

На правах рукописи

ГЛОТОВ

Андрей Сергеевич

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И СРЕДОВЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ГЕСТОЗА У
ЖЕНЩИН, АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО
СИНДРОМА У ДЕТЕЙ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»

Научный консультант:

Баранов Владислав Сергеевич,
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор, заведующий лабораторией пренатальной
диагностики наследственных и врожденных болезней
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта», профессор кафедры
генетики и биотехнологии СПбГУ

Официальные оппоненты:

Горбунова Виктория Николаевна,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры общей и молекулярной медицинской
генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный педиатрический медицинский
университет» МЗ РФ

Пчелина Софья Николаевна,
доктор биологических наук, Заведующая лабораторией
молекулярной генетики человека ФГБУ «Петербургский
институт ядерной физики им.
Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт»

Кадурин Тамара Ивановна,
доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры медицинской генетики
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава
России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск

Защита состоится «8» июня 2017 г. в 13 часов 00 минут на заседании Совета Д 212.232.12 на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу: 199034, С-Петербург, Университетская наб., 7-9, ауд. 1 кафедры генетики и биотехнологии

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. М. Горького ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9 и на сайте СПбГУ: <https://disser.spbu.ru/files/disser2/disser/FJ6RrJLqDZ.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Мамон Л.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Исследование наследственной предрасположенности к мультифакторным (многофакторным) заболеваниям является основой молекулярной медицины - качественно нового раздела медицинской науки, использующего в своем арсенале современные методы различных точных и естественных наук, таких как, генетика, молекулярная биология, биохимия, биофизика, физическая химия, микроскопия, цитология и другие (Баранов, 2009). Основными задачами молекулярной медицины являются «познание молекулярных основ возникновения и механизмов развития заболеваний, разработка адекватных методов диагностики, лечения и профилактики» (Пальцев, Белушкина, 2012).

Важным разделом молекулярной медицины является предиктивная медицина (ПМ), которая направлена на раннее, досимптоматическое выявление лиц высокого риска по развитию тех или иных наследственных и мультифакторных заболеваний (МФЗ) с целью их своевременной профилактики, ранней диагностики и эффективного персонализированного лечения (Баранов *и др.*, 2000; Баранов, 2009). За более чем 20 лет своего существования ПМ прошла сложный путь от поиска генов «предрасположенности» и генных сетей МФЗ до исследования молекулярных основ патогенеза МФЗ, их системного и биоинформационного анализа. Такой путь ПМ вполне соответствует эволюции всей молекулярной медицины последних лет, исследования в которой все больше перемещается от анализа анатомии генома к его структурно-функциональной организации, то есть от «статического» к «динамическому» геному человека в норме и патологии (Baranov, Baranova, 2016).

Наиболее значимым маркером «статического» генома является однонуклеотидный полиморфизм – SNP (O'Donnell, Nabel, 2011; Zeller *et al.*, 2012). Именно SNP оказался особенно удобным для картирования генов, идентификации мутаций. Основу «динамического» (функционального) генома составляют изменения транскриптома и эпигенома (Zilberman, 2007; Yuen *et al.*, 2010; Cowley *et al.*, 2012; Schnabel *et al.*, 2012; Zeller *et al.*, 2012).

Несмотря на огромное число публикаций, касающихся ассоциации того или иного SNP, мРНК или микроРНК с риском развития того или иного МФЗ сохраняются серьезные трудности в интерпретации результатов генетического тестирования (Zuk *et al.*, 2012). Они вызваны разными причинами. Во-первых, сегодня уже нет сомнений, что ни один из маркеров в отдельности и даже несколько генов-кандидатов МФЗ не позволяют достоверно предсказать риск МФЗ (Zuk *et al.*, 2012). Проблема заключается в отсутствии арсенала необходимых математических и биоинформатических методов, позволяющих создать адекватные модели МФЗ, а также, в определенной этноспецифичности генетических маркеров. Известно, что при определенных условиях некоторые мутации могут либо предрасполагать, либо препятствовать проявлению различных заболеваний (Баранов, 2009). Существенную роль в увеличении или снижении риска МФЗ играют и факторы внешней среды. Но как их учитывать? Что считать значимым фактором риска, а что - диагностическим маркером, который нельзя включать в модель МФЗ, остается не ясным.

