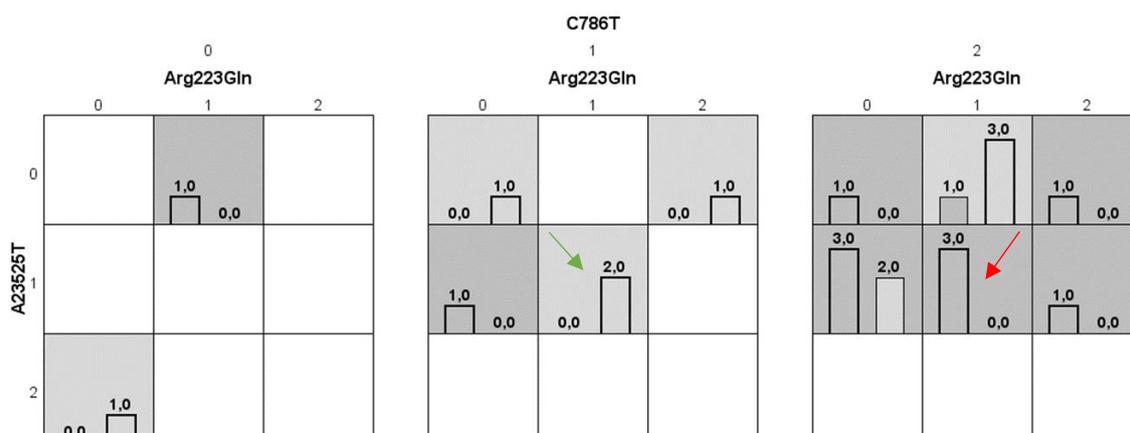


Рисунок 11 - Распределение частот трехлокусных сочетаний генотипов генов *LEPR*, *FTO*, *NOS3* среди людей, больных ЗПП (темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые ячейки – генотипы пониженного риска, белые ячейки – отсутствие данного генотипа, левые столбики в ячейках – пациенты с ЗПП, правые столбики в ячейках – контроль; 0 – гомозиготы по аллели 1, 1- гетерозиготы, 2 – гомозиготы по аллели 2; красной стрелкой указан пример генотипа повышенного риска, зеленой - низкого)

Исходя из модели, изображенной на рисунке 11, пониженный риск развития ЗПП характерен для женщин, являющихся гетерозиготами по всем исследуемым полиморфизмам, а именно с генотипом *Arg223Gln* гена *LEPR*, *A23525T* гена *FTO* и *C786T* гена *NOS3* (рисунок 11, зелёная стрелка). Так как все они гетерозиготны, нормальная и мутантная аллели генов нивелируют эффект друг друга, тем самым поддерживая нормальную массу плода.

Результаты анализа позволили выявить наличие синергизма между полиморфизмами *C786T* гена *NOS3* и *Arg223Gln* гена *LEPR* (21,74 %) (рисунок 12). Комбинация полиморфизмов *C786T* гена *NOS3* и *A23525T* гена *FTO* тоже вносит определенный вклад в патогенез заболевания (8,28 %). Аддитивный эффект имеет сочетание двух полиморфизмов *Arg223Gln* гена *LEPR* и *A23525T* гена *FTO* (2,39 %). Наибольшей информационной ценностью обладает полиморфизм *C786T* гена *NOS3* (11,29 %).

Следовательно, взаимодействие полиморфных локусов генов *LEPR* (*Arg223Gln*), *FTO* (*A23525T*), *NOS3* (*C786T*) играет существенную роль в формировании ЗРП. Суммарная информационная ценность данных генов составляет 20,94 %.

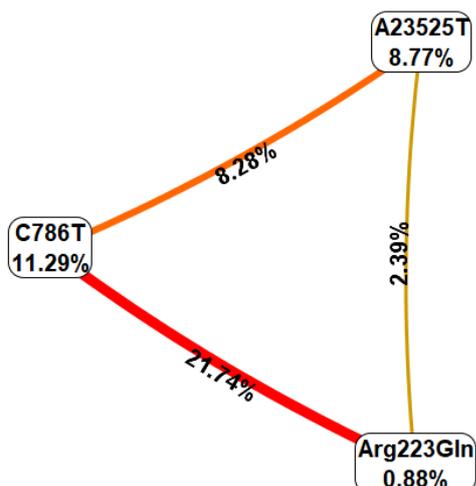


Рисунок 12 - Графическое представление результатов анализа взаимодействия между полиморфизмами *Arg223Gln* гена *LEPR*, *A23525T* гена *FTO*, *C786T* гена *NOS3* среди женщин с задержкой развития плода. На вершинах ромба указана информационная ценность каждого полиморфизма в отдельности, на ребрах – информационная ценность взаимодействия двух полиморфизмов. Красным цветом – выраженный синергизм, оранжевый – умеренный синергизм, коричневый – аддитивное взаимодействие.

