

# ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА И РИСК НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

М.С. Назаренко<sup>1,2</sup>, кандидат медицинских наук,  
О.Ю. Боткина<sup>1</sup>, В.П. Пузырев<sup>1,2</sup>, академик РАМН, профессор

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН  
<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский  
университет Минздравсоцразвития России, Томск

E-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Проанализирована ассоциация полиморфных вариантов 894G>T и VNTR гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3) с риском невынашивания беременности в этнически однородной популяции. Выборки представлены зародышами I триместра с нормальным кариотипом, погибшими при неразвивающейся беременности (n=109), новорожденными (n=300), женщинами среднего возраста (n=328) и долгожителями (n=127). Установлено увеличение частоты генотипа AB VNTR в группе погибших зародышей (37%) по сравнению с таковой среди новорожденных (25%; p=0,02). Выявлено, что генотип 894TT регистрировался реже в группе погибших зародышей (4%), чем у долгожителей (12%; p=0,03). Таким образом, генотип AB VNTR гена NOS3 связан с увеличением риска (OR=1,77; 95%CI: 1,11–2,83; p=0,02) невынашивания беременности, а генотип 894TT оказывает протективное влияние в отношении данной патологии (OR=0,29; 95%CI: 0,09–0,89; p=0,03).

**Ключевые слова:** полиморфизм, эндотелиальная синтаза оксида азота (NOS3), неразвивающаяся беременность

## THE ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE POLYMORPHISMS AND THE RISK OF MISCARRIAGE

M.S. Nazarenko, O. Yu. Botkina, V.P. Puzyrev

Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences

In the current study the association of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene G894T and VNTR polymorphisms with the risk of miscarriage in ethnically homogeneous population has been investigated. The frequency of A/B VNTR genotype was revealed to predominate among chromosomally normal dead first-trimester embryos in missed miscarriage (37%) if compared with newborns (25%; P=0,02). In dead embryos the 894TT genotype was registered less frequently (4%) than in nonagenarians (12%; P = 0,03). Thus, genotype AB VNTR is associated with increased risk (OR = 1,77; 95%CI: 1,11–2,83; P=0,02), and the genotype 894TT has a protective effect against of this pathology (OR = 0,29, 95%CI: 0,09–0,89; P = 0,03).

**Key words:** polymorphism, endothelial nitric oxide synthase (NOS3), missed miscarriage

## ВВЕДЕНИЕ

Высокий уровень репродуктивных потерь на ранних этапах развития (известно, что около 70% всех зачатий не реализуется в рождение ребенка) остается актуальной проблемой современной науки и практической медицины [8]. Зародыши, погибшие при неразвивающейся беременности, представляют собой отдельную клинико-морфологическую группу невынашивания.

Генетические причины вносят существенный вклад в гибель эмбрионов. В частности, у 50% спонтанных абортусов I триместра выявляются нарушения кариотипа [7]. Предполагается, что гибель другой половины эмбрионов имеет многофакторную основу, т.е. является результатом аддитивного действия множества генов как зародыша, так и матери, а также комплекса неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды.

Оксид азота (NO) – один из наиболее важных биологических медиаторов. Во время беременности он влияет на имплантацию, децидуализацию, регуляцию кровотока в плаценте. В оптимальной концентрации NO стимулирует процессы внутриутробного развития; в то же время его дефицит приводит к остановке развития эмбриона, а избыток вызывает дегенерацию зародыша [1].

Источником NO в организме является продукт окисления аминокислоты L-аргинина под влиянием ферментов – синтаз оксида азота (NOS) [6]. Эндотелиальная синтаза оксида азота (NOS3) – одна из изоформ. Ген данного фермента картирован в локусе 7q36. Его экспрессия показана в тканях эмбриона и его оболочках [4]. Нокаут гена оказывает негативное влияние на развитие и жизнеспособность эмбриона [11].