Такие трудности особенно четко проявляются при оценке риска развития синтропных заболеваний, в основе которых лежат как общие гены, так и общие метаболические процессы (Пузырев, 2008). К синтропным заболеваниям можно отнести широкий спектр сердечно-сосудистой патологии, среди которой особое место занимают болезни с гипертензивным синдромом. К ним относят заболевания беременных женщин (артериальную гипертензию беременных, гестоз, гестационный сахарный диабет и другие), а также такие распространенные болезни как гипертония, ожирение, метаболический синдром и некоторые другие.

Гестоз (преэклампсия) является основной причиной материнской и перинатальной заболеваемости и смертности (Dekker *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 2001). Артериальная гипертензия – наиболее частый диагноз среди мультифакторной патологии у детей (Образцова, 2009). Артериальная гипертензия и ожирение являются облигатными составляющими такого распространенного экогенетического заболевания как метаболический синдром (Махрова, 2011).

Очевидно, что этим заболеваниям свойственны многие общие особенности патогенеза, сравнительный структурно-функциональный анализ которых, на таких группах, как беременные женщины с гестозом и дети с гипертензией и МСО, может быть эффективным. Анализ МФЗ требует совершенствования существующих и разработки новых подходов, среди которых все более значимую роль играют методы биоинформатики и статистического моделирования (Колчанов *и др.*, 2008; Moore, Williams, 2009; Xu, Hu, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Gui *et al.*, 2011; Demenkov *et al.*, 2012; Lvovs *et al.*, 2012).

В своем большинстве, однако, такие исследования все еще имеют несистемный и узконаправленный характер. Для прогресса персонализированной медицины необходимо использовать комплексный подход, направленный на разработку новых методов диагностики МФЗ, исследование их патогенеза, и создание моделей, удобных для более объективной оценки риска МФЗ. Такой комплексный подход был использован и в данной работе для выяснения особенностей патогенеза и совершенствования оценки генетического риска ряда частых МФЗ детского возраста и беременных женщин.

Цель исследования: определить наследственные и средовые факторы риска гестоза у беременных женщин, артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением у детей с помощью оригинальных биочипов в комплексе с другими молекулярно-генетическими и биоинформатическими методами.

Основные задачи исследования:

1. Провести апробацию биочипов для оценки наследственной предрасположенности к повышенному артериальному давлению - «Кардио-биочип», и тромбозам - «Фибр-биочип».
2. Провести анализ частот аллелей и их комбинаций для генов *REN* (-83G>A, rs2368564), *AGT* (M235T, rs699), *AGTR1* (1166A>C, rs5186), *AGTR2* (3123C>A, rs11091046), *BDKRB2* (-58T>C, rs1799722), *ADRB2* (48A>G (rs1042713), 81C>G (rs1042714), *MTHFR* (677C>T, rs1801133) с использованием «Кардио-биочипа», и для генов *APOE* (*E2*, *E3*, *E4*, rs429358, rs7412), *LPL* (Ser447Stop, rs328), *NOS3* (-786T>C, rs2070744), *ACE* (I/D, rs4340) методом ПЦР-ПДРФ у беременных с гестозом, детей с гипертензией и детей с ожирением и метаболическим синдромом и в соответствующих контрольных группах.
3. Провести анализ частот аллелей и их комбинаций для генов *MTHFR* (677C>T, rs1801133), *F5* (1691G>A, rs6025), *ITGB3* (196C>T, rs5918), *SERPINE1* (5G>4G, rs1799768), *FGB* (455G>A, rs1800790), *F2* (20210G>A, rs1799963) с помощью «Фибр-биочипа» у женщин с гестозом, у беременных контрольной группы и в популяционной выборке.
4. Провести корреляционный анализ генетических и клинических показателей у беременных женщин с гестозом, у детей, больных артериальной гипертензией и у детей с метаболическим синдромом и ожирением.
5. Разработать и апробировать математические модели оценки риска мультифакторных заболеваний.
6. Исследовать аллельные варианты генов *CDH13* (rs11646213 A/T), *MTHFR* (rs17367504 A/G), *CDKN2/BAS* (rs4977574 A/G), а также маркера rs11191548 T/C в качестве кандидатов риска развития детской гипертензии.
7. Провести реконструкцию и анализ первичных генетических ассоциативных сетей гестоза, артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением.
8. Проанализировать особенности нуклеотидной последовательности гена *ACVR2A* у беременных с гестозом и у лиц контрольной группы.
9. Изучить изменение уровня микроРНК в тканях плаценты при гестозе и в контрольной группе.
10. Провести анализ метилирования промоторного региона гена *H19* в тканях плаценты у беременных с гестозом и в контрольной группе.