ВЫВОДЫ

1) По результатам исследования нами не были выявлены статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов по полиморфизму *Arg223Gln* гена *LEPR*.

2) Статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов по полиморфизму *A23525T* гена *FTO* выявлено не было.

3) Были выявлены статистически значимые различия в распределении у женщин генотипов *CT* и *TT* полиморфизма *C786T* гена *NOS3* ($p < 0,001$ $\chi^2 = 16,22$). Отношение шансов развития ЗРП у женщин с генотипом *CT* составляет 0,309 (CI 95 % 0,110-0,868 $p < 0,001$). Это свидетельствует о том, что данный генотип можно назвать протекторным, так как он связан с низким уровнем риска развития ЗРП.

4) Отношение шансов развития ЗРП у женщин с *TT* генотипом составляет 2,4 (CI 95 % 1,462-3,339 $p < 0,001$). Таким образом, генотип *TT* связан с высоким уровнем риска развития заболевания.

5) В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов *LEPR*, *FTO*, *NOS3* был выявлен генотип повышенного риска развития ЗРП: гетерозиготы по полиморфизмам *A23525T* гена *FTO* и *Arg223Gln* гена *LEPR* и гомозиготы по аллели *786T* гена *NOS*.

6) В результате анализа межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов *LEPR*, *FTO*, *NOS3* был выявлен генотип пониженного риска развития ЗРП: гетерозиготы по всем исследуемым полиморфизмам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Александрова Н. В. Состояние системы мать-плацента-плод, течение и исходы беременности, наступившей с использованием вспомогательных репродуктивных технологий: Автореф. дис... канд. мед. наук. – М., 2013.– 225 с.
2. Бебякова Н. А. Роль полиморфизма-786т> с гена эндотелиальной NO-синтазы в формировании факторов риска развития артериальной гипертензии // Экология человека. – 2018. –Т. 224, №. 4. – С. 36-42.
3. Бебякова Н. А. Метаболический синдром у женщин (патофизиология и клиника). – СПб.: МАПО, 2005. – 275 с.
4. Блашквив Т. В., Вознесенская Т. Ю. Влияние ингибиторов NO-синтаз на показатели эмбриональной гибели пре- и постимплантационных эмбрионов мышей // Онтогенез. – 2004. – Т. 35, №. 5. – С. 346-349.
5. Бышевский А. Ш. и др. Влияние антиоксидантов на интенсивность перекисного окисления липидов, агрегацию тромбоцитов, модифицированную прооксидантом, тромбином или антиагрегантом // Здравоохр. Башкортостана. – 1997. – №. 3. – С. 11.
6. Волкова Е. В., Копылова Ю. В. Роль сосудистых факторов роста в патогенезе плацентарной недостаточности // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2013. – Т. 7, №. 2. – С. 29-33.
7. Гавриленко Т. И., Рыжкова Н. А., Пархоменко А. Н. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в клинике внутренних заболеваний и его патогенетическое значение // Украинский кардиологический журнал. – 2017. – Т. 11, №. 4. – С. 87-95.
8. Заварин В. В., Радьков О. В., Калинин М. Н. Полиморфизм модулирующих эндотелий-зависимую вазодилатацию генов при гестозе // Верхневолжский медицинский журнал. – 2011. – Т. 9, №. 3. – С. 20-22.
9. Курочка М. П. Патогенез, прогнозирование и доклиническая диагностика преэклампсии: Автореф. дис... канд. мед. наук. – М., 2014.– 144 с.
10. Курочка М. П., Волокитина Е. И. Сравнительная оценка адаптационных возможностей плодов и новорожденных у беременных с

отсутствием и наличием гипертензионных расстройств во время беременности // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Т. 153, №. 11-3 – С. 142-149.