Основное внимание исследователей сосредоточено на молекулярно-генетических вариантах, ко-

торые локализованы в области интрона 4 (variable number tandem repeats – VNTR) и экзона 7 (G894T) гена [10]. Их связь с широким спектром заболеваний подтверждается данными базы HuGENenet (<http://hugenavigator.net/>).

Результаты изучения ассоциации полиморфных вариантов гена NOS3 с риском невынашивания беременности в разных популяциях мира противоречивы. Большинство исследований касаются женщин с привычным невынашиванием на ранних сроках гестации. Работы, в которых объектом исследования выступают собственно погибшие эмбрионы, единичны [12].

Цель настоящего исследования заключалась в проведении анализа ассоциации полиморфных вариантов 894G>T и VNTR гена NOS3 с риском невынашивания беременности в этнически однородной популяции Томска.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 4 группы (погибшие зародыши, новорожденные, люди среднего возраста и долгожители). Все индивиды были славянского происхождения и проживали на территории Томска. Проведение работы одобрено комитетом по биомедицинской этике института.

Первая группа ( $n=109$ ) представлена зародышами, погибшими при неразвивающейся беременности в I триместре (46,XX – 57 случаев и 46,XY – 52; соотношение полов – 0,91). Верификация данной клинико-морфологической формы и сроков гестации проводилась с использованием динамического ультразвукового обследования врачами акушерами-гинекологами генетической клиники института. Критериями при постановке диагноза являлись: наличие сформированного зародыша в полости плодного мешка в сочетании с несоответствием крестцово-теменного размера эмбриона ожидаемому размеру на текущем сроке беременности и(или) отсутствие сердцебиения у эмбриона. Ткани цитотрофобласта хориона были получены из банка тканей спонтанных абортусов, сформированного в лаборатории цитогенетики института за период с 1987 по 2006 г. Группа включала зародышей с нормальным кариотипом. Верификация проводилась с помощью методов стандартного и(или) молекулярного цитогенетического исследования сотрудниками лаборатории цитогенетики.

Выборка новорожденных включала 300 обследованных (из них 46,XX – 160 и 46,XY – 140; соотношение полов – 0,88). Группа лиц среднего возраста (20–45 лет) состояла из 328 индивидов (46,XX – 172 и 46,XY – 156, соотношение полов – 0,91). Выборка долгожителей (90–100 лет) сформирована на основе критерия ВОЗ и представлена 127 индивидами (46,XX – 99 и 46,XY – 28; соотношение полов – 0,28).

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из цитотрофобласта хориона

погибших зародышей, пятен высушенной крови новорожденных и лейкоцитов периферической крови индивидов среднего возраста и долгожителей. При проведении молекулярно-генетического анализа полиморфных вариантов VNTR и 894G>T (rs1799983) гена NOS3 использовались структура праймеров и ферменты рестрикции, описанные в литературе ранее [10].

Распределение генотипов исследованных полиморфных локусов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия  $\chi^2$ . При попарном сравнении частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов между анализируемыми группами использовали точный тест Фишера. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программ Hardy-Weinberg equilibrium calculator (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>), GrafPAD InStat (GrafPAD Software, США) и Haploview (MIT/Harvard Broad Institute, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех анализируемых группах наблюдаемое распределение генотипов VNTR и 894G>T гена NOS3 соответствовало равновесию Харди–Вайнберга.

Установлено перераспределение частот генотипов исследованных полиморфных вариантов гена NOS3 в группах погибших зародышей, новорожденных и долгожителей (см. таблицу). В частности, выявлено увеличение частоты генотипа АВ VNTR у погибших зародышей (37%) по сравнению с таковой среди новорожденных (25%; OR=1,77; 95%CI: 1,11–2,83;  $p=0,02$ ). Показано, что генотип 894ТТ регистрировался реже в группе погибших зародышей (4%), чем среди долгожителей (12%; OR=0,29; 95%CI: 0,09–0,89;  $p=0,03$ ). Изученные молекулярные варианты сцеплены ( $D'=0,91$ ;  $p<0,05$ ). Статистически значимых различий в распределении гаплотипов между сравниваемыми группами не обнаружено.