Методология исследования. Методология исследования заключалась в применении комплексного подхода при изучении МФЗ. В работе использованы новые и стандартные методы молекулярной генетики человека, статистики и биоинформатики, а также разработаны новые подходы для скрининга мутаций на основании технологии биологических микрочипов.

Научная новизна исследования. На основании исследования генов-кандидатов, анализа генных сетей и изучения полногеномных, транскриптомных и эпигеномных характеристик впервые дана комплексная оценка риска гестоза у женщин, артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением у детей.

Показано, что комбинации C/T (rs1801133) по гену *MTHFR*, 5G/4G (rs1799768) по гену *SERPINE1*, а также сочетание комбинаций *APOE* (*E3/E3*, rs429358, rs7412) *x* *AGTR2* (C/A, rs11091046) являются маркерами повышенного риска гестоза.

Впервые установлено, что сочетание комбинаций *AGTR2* (A/A, rs11091046) *x* *NOS3* (T/C, или T/T, или C/C, rs2070744) являются маркерами повышенного риска артериальной гипертензии у детей; комбинация A/A, аллель A гена *AGTR2* (rs11091046), а также сочетание комбинаций *APOE* (*E3/E3*, rs429358, rs7412) *x* *NOS3* (T/C или T/T, rs2070744) являются маркерами повышенного риска артериальной гипертензии у мальчиков, а сочетание комбинаций *AGT* (M/T, rs699) *x* *NOS3*

(C/C, rs2070744) - фактором риска артериальной гипертензии у девочек. Впервые показано, что сочетание комбинаций *APOE* (E2/E3, rs429358, rs7412) \times *BRI* (*BDKRB2*) (C/C, rs1799722) \times *LPL* (C/C, rs328) является маркером повышенного риска метаболического синдрома и ожирения у детей; сочетание комбинаций *APOE* (E3/E3, rs429358, rs7412) \times *AGT* (M/M, или M/T, rs699) – характерно для мальчиков, а сочетание *APOE* (E2/E3, rs429358, rs7412) \times *BRI* (*BDKRB2*) (C/C, rs1799722) и аллель *A* гена *AGTR2* (rs11091046) и *C* гена *LPL* (rs328) – для девочек.

Впервые установлено, что линейные модели на основе генетических и клинических данных в сочетании с показателями преморбидного фона обладают наибольшей сбалансированной точностью предсказания риска мультифакторных заболеваний.

Показано, что метод GLM позволяет формировать группы риска развития гестоза и артериальной гипертензии у мальчиков на основании моделей, учитывающих только генетические данные: $\sim 0,533 - 0,284 * AGTR2$ (rs11091046) + $0,333 * MTHFR$ (rs1801133) - $2,210 * F2$ (rs1799963) (гестоз) и $\sim 0,370 - 0,438 * AGTR1$ (rs5186) + $0,297 * AGTR2$ (rs11091046) - $0,330 * MTHFR$ (rs1801133) (артериальная гипертензия).

Впервые установлено, что модели, рассчитанные с учетом возраста, гипертонической болезни, тромбозов в анамнезе, желчекаменной болезни, ожирения, эндокринной патологии и полиморфизма генов *REN* (rs2368564) + *F2* (rs1799963) позволяют предсказывать риск гестоза с вероятностью до 94%. Модели, учитывающие возраст, вес, рост, наличие повышенного АД у матери и полиморфизм генов *AGTR1* (rs5186) + *MTHFR* (rs1801133) + *ACE* (rs4340) позволяют предсказывать риск артериальной гипертензии у мальчиков с вероятностью около 85%.