11. Макаров, И. О. Задержка роста плода. Врачебная тактика: учеб. пособие / И. О. Макаров, Е. В. Юдина, Е. И. Боровкова. - М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 34 с.

12. Малышкина А. И. Патоморфологические особенности плацент у женщин с угрожающими преждевременными родами в зависимости от исхода беременности // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2016. – Т. 16, №. 5. – С. 4-9.

13. Назаренко М. С., Боткина О. Ю., Пузырев В. П. Полиморфные варианты гена эндотелиальной синтазы оксида азота и риск невынашивания беременности // Молекулярная медицина. – 2012. – №. 4. – С. 58-61.

14. Насибулина Э. С. и др. Ассоциация полиморфизма гена FTO с избыточной массой тела в российской популяции // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. 93, №. 5. – С. 823-826.

15. Радзинский В., Князев С., Костин И. Акушерский риск. Максимум информации–минимум опасности для матери и младенца. – М.: – Litres, 2017. – 1047 с.

16. Романцова Т. И., Волкова Г. Е. Лептин и грелин: антагонизм и взаимодействие в регуляции энергетического обмена // Ожирение и метаболизм. – 2005. –Т. 16, №. 2. – С. 2-9.

17. Рязанцева Е. М. Лептин и репродуктивная система женщины // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. 61, №. 5. – С. 96-103.

18. Самоходская Л. М. и др. Анализ полиморфных маркеров ДНК для прогноза осложнений беременности. Методическое пособие по молекулярной генетике. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 2009. – С. 29-3.

19. Серая И. П., Нарциссов Я. Р. Современные представления о биологической роли оксида азота // Успехи соврем. биологии. – 2002. – Т. 122, №. 3. – С. 249-258.

20. Сосунов А. А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, №. 12. – С. 27-34.
21. Трифонова Е. А. и др. Генетические факторы развития преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения // Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины: сб. науч. тр. – 2014. – №. 10. – С. 161-168.
22. Трифонова Е. А. и др. Роль генов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции в формировании структуры наследственной предрасположенности к привычному невынашиванию беременности // Медицинская генетика. – 2018. – Т. 17, №. 3. – С. 34-42.
23. Тришкин А. Г. и др. Гормонально-метаболические особенности фетоплацентарного комплекса при задержке роста плода // Мать и дитя в Кузбассе. – 2012. – №. Спецвыпуск 1. – С. 59-63.
24. Фетисова И. Н. и др. Генетические факторы развития преэклампсии // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2015. – Т. 20, №. 3. – С. 13-16.
25. Филиппов, О. С. Плацентарная недостаточность: современный взгляд на проблему // Красноярск: Красноярская гос. мед. акад. - 2005. - 265 с.
26. Чуманова О. В. и др. Оценка роли полиморфизма генов системы гемостаза и генов, отвечающих за формирование дисфункции эндотелия, в развитии гестационных осложнений // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16, №. 5. – С. 48-51.
27. Шарипова Г. Х. и др. Особенности поражения сердца при метаболическом синдроме у больных артериальной гипертонией // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. – Т. 7, №. 8. – С. 20-26.
28. Юлдашева И. А. Состояние эндотелия сосудов легких у больных бронхиальной астмой // Клиническая медицина. – 2004. – Т. 82, №. 5. – С. 36-39.
29. Abir R. et al. Leptin and its receptors in human fetal and adult ovaries // Fertility and sterility. – 2005. – V. 84, №. 6. – P. 1779-1782.

