
ГЕНЕТИКА

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *ESR1* С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМ РАЗРЫВОМ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК

Н.Е.Кан, В.Л.Тютюнник, А.Е.Донников, М.В.Санникова, Г.Т.Сухих

ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова Минздрава РФ, Москва

Обследованы 179 пациенток, разделенные на две группы в зависимости от наличия преждевременного разрыва плодных оболочек. Проведено генотипирование матерей и их новорожденных по двум полиморфным локусам гена эстрагенового рецептора α (*ESR1*): -397 T>C [PvuII] (rs2234693) и -351A>G [XbaI] (rs9340799). Наличие гаплотипа CG у плода следует рассматривать как фактор риска преждевременного разрыва плодных оболочек, а гаплотипа TA — как протективный фактор. Маркером протективного гаплотипа у плода является генотип -351A/A, а маркером гаплотипа риска — генотип -397 C/C, что может быть использовано при сочетанном анализе обоих маркеров. Полученные данные свидетельствуют о важной роли генотипа плода в формировании генетически обусловленной предрасположенности к преждевременному разрыву плодных оболочек.

Ключевые слова: *преждевременный разрыв плодных оболочек, эстрогеновый рецептор α , генный полиморфизм*

Преждевременный разрыв плодных оболочек (ПРПО) — опасное акушерское осложнение, приводящее к гнойно-септическим осложнениям у родильниц и новорожденных [1,5]. Распространенность ПРПО варьирует от 3 до 41% в некоторых группах [6,11]. Одним из наиболее изученных факторов патогенеза ПРПО является инфекционно-воспалительный [11], в то же время большое влияние на механизмы разрыва могут оказывать генетически детерминированные структурные и функциональные особенности соединительной ткани, доминирующей в плодных оболочках [2,15]. Одним из регуляторов гомеостаза соединительной ткани являются эстрогены, биологический эффект которых реализуется через соответствующие рецепторы. Эстрогеновые рецепторы локализованы на эндотелии, гладкомышечных клетках [8], участвующих в предотвращении эндотелиальной дисфункции [7], регулируют экспрессию прогестероновых рецепторов [13], что важно для течения беременности и регуляции родовой дея-

тельности. Эстрогеновый рецептор α (*ESR1*) широко экспрессируется в эндометрии и играет важную роль в контроле рецептивности [9].

Наиболее изучены два функционально значимых полиморфных локуса в гене *ESR1*: -397 T>C [PvuII] (rs2234693) и -351A>G [XbaI] (rs9340799) [4]. Показана ассоциация этих полиморфизмов с рядом многофакторных заболеваний [12,14].

Цель исследования — поиск ассоциации полиморфизма *ESR1* с ПРПО.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе ретроспективного исследования обследованы 179 пациенток, наблюдавшихся и родоразрешенных в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова с 2009 по 2012 г., которые были разделены на две группы в зависимости от наличия ПРПО. Основную группу составили 82 женщины, у которых роды осложнились ПРПО на доношенном сроке беременности, контрольную — 97 рожениц без ПРПО. Пациентки, включенные в исследование,

Адрес для корреспонденции: kan-med@mail.ru. Кан Н.Е.

были сопоставимы по возрасту и массо-ростовым соотношениям. Средний возраст из основной группы составил 31.6 ± 3.2 года, контрольной — 31.8 ± 3.3 года; рост и масса тела — 166 ± 6 см и 67.0 ± 13.3 кг и 167 ± 5 см и 66.0 ± 10.6 кг соответственно. Повторно беременными были 51% пациенток 1-й и 67% — 2-й группы. Проведен анализ течения беременности, родов, послеродового периода и раннего неонатального периода детей.

ПРПО определяли как излитие околоплодных вод не менее чем за 2 ч до начала регулярной родовой деятельности. Диагноз подтверждали на основании наличия плацентарного α_1 -микроглобулина (тест “AmniSure”; “AmniSure International LLC”).

Критериями включения в исследование являлись возраст 18-45 лет, срок беременности 37-41 нед, наличие информированного согласия.

Критериями исключения считали тяжелую вирусную и/или бактериальную инфекцию во время данной беременности (для доношенного срока), тяжелую экстрагенитальную патологию матери, артефициальный (ятрогенный) ПРПО, для группы контроля — оперативные роды (кесарево сечение) с началом операции до наступления регулярной родовой деятельности.

У всех пациенток и их новорожденных были изучены полиморфизмы гена *ESR1*: -397 T>C [Pvull] (rs2234693) и -351A>G [Xbal] (rs9340799). Для генотипирования матерей исследовали венозную кровь, новорожденных — пуповинную кровь. ДНК выделяли с помощью реагентов “ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА” (ООО “НПО ДНК-Технология”) из 0.5 мл крови, взятой с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Концентрация ДНК, определенная на минифлюориметре (“Hoefler Inc.”), в среднем составляла 50-100 мкг/мл.