Установлено, что ассоциативные сети позволяют выявлять общие и специфичные факторы риска сочетанных патологий.

Впервые показано, что секвенирование отдельных генов (на примере гена *ACVR2A* при гестозе) может быть использовано для поиска аллелей риска мультифакторных заболеваний. Установлено, что значимыми молекулярными маркерами риска гестоза являются аллели rs145399059C, rs17692648C, инсерция insAA в позиции 148642724 гена *ACVR2A*. Протективным маркером гестоза является аллель rs17742573G гена *ACVR2A*.

Впервые показано, что при гестозе на фоне гипертонической болезни изменяется уровень следующих микроРНК плаценты: miR-135b-5p, miR-195-5p, let-7f-5p, miR-34c-5p, miR-1-3p, miR-98-5p, miR-223-3p (снижение) и miR-515-3p, miR-31-5p, miR-210-3p, miR-518a-3p, miR-524-3p, miR-518c-3p, miR-520a-3p, miR-515-5p, miR-516a-5p, miR-519e-5p, miR-193b-3p, miR-4532, miR-518f-3p, miR-518a-5p, miR-518e-3p (повышение).

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний в области патогенеза гестоза, артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением у детей. В результате работы установлены общие механизмы возникновения изученных заболеваний, основанные на присутствии в генотипе специфических вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы, обмена гомоцистеина и метаболизма липидов. Разработана новая методология исследования риска многофакторных заболеваний на основании комплексного подхода с применением молекулярно-биологических, биоинформатических и статистических методов. Показана значимость исследования последовательности генов-кандидатов и проведения анализа уровня микроРНК для прогноза риска развития многофакторных заболеваний.

Практическая ценность работы состоит в том, что:

- разработана и внедрена в практику лечебно-профилактических учреждений биочиповая технология диагностики наследственной предрасположенности к многофакторным заболеваниям;
- разработаны оригинальные алгоритмы выделения с помощью генных сетей общих и специфичных факторов риска многофакторных заболеваний;
- предложены и апробированы новые GLM и MDR модели для объективизации результатов комплексных генетических и клиничко-лабораторных исследований с целью формирования групп повышенного риска многофакторных заболеваний (гестоз, артериальная гипертензия, метаболический синдром и ожирение);
- результаты работы могут служить основой для профилактики, диагностики и персонализированной терапии гестоза, артериальной гипертензии, метаболического синдрома и ожирения у детей.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Разработанные биочипы обладают высокой чувствительностью и специфичностью для диагностики наследственной предрасположенности к мультифакторным заболеваниям.

2. Определенные аллели генов ренин-ангиотензиновой системы, свертывания крови и метаболизма липидов являются факторами риска гестоза, артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением у детей.
3. Молекулярно-генетическими маркерами, ассоциированными с риском гестоза, являются аллели: rs11091046 гена *AGTR2*, rs1801133 гена *MTHFR*, rs1799768 гена *SERPINE1*, rs1799963 гена *F2*, rs7412 гена *APOE*, rs rs2368564 гена *REN*; артериальной гипертензии у девочек - rs7412 гена *APOE*, rs1799983 гена *NOS3*, rs699 гена *AGT*, артериальной гипертензии у мальчиков - rs11091046 гена *AGTR2*, rs5186 гена *AGTRI*, rs7412 гена *APOE*, rs1799983 гена *NOS3*, rs1801133 гена *MTHFR*, rs4340 гена *ACE*; ожирения и метаболического синдрома у девочек - rs11091046 гена *AGTR2*, rs328 гена *LPL*, rs7412 гена *APOE* и rs1799722 гена *BRI (BDKRB2)*, метаболического синдрома и ожирения у мальчиков - rs7412 гена *APOE*, rs699 гена *AGT*.
4. При отсутствии анамнестических и клинических данных предпочтительно использовать метод множественного снижения размерности (MDR), а при их наличии - более адекватно линейное моделирование (GLM). Тестирование определенных аллелей генов-кандидатов, дополненное расчетами коэффициента соотношения шансов (OR), и оценкой риска на основании MDR и GLM моделей позволяет сформировать группу риска по мультифакторным заболеваниям.
5. Ассоциативные сети позволяют выявлять общие и специфические факторы риска сочетанных патологий.
6. Целевое NGS секвенирование позволяет идентифицировать новые маркеры заболевания. Значимыми молекулярными маркерами риска гестоза являются аллели rs145399059C, rs17692648C, инсерция insAA в позиции 148642724 гена *ACVR2A*. Протективным маркером гестоза является аллель rs17742573G гена *ACVR2A*.
7. Маркером гестоза на фоне гипертонической болезни является изменение уровня микроРНК в плаценте: miR-135b-5p, miR-195-5p, let-7f-5p, miR-34c-5p, miR-1-3p, miR-98-5p, miR-223-3p (снижение) и miR-515-3p, miR-31-5p, miR-210-3p, miR-518a-3p, miR-524-3p, miR-518c-3p, miR-520a-3p, miR-515-5p, miR-516a-5p, miR-519e-5p, miR-193b-3p, miR-4532, miR-518f-3p, miR-518a-5p, miR-518e-3p (повышение).