30. Ahima R. S., Antwi D. A. Brain regulation of appetite and satiety // *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. – 2008. – V. 37, №. 4. – P. 811-823.
31. Alfer J. et al. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility // *Molecular Human Reproduction*. – 2000. – V. 6, №. 7. – P. 595-601.
32. Al-Hijji J. et al. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2003. – V. 1, №. 1. – P. 51.
33. Altman J. Weight in the balance // *Neuroendocrinology*. – 2002. – V. 76, №. 3. – P. 131-136.
34. Arngrímsson R. et al. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region // *The American Journal of Human Genetics*. – 1997. – V. 61, №. 2. – P. 354-362.
35. Bado A. et al. The stomach is a source of leptin // *Nature*. – 1998. – V. 394, №. 6695. – P. 790-793.
36. Berulava T., Horsthemke B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels // *European Journal of Human Genetics*. – 2010. – V. 18, №. 9. – P. 1054-1056.
37. Boissel S. et al. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations // *The American Journal of Human Genetics*. – 2009. – V. 85, №. 1. – P. 106-111.
38. Bouloumié A., Schini-Kerth V. B., Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells // *Cardiovascular research*. – 1999. – V. 41, №. 3. – P. 773-780.
39. Bouman A. et al. An interstitial de-novo microdeletion of 3q26. 33q27. 3 causing severe intrauterine growth retardation // *Clinical dysmorphology*. – 2015. – V. 24, №. 2. – P. 68-74.
40. Caprio M. et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells // *Endocrinology*. – 1999. – V. 140, №. 11. – P. 4939-4947.

41. Carmeliet P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions // *Nature medicine*. – 2001. – V. 7, №. 5. – P. 575-583.
42. Castellano B. M. et al. Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9–Niemann-Pick C1 signaling complex // *Science*. – 2017. – V. 355, №. 6331. – P. 1306-1311.
43. Chen J., Khalil R. A. Matrix metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia // *Progress in molecular biology and translational science*. – 2017. – V. 148. – P. 87-165.
44. Cheung M. K. M., Yeo G. FTO biology and obesity: why do a billion of us weigh 3 kg more? // *Frontiers in endocrinology*. – 2011. – V. 2. – P. 4.
45. Daoud H. et al. Identification of a pathogenic FTO mutation by next-generation sequencing in a newborn with growth retardation and developmental delay // *Journal of medical genetics*. – 2016. – V. 53, №. 3. – P. 200-207.
46. Duckitt K. et al. Nitric oxide donors for treating preterm labour // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2014. – №. 5. – 55 p.
47. Dvorak H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy // *Journal of clinical oncology*. – 2002. – V. 20, №. 21. – P. 4368-4380.
48. Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nature medicine*. – 2003. – V. 9, №. 6. – P. 669-676.
49. Fischer J. et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity // *Nature*. – 2009. – V. 458, №. 7240. – P. 894-898.
50. Frayling T. M. et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity // *Science*. – 2007. – V. 316, №. 5826. – P. 889-894.
51. Friedman J. M. // *Abstracts of 23 Meeting of the FEBS* // Basel. 1995. P12, – 1995. – V. 2. – P. 1.

52. Gambino Y. P. et al. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells— Focus on leptin expression // *Placenta*. – 2012. – V. 33. – P. S63-S70.
53. Gerken T. et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase // *Science*. – 2007. – V. 318, №. 5855. – P. 1469-1472.
54. Grosskreutz C. L. et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro // *Microvascular research*. – 1999. – V. 58, №. 2. – P. 128-136.
55. Gulati P., Yeo G. S. H. The biology of FTO: from nucleic acid demethylase to amino acid sensor // *Diabetologia*. – 2013. – V. 56, №. 10. – P. 2113-2121.
56. Han Z. et al. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity // *Nature*. – 2010. – V. 464, №. 7292. – P. 1205.
57. Harper S. J., Bates D. O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? // *Nature Reviews Cancer*. – 2008. – V. 8, №. 11. – P. 880-887.
58. Hoggard N. et al. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – V. 94, №. 20. – P. 11073-11078.
59. Huang H. et al. Study of effects of leptin on cultured human luteinized granulosa cell function // *Zhonghua fu chan ke za zhi*. – 2002. – V. 37, №. 3. – P. 152-154.
60. Hudlicka O., Brown M. D. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor // *Journal of vascular research*. – 2009. – V. 46, №. 5. – P. 504-512.
61. Kennedy C.R.J. What type of VEGF do you need? // *JASN*. – 2010.— V. 21 — P. 1410—1412.