Одиночные замены нуклеотидов определяли модифицированным методом “примыкающих проб” с помощью тест-системы производства ООО “НПО ДНК-Технология”, ПЦР и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (ООО “НПО ДНК-Технология”).

В ходе работы использовали общеклинические (клинико-анамнестические, лабораторные), специальные (ультразвуковое исследование, доплерометрия, кардиотокография — КТГ), морфологические методы исследования.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ “WinPepi 9.7”, “Statistica 8” и SPSS “Statistics 19”. Использовали *U* тест Манна—Уитни для двух независимых выборок и тест χ^2 для сравнения частот аллелей и генотипов.

Анализ неравновесности сцепления проводили с помощью программы “Haploview 4.2”. Отношение шансов (OR) представлено с 95% доверительным интервалом (ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные акушерско-гинекологического анамнеза свидетельствуют об увеличении частоты кандидозного вагинита (23.7%; OR=0.50, 95% ДИ 0.27-0.91) и эктопии шейки матки (60.8%; OR=0.39, 95% ДИ 0.17-0.91) у пациенток контрольной группы. Особенностью течения беременности являлось статистически значимое увеличение частоты угрозы выкидыша в I триместре у пациенток основной группы до 56% (OR=2.2, 95% ДИ 1.2-4.0).

Экстренное оперативное родоразрешение достоверно чаще проводилось в основной группе (44%; OR=2.1, 95% ДИ 1.1-3.9). Достоверных различий в длительности родов и безводного промежутка в обеих группах не выявлено. Длительность безводного периода в среднем составила 3 сут, максимально — 19 сут.

Анализ течения раннего неонатального периода выявил более высокую частоту асфиксии легкой степени в основной группе (22.0%; OR=2.75, 95% ДИ 1.16-6.51), в то время как в контрольной группе преобладал кожно-геморрагический синдром (12.4%; OR=0.17, 95% ДИ 0.03-0.82). В литературе указано на повышение риска врожденной инфекционной патологии (пневмонии, неонатального сепсиса), респираторного дистресс-синдрома плода, внутрижелудочковых кровоизлияний, некротизирующего энтероколита при ПРПО [10]. В нашем исследовании тяжелой инфекционной патологии раннего неонатального периода при ПРПО и доношенном сроке беременности не выявлено.

При независимом анализе распределения аллелей полиморфизмов гена *ESR1* у новорожденных выявлена ассоциация аллеля -397C ($p=0.05$; OR=2.14, 95% ДИ 1.02-4.47) и аллеля -351G ($p=0.05$; OR=2.29, 95% ДИ 1.06-4.98) с ПРПО. При этом распределение аллелей и генотипов по данным полиморфным локусам у матерей статистически значимо не различалось. Ранее была показана клиническая значимость неравновесности сцепления между полиморфизмами -397 T>C (Pvull) и -351G>A (Xbal) [3].

В нашем исследовании также было подтверждено сцепленное наследование данных полиморфных локусов: $D'=1.0$ (0.97-1.00), $LOD=65.65$. Результаты анализа распределения гаплотипов по полиморфизмам гена *ESR1* -397 T>C (Pvull) и -351G>A (Xbal) приведены на рисунке 1.

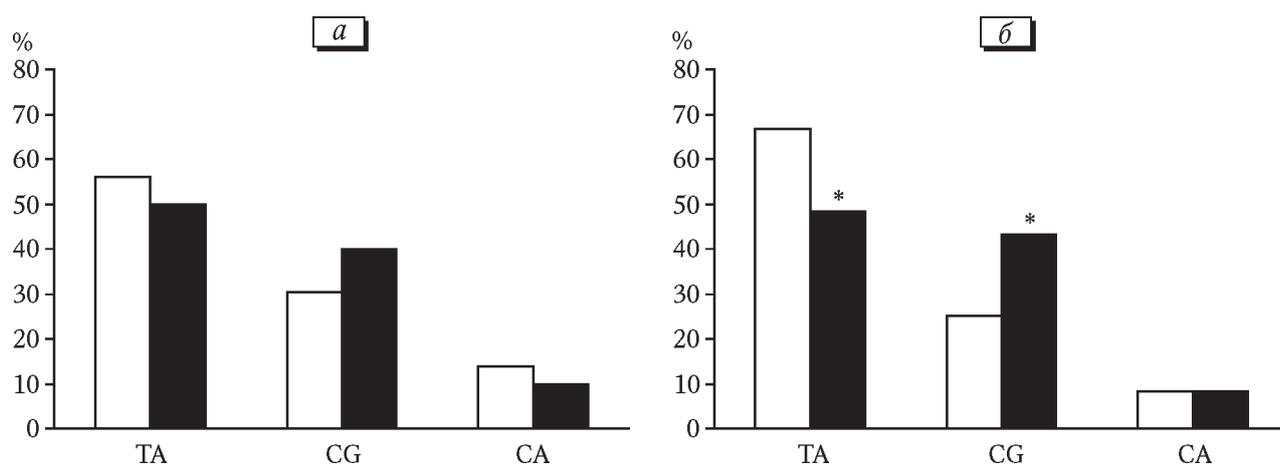


Рис. 1. Генотипическая частота встречаемости гаплотипов гена *ESR1* -397 T>C (PvuII) и -351G>A (XbaI) у матерей (а) и новорожденных (б) в зависимости от наличия ПРПО. Светлые столбики — контрольная группа, темные — ПРПО. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