Данный результат отличается от полученного при сравнительном анализе частот аллелей/генотипов/гаплотипов полиморфных вариантов VNTR и G894T NOS3 в выборке, включавшей 99 спонтанных абортусов, погибших ранее 20 нед гестации, и контрольных групп (103 ребенка и 282 взрослых) в популяции Южной Кореи [12]. Авторы показали, что среди спонтанных абортусов преобладают генотипы AA VNTR и 894ТТ по сравнению с группой взрослых. По-видимому, это может быть результатом популяционных особенностей, различий в критериях формирования выборок и отражает влияние как генетического фона, так и факторов внешней среды. Например, особенностью настоящего исследования было использование выборки зародышей I триместра с нормальным кариотипом, погибших при неразвивающейся беременности.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ VNTR И 894G>T ГЕНА NOS3 В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ ПОПУЛЯЦИИ ТОМСКА

Ген (полиморфизм)	Генотип/ аллель	Погибшие зародыши, n (%)	Новорожденные, n (%)	p	Лица среднего возраста, n (%)	p	Долгожители, n (%)	p
NOS3 (VNTR)	BB	67 (61)	218 (72)	0,04	226 (69)	0,16	80 (64)	0,79
	AB	40 (37)*	74 (25)*	0,02*	91 (28)	0,09	43 (34)	0,68
	AA	2 (2)	8 (3)	0,99	11 (3)	0,53	3 (2)	0,99
	B	174 (80)	510 (85)	0,09	543 (83)	0,36	203 (81)	0,91
	A	44 (20)	90 (15)		113 (17)		49 (19)	
NOS3 (894G>T)	GG	57 (52)	153 (51)	0,82	179 (55)	0,82	61 (48)	0,51
	GT	47 (44)	119 (40)	0,57	128 (39)	0,43	51 (40)	0,69
	TT	4 (4)*	27 (9)	0,09	21 (6)	0,35	15 (12)*	0,03*
	G	161 (75)	425 (71)	0,38	486 (74)	0,93	173 (68)	0,15
	T	55 (25)	173 (29)		170 (26)		81 (32)	

*Примечание.* \* – статистически значимые различия.

Согласно данным литературы, большинство работ, посвященных поиску ассоциации полиморфных вариантов гена *NOS3* с риском привычного невынашивания на ранних сроках гестации, проведено при обследовании женщин. Показано, что увеличение риска патологии связано с генотипом AB VNTR в популяциях Австрии и Китая и генотипом 894TT в Южной Корее [5, 13, 14]. В связи с этим представляло интерес провести подобный анализ в популяции Томска.

В отличие от результата настоящей работы, при обследовании погибших зародышей в популяции Южной Кореи показана ассоциация определенных гаплотипов полиморфных вариантов – 786T>C, VNTR и 894G>T гена *NOS3* с риском невынашивания беременности [12].

В популяции Томска ранее была установлена связь генотипов AB VNTR с увеличением риска гипертрофической кардиомиопатии, а генотип 894TT преобладал при хронической обструктивной болезни легких и при гипертрофии левого желудочка в сочетании с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа [2, 3]. Однако молекулярный механизм данных ассоциаций остается неясным.

С одной стороны, оба полиморфных варианта могут быть функционально значимыми. Показано, что 27-нуклеотидный повтор (VNTR) действует как энхансер/репрессор экспрессии *NOS3* [18]. Полиморфный вариант VNTR связан с изменением концентрации нитратов и нитритов в плазме здоровых индивидов [16], уровнем и активностью *NOS3* в послеродовой плаценте [19]. Замена 894G>T приводит к аминокислотной замене Glu298Asp в оксигеназном домене фермента. Аллель 894T связан со снижением базальной продукции NO [17], а белок 298Asp в большей степени подвержен гидролизу в культуре эндотелиальных клеток [15].