62. Kitawaki J. et al. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2000. – V. 85, №. 5. – P. 1946-1950.
63. Krause B. J., Hanson M. A., Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function // *Placenta*. – 2011. – V. 32, №. 11. – P. 797-805.
64. Kupferminc M. J. Thrombophilia and pregnancy // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2003. – V. 1, №. 1. – P. 111.
65. Lodomery M. R., Harper S. J., Bates D. O. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm // *Cancer letters*. – 2007. – V. 249, №. 2. – P. 133-142.
66. Liguori R. et al. The FTO gene polymorphism (rs9939609) is associated with metabolic syndrome in morbidly obese subjects from southern Italy // *Molecular and cellular probes*. – 2014. – V. 28, №. 4. – P. 195-199.
67. Liu J. Clinical analysis of 126 cases of severe precocious preeclampsia complicated with fetal growth retardation // *Zhonghua yi xue za zhi*. – 2014. – V. 94, №. 37. – P. 2945-2947.
68. Livingstone K. M. et al. FTO genotype and weight loss: systematic review and meta-analysis of 9563 individual participant data from eight randomised controlled trials // *Bmj*. – 2016. – V. 354. – P. 4707.
69. Machado R. C. A. et al. Intrauterine growth restriction in monochorionic-diamniotic twins // *Revista da Associação Médica Brasileira*. – 2017. – V. 60, №. 6. – P. 585-590.
70. Maharaj A. S. R., D'Amore P. A. Roles for VEGF in the adult // *Microvascular research*. – 2007. – V. 74, №. 2-3. – P. 100-113.
71. Mantzoros C. S. Leptin and the hypothalamus: neuroendocrine regulation of food intake // *Mol. Psychiatry*. — 1999. — V. 4. — P. 8–12.
72. Mărginean C. et al. The FTO rs9939609 and LEPR rs1137101 mothers–newborns gene polymorphisms and maternal fat mass index effects on anthropometric characteristics in newborns: A cross-sectional study on mothers–newborns gene

polymorphisms—The FTO-LEPR Study (STROBE-compliant article) // *Medicine*. – 2016. – V. 95, №. 49. – 10 p.

73. Masuzaki H. et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans // *Nature medicine*. – 1997. – V. 3, №. 9. – P. 1029-1033.

74. Mercer J. G. et al. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization // *FEBS letters*. – 1996. – V. 387, №. 2-3. – P. 113-116.

75. Meyre D. et al. Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals // *Diabetes*. – 2010. – V. 59, №. 1. – P. 311-318.

76. Milnerowicz-Nabzdyk E., Bizoń A. Effect of cigarette smoking on vascular flows in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction // *Reproductive Toxicology*. – 2016. – V. 50. – P. 27-35.

77. Mirza F.G. Gastroschisis: incidence and prediction of growth restriction /F.G. Mirza, S.T. Bauer, A. Van der Veer, L.L. Simpson // *Journal of perinatal medicine*. – 2015. – V. 43, №. 5. – P. 605-608.

78. Moodley S. J. Intrauterine Growth Restriction (IUGR) // *Essentials of Maternal Fetal Medicint* Ed Ashmead GG, Reed GB NY: International Publ. – 1997. – P. 81-93.

79. Pallares P., Gonzalez–Bulnes A. The effect of embryo and maternal genotypes on prolificacy, intrauterine growth retardation and postnatal development of Nos3–knockout mice // *Reproductive biology*. – 2010. – V. 10, №. 3. – P. 241-248.

80. Park S. G., Ewalt K. L., Kim S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers // *Trends in biochemical sciences*. – 2005. – V. 30, №. 10. – P. 569-574.

81. Rand L. et al. Maternal leptin receptor gene variant Gln223Arg is not associated with variation in birth weight or maternal body mass index in UK and South Asian populations // *International journal of obesity*. – 2001. – V. 25, №. 5. – P. 753-755.

82. Robajac D. et al. Oxidation of placental insulin and insulin-like growth factor receptors in mothers with diabetes mellitus or preeclampsia complicated with intrauterine growth restriction // *Free radical research*. – 2016. – V. 49, №. 8. – P. 984-989.
83. Salimi S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-634G/C polymorphism was associated with severe pre-eclampsia and lower serum VEGF level // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2016. – V. 41, №. 12. – P. 1877-1883.
84. Sartori C. et al. From placenta to polycystic ovarian syndrome: the role of adipokines // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – V. 2016, №. 22. – 14 p.
85. Sawano A. et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2001. – V. 97, №. 3. – P. 785-791.
86. Schubring C. et al. Leptin concentrations in amniotic fluid, venous and arterial cord blood and maternal serum: high leptin synthesis in the fetus and inverse correlation with placental weight // *European journal of pediatrics*. – 1996. – V. 155, №. 9. – P. 830-830.
87. Sharma D. et al. Intrauterine growth restriction–part 1 // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2016. – V. 29, №. 24. – P. 3977-3987.
88. Shimobayashi M., Hall M. N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2014. – V. 15, №. 3. – P. 155-162.
89. Sinha M. K. et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting // *The Journal of clinical investigation*. – 1996. – V. 98, №. 6. – P. 1277-1282.
90. Song J. et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations, and enzyme activity in cultured human endothelial cells // *Clinical chemistry*. – 2003. – V. 49, №. 6. – P. 847-852.