При анализе генотипа плода выявлена статистически значимая ассоциация с ПРПО двух гаплотипов у новорожденных. Гаплотип TA чаще обнаруживали при нормальном течении родов (66.7% по сравнению с 48.3% соответственно; $p=0.04$, OR=0.47, 95% ДИ 0.23-0.97), а гаплотип CG — при ПРПО (43.3% по сравнению с 25.0% соответственно; $p=0.03$, OR=2.29, 95% ДИ 1.16-4.95). Соответственно, гаплотип CG ассоциирован с повышением, а гаплотип TA — со снижением риска ПРПО. Аналогичная тенденция прослеживалась и для материнского генотипа, но различия не достигали статистической значимости.

Учитывая полученные данные, гаплотип CG следует рассматривать как фактор риска ПРПО, а гаплотип TA — как протективный фактор. Частота встречаемости гаплотипа CA статистически значимо не различалась в зависимости от ПРПО ни у матерей, ни у новорожденных, и этот гаплотип может быть охарактеризован как нейтральный для данной патологии. Полученные данные явились основанием для клинико-функциональной оценки генотипа по полиморфизмам гена *ESR1* -397 T>C (PvuII) и -351G>A (XbaI). Сочетание двух протективных аллелей или протективного и ней-

трального аллелей считали протективным генотипом, двух аллелей риска или аллеля риска и нейтрального аллеля — генотипом риска. Сочетание аллеля риска и протективного аллеля рассматривали как нейтральный генотип (табл. 1).

Для проверки корректности предложенной классификации изучено распределение генотипов матери и ребенка в зависимости от наличия ПРПО (рис. 2).

Протективный генотип у детей при ПРПО выявлялся почти в 2 раза реже (30.0% по сравнению с 56.7%), чем в контрольной группе ($p=0.007$; OR=0.33, 95% ДИ 0.12-0.93), а генотип риска встречался у детей при ПРПО в 4 раза чаще (26.7% по сравнению с 6.7%), хотя различия не достигали статистической значимости ($p=0.08$). У матерей при ПРПО генотип риска выявляли в 1.7 чаще (22.7% по сравнению с 13.5%), а частота выявления протективного генотипа в обеих группах женщин практически не различались (36.4 и 43.2% соответственно), что также не было статистически достоверно. Существенных различий в частоте встречаемости функционально нейтрального генотипа в норме и при ПРПО как у детей, так и у матерей не выявлено.

Таблица 1. Классификация генотипа, образованного гаплотипами полиморфизмов гена *ESR1*: -397 T>C (PvuII) и -351G>A (XbaI) по отношению к риску развития ПРПО

| Аллель 1 | Аллель 2 | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| | гаплотип TA ⁺ | гаплотип CG ⁻ | гаплотип CA |
| Гаплотип TA ⁺ | Протективный генотип | Нейтральный генотип | Протективный генотип |
| Гаплотип CG ⁻ | Нейтральный генотип | Генотип риска | Генотип риска |
| Гаплотип CA | Протективный генотип | Генотип риска | Нейтральный генотип |

Примечание. Здесь и в табл. 2: “-” — гаплотип риска, “+” — протективный гаплотип.

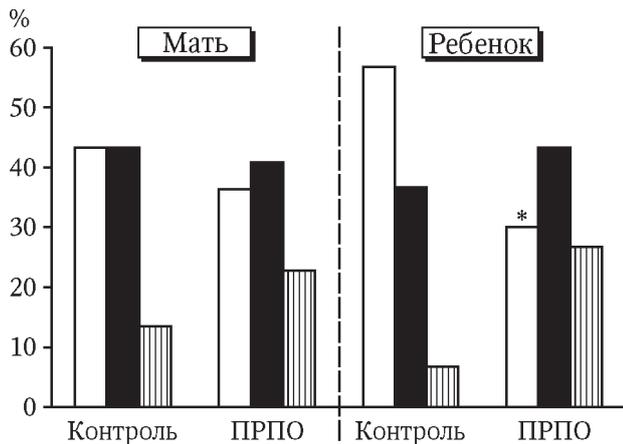


Рис. 2. Распределение функциональных групп генотипов, образованных гаплотипами полиморфизмов гена *ESR1* -397 T>C (PvuII) и -351G>A (XbaI) по риску развития ПРПО.