С другой стороны, маркеры VNTR и 894G>T могут быть сцеплены с другими функционально значимыми вариантами. Например, показано, что полиморфные варианты 786T>C и VNTR регулируют транскрипцию гена в cis-гаплотипспецифической манере [18], а гаплотип «CBT» вариантов 786T>C, VNTR и 894G>T связан со снижением уровня нитратов и нитритов в плазме здоровых индивидов [9].

Не исключено, что расширение спектра тестируемых молекулярно-генетических вариантов и выяснение их функциональной значимости дополнит имеющиеся представления о патогенезе данной патологии. Актуальным является увеличение как размера, так и состава выборок, в частности, за счет других клинико-морфологических групп погибших зародышей, в том числе и с аномальным кариотипом.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлена ассоциация полиморфных вариантов VNTR и 894G>T гена *NOS3* с риском невынашивания беременности в этнически однородной популяции Томска. Генотип AB VNTR связан с увеличением риска (OR=1,77; 95% CI: 1,11–2,83; p=0,02), а генотип 894TT оказывает протективное влияние в отношении данной патологии (OR=0,29; 95% CI: 0,09–0,89; p=0,03).

*Авторы статьи выражают глубокую признательность врачам, среднему медицинскому персоналу генетической клиники и сотрудникам лаборатории цитогенетики ФГБУ НИИМГ СО РАМН за помощь в проведении отдельных этапов исследования.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Блашкв Т.В., Вознесенская Т.Ю. Влияние ингибиторов NO-синтазы на показатели эмбриональной гибели пре- и постимплантационных эмбрионов мышей // Онтогенез. – 2004; 35 (5): 346–9.
2. Макеева О.А. Структурно-функциональная организация наследственной компоненты подверженности к гипертрофии миокарда у человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2004.
3. Сеитова Г.Н. Анализ взаимосвязи генов-кандидатов хронической обструктивной болезни легких с клиническими проявлениями болезни у татар и русских Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2004.
4. Al-Hijji J., Andolf E., Laurini R. et al. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003; 1: 51.
5. Fan W., Li S., Wang Y. Association of genetic polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase 3 gene with recurrent early spontaneous abortion // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2007; 24: 23–6.
6. Furchgott R. Studies on endothelium-dependent vasodilatation and the endothelium-derived relaxing factor // *Acta Physiol. Scand.* – 1990; 139: 257–70.
7. Hassold T., Chen N., Funkhouser J. et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions // *Ann. Hum. Genet.* – 1980; 44: 151–78.
8. Macklon N., Geraedts J., Fauser B. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss // *Hum. Reprod. Update.* – 2002; 8: 333–43.
9. Metzger I., Souza-Costa D., Marroni A. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men // *Pharmacogenet. Genom.* – 2005; 15: 565–70.
10. Novoradovsky A., Brantly M., Waclawiw M. et al. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 1999; 20: 441–7.
11. Pallares P., Gonzalez-Bulnes A. The effect of embryo and maternal genotypes on prolificacy, intrauterine growth retardation and postnatal development of Nos3-knockout mice // *Reprod. Biol.* – 2010; 10: 241–8.
12. Shim S., Yoon T., Cha D. et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms in spontaneously aborted embryos // *Genes Genom.* – 2010; 32: 283–8.
13. Shin S., Lee H., Cha S. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2010; 152: 64–7.
14. Tempfer C., Unfried G., Zeillinger R. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage // *Hum. Reprod.* – 2001; 16: 1644–7.
15. Tescauro M., Thompson W., Rogliani P. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000; 97: 2832–5.
16. Tsukada T., Yokoyama K., Arai T. et al. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998; 245: 190–3.
17. Veldman B., Spiering W., Doevendans P. et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide // *J. Hypertens.* – 2002; 20: 2023–7.
18. Wang J., Dudley D., Wang X. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency modifiable by cigarette smoking // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002; 22: 1–4.
19. Wang X., Sim A., Wang M. et al. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity // *FEBS Lett.* – 2000; 471: 45–50.