Степень достоверности и апробация результатов работы. Работа проведена адекватными современными методами на обширном экспериментальном материале (более 1100 образцов биоматериала пациентов). Все полученные результаты подвергнуты корректной статистической обработке, которая позволяет подтвердить их достоверность. Обоснованность выводов, сделанных автором, определяется высоким методическим уровнем работы с использованием современного пакета программ для статистической обработки результатов с применением достоверного уровня значимости.

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих российских и международных конференциях и конгрессах: «XI Конгресс педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии», 2007, Москва; «Фундаментальная наука и клиническая медицина», 2007, Санкт-Петербург; «1-ая Международная научная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах», 2009, Пансионат «Заря», Московская область, Ступинский район; «Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», 2010, 2015, Санкт-Петербург; «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 2010, Москва; «II всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии», 2011, Курск; «Всероссийская конференция с международным участием «Пренатальная диагностика и генетический паспорт – основа профилактической медицины в век нанотехнологий», 2012, Санкт-Петербург; «Workshop The 3rd OpenGENE Young Investigator Workshop in The Baltic Region «Biobanking, New Technologies, Complex Genetic Traits and Personalized Medicine», 2012, Tartu, Estonia; «7-ая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения», 2012, Санкт-Петербург; «XX Российский национальный Конгресс «Человек и Лекарство», 2013, Москва; «ДОНОЗОЛОГИЯ-2013», 2013, Санкт-Петербург; «VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика-2014», 2014, Москва; «VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров», 2014, Ростов-на-Дону; «X научная конференция «Генетика человека и патология: проблемы эволюционной медицины», 2014, Томск; «VII съезд Российского общества медицинских генетиков», 2015, Санкт-Петербург; «III Национальный конгресс «Дискуссионные вопросы современного акушерства», 2015, Санкт-Петербург; «Международная научная конференция

Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», 2015, Санкт-Петербург; и на научных семинарах лаборатории пренатальной диагностики ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» и кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ.

Кроме того, результаты работы были представлены в виде постерных докладов на Европейских конгрессах по генетике человека (European Congress of Human Genetics Conference (ESHG), 2006, Amsterdam, The Netherlands; 2007, Nice, France; 2008, Barcelona, Spain; 2010, Gothenburg, Sweden; 2011, Amsterdam, Netherland; 2013, Paris, France; 2015, Glasgow, Scotland, United Kingdom); на конференции по перспективным исследованиям в биологии (Biologie Prospective - Santorini Conference), 2008, Santorini Island, Greece; V съезде ВОГиС, 2009, Москва; международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, 2006, Москва; 3-rd International Conference «Genomix, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine», 2006, Novosibirsk, Russia; всероссийской конференции «Перспективы фундаментальной геронтологии», 2006, Санкт-Петербург; VI European Congress «International Association of Gerontology and Geriatrics», 2007, Saint-Petersburg, Russia; Conference for Young Scientist, PhD Students and Students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of M.I.Vavilov, 2007, Kyiv, Ukraine; Донозология – 2007, 2007, Санкт-Петербург; XX International Congress of Genetics, 2008, Berlin, Germany; международном форуме по НАНОТЕХНОЛОГИЯМ Rusnanotech 08, 2008, Москва; международном форуме по нанотехнологиям, 2009, Москва; девятом российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», 2010, Москва; SysPatho Workshop «Systems Biology and Medicine», 2012, Tsarskoe Selo, Saint-Petersburg, Russia; II всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 2012, Санкт-Петербург.