По оси ординат — частота встречаемости генотипа. Светлые столбики — протективный генотип, темные — нейтральный, заштрихованные — генотип риска. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Непосредственное определение гаплотипа у конкретного пациента является достаточно сложной и дорогостоящей технологической задачей и практически не применимо в рутинной клинической практике. Стандартным подходом является независимое определение одиночных нуклеотидов в точках, маркирующих функционально значимые гаплотипы. Полный генотип устанавливают на основании данных о сцепленном наследовании определяемых маркеров с учетом расположения соответствующих нуклеотидов в одном или разных аллелях (т.е. гаплотип). Соответствие гаплотипов и индивидуальных генотипов *ESR1*: -397 T>C (PvuII) и -351G>A (XbaI), полученное в результате анализа сцепления, представлено в таблице 2.

Полученные нами функциональные характеристики гаплотипов (табл. 1) свидетельствуют о том, что маркером протективного гаплотипа является генотип -351A/A, а маркером гаплотипа риска — генотип -397 C/C. Сочетание -351A/A и -397 C/C или двух гетерозигот определяет нейтральный генотип.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли генотипа плода в формировании генетически обусловленной предрасположенности к ПРПО, что объясняет сложности прогнозирования данного осложнения при учете только материнских факторов. Показана ассоциация полиморфизма гена *ESR1* плода с ПРПО. При этом необходимо учитывать сцепленное наследование полиморфных локусов -397 T>C (PvuII)

Таблица 2. Соответствие гаплотипов гена *ESR1* сочетаниям генотипов индивидуальных маркеров -397 T>C (PvuII) и -351G>A (XbaI)

| Генотип индивидуального маркера | -351G>A (XbaI) | | |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | A/A | A/G | G/G |
| -397 T>C (PvuII) | | | |
| C/C | CA/CA | CA/CG ⁻ | CG ⁻ /CG ⁻ |
| T/C | TA ⁺ /CA | TA ⁺ /CG ⁻ | |
| T/T | TA ⁺ /TA ⁺ | | |

Примечание. Полу жирным рифтом выделены генотипы, ассоциированные с изменением риска ПРПО.

и -351G>A (XbaI). Маркером протективного гаплотипа является генотип -351A/A, а маркером гаплотипа риска — генотип -397 C/C, что может быть использовано при сочетанном анализе обоих маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баев О.Р., Рубцова С.В., Васильченко О.Н. и др. // Акуш. и гинекол. 2012. № 1. С. 49-54.
2. Нечаева Г.И., Викторова И.А. Дисплазия соединительной ткани: терминология, диагностика, тактика ведения пациентов. Омск, 2007.
3. Сухих Г.Т., Кесова М.И., Донников А.Е. и др. // Акуш. и гинекол. 2011. № 4. С. 40-44.
4. Alessio A.M., Höehr N.F., Siqueira L.H. и др. // Thromb. Res. 2007. Vol. 120, N 5. P. 639-645.
5. Berghella V. Preterm birth: prevention and management. Oxford, 2010.
6. Di Renzo G.C., Roura L.C., Faccihinetti F. et al. // J. Matern.-Fetal Neonatal Med. 2011. Vol. 24, N 5. P. 659-667.
7. Favre J., Gao J., Henry J.P. et al. // Arterioscler. Thromb., Vasc. Biol. 2010. Vol. 30, N 12. P. 2562-2567.
8. Karas R.H., Patterson B.L., Mendelsohn M.E. // Circulation. 1994. Vol. 89, N 5. P. 1943-1950.
9. Lessey B.A., Palomino W.A., Apparao K.B. et al. // Reprod. Biol. Endocrinol. 2006. Vol. 4, Suppl 1. P. S9.
10. Manuck T.A., Maclean C.C., Silver R.M., Varner M.W. // Am. J. Obstet. Gynecol. 2009. Vol. 201, N 4. 414.e1-6. doi:10.1016/j.ajog.2009.07.045.
11. Menon R., Taylor R.N., Fortunato S.J. // Placenta 2010. Vol. 31, N 2. P. 113-120.
12. Molvarec A., Vér A., Fekete A. et al. // Hypertens Res. 2007. Vol. 30, N 3. P. 205-211.
13. Patel A.K., Alexander T.H., Andalibi A. et al. // Laryngoscope. 2008. Vol. 118, N 8. P. 1458-1463.
14. Safarinejad M.R., Taghva A., Shafiei N., Safarinejad S. // Andrology. 2013. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00097.x.
15. Wang H., Ogawa M., Wood J.R. et al. // Hum. Mol. Genet. 2008. Vol. 17, N 8. P. 1087-1096.

Получено 09.08.12