91. Souren N. Y. et al. Common SNPs in LEP and LEPR associated with birth weight and type 2 diabetes-related metabolic risk factors in twins // *International journal of obesity*. – 2008. – V. 32, №. 8. – P. 1233-1239.
92. Steinbrekera B., Roghair R. Modeling the impact of growth and leptin deficits on the neuronal regulation of blood pressure // *Journal of Endocrinology*. – 2016. – V. 231, №. 2. – P. R47-R60.
93. Su R. et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA signaling // *Cell*. – 2018. – V. 172, №. 1-2. – P. 90-105.
94. Szentpéteri I. et al. Gene expression patterns of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in human placenta from pregnancies with intrauterine growth restriction // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2013. – V. 26, №. 10. – P. 984-989.
95. Tanus-Santos J. E. et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol // *Pharmacogenetics and Genomics*. – 2002. – V. 12, №. 5. – P. 407-413.
96. Tartaglia L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R // *Cell*. – 1995. – V. 83, №. 7. – P. 1263-1271.
97. Tripathi A., Singh M. P. Determinants of sustainable/green consumption: a review // *International Journal of Environmental Technology and Management*. – 2016. – V. 19, №. 3-4. – P. 316-358.
98. Tung Y. C. L. et al. Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats // *PloS one*. – 2010. – V. 5, №. 1. – P. 1-10.
99. Vela-Huerta M. M. et al. Leptin, insulin, and glucose serum levels in large-for-gestational-age infants of diabetic and non-diabetic mothers // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – V. 21, №. 1. – P. 17-22.
100. Villalobos-Comparán M. et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population // *Obesity*. – 2008. – V. 16, №. 10. – P. 2296-2301.

101. Wang C. Y. et al. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR // *Sci. Signal.* – 2009. – V. 2, №. 62. – P. 8-19.
102. Wang H. et al. Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta-and gene-based analysis // *Molecular biology reports.* – 2012. – V. 39, №. 5. – P. 5691-5698.
103. Wang K. et al. A genome-wide association study on obesity and obesity-related traits // *PloS one.* – 2011. – V. 6, №. 4. – P. 18-27.
104. Wiemerslage L. et al. An obesity-associated risk allele within the FTO gene affects human brain activity for areas important for emotion, impulse control and reward in response to food images // *European Journal of Neuroscience.* – 2016. – V. 43, №. 9. – P. 1173-1180.
105. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems. – World Health Organization. – 2004. – V. 1.
106. Wu F. T. H. et al. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use // *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2010. – V. 14, №. 3. – P. 528-552.
107. Yan K. L. et al. Mesoporous Ag-doped Co₃O₄ nanowire arrays supported on FTO as efficient electrocatalysts for oxygen evolution reaction in acidic media // *Renewable Energy.* – 2018. – V. 119. – P. 54-61.
108. Yeo G. S. H., O'Rahilly S. Uncovering the biology of FTO // *Molecular metabolism.* – 2012. – V. 1, №. 1-2. – P. 32-36.
109. Zabena C. et al. The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients // *Obesity Surgery.* – 2009. – V. 19, №. 1. – P. 87-95.
110. Zeng H. et al. mTORC1 and mTORC2 kinase signaling and glucose metabolism drive follicular helper T cell differentiation // *Immunity.* – 2016. – V. 45, №. 3. – P. 540-554.
111. Zhang Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue // *Nature.* – 1994. – V. 372, №. 6505. – P. 425-432.

112. Zhou Y., Hambly B. D., McLachlan C. S. FTO associations with obesity and telomere length // Journal of biomedical science. – 2017. – V. 24, №. 1. – P. 65.