Представленные в диссертации результаты связаны с научно-исследовательскими работами по персональным грантам Правительства Санкт-Петербурга (2007, 2009, 2011, 2012, 2013), гранту BRNE Fellowship competition 2006, грантам Президента Российской Федерации (2008, 2012), грантом Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.2 Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук (2009-2011), а также по грантам на проведение исследований: ГК Федерального агентства по науке и инновациям (I-04). «Развитие и массовое применение новых технологий диагностики социально-значимых заболеваний на основе молекулярных методов многопараметрического анализа», 2004-2007; ГК Федерального агентства по науке и инновациям № 02.512.11.2275: «Работы по проведению проблемно-ориентированных поисковых исследований и созданию научно-технического задела в области живых систем с участием научных организаций Украины» (шифр заявки «2009-02-1.2-00-01-002»), 2009-2010; РФФИ, 09-04-13849-офи_ц «Разработка новых методических и методологических подходов к анализу генов системы свертывания крови и фибринолиза - важных патогенетических факторов риска детского и материнского здоровья»; ГК Министерства науки и образования РФ № 02.740.11.0698 «Проведение научных исследований коллективами научно-образовательных центров в области общей биологии и генетики» шифр «2010-1.1-141-042» по теме: «Роль организации и экспрессии генетического материала в наследственной и ненаследственной изменчивости» и тема СПбГУ в рамках мероприятия 2 - «Проведение фундаментальных научных исследований по областям знаний, обеспечивающим подготовку кадров в СПбГУ», шифр ИАС 1.38.79.2012 «Исследование молекулярно-генетических детерминант здоровья студентов, занимающихся физической культурой и спортом в СПбГУ».

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в практику лечебной и учебной работы ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта», СПбГУ, ИМБ РАН, ФГАУ «Научный центр здоровья детей» МЗРФ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 69 печатных работ, в том числе 17 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 4 статьи – в высокорейтинговых зарубежных рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus и WoS, 4 статьи в прочих изданиях и 3 патента.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 417 страницах машинописного текста, содержит 76 таблиц, иллюстрирована 40 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и

обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 470 научных источников (94 – на русском языке и 346 – на иностранном) и 30 интернет-источников.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Автором лично предложена основная идея исследования, определены цель и задачи. Все результаты экспериментального исследования, составившие основное содержание работы, получены автором лично или при его непосредственном участии. Статистическая обработка и интерпретация полученных результатов, сопоставление с данными, полученными отечественными и зарубежными учеными, формулировка теоретических выводов и подготовка материалов диссертационного исследования к публикации проведены соискателем лично.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследуемых групп. Исследование проводили на образцах биологического материала, полученных от 1104 индивидуумов, в том числе от женщин с патологией беременности (гестоз) и без таковой (всего 250 человек), на образцах ДНК доноров - 228 человек, детей-школьников популяционной группы - 294 человека, детей с артериальной гипертензией (АГ) – 170 человек и детей с ожирением и метаболическим синдромом (МСО) – 162 человека.

Диагноз гестоз устанавливали при наличии не менее двух клинических проявлений в следующих сочетаниях: повышение артериального давления (АД) и отеки, отеки и протеинурия, сопровождающаяся повышением АД, а также классической триады симптомов - отеки, гипертензия, протеинурия (Айламазян, Мозговая, 2008). Диагноз артериальная гипертензия ставился в тех случаях, когда при казуальных измерениях артериального давления (АД) у ребенка неоднократно (не менее 3-х раз при отдельных визитах к врачу) отмечался повышенный уровень АД (Образцова и др., 2005). Основную группу детей с МСО составили 162 человека с ожирением и повышенным уровнем АД. Из обследуемой группы были исключены дети с вторичным ожирением, гипоталамическим синдромом пубертатно-юношеского периода, врожденными пороками развития органов и систем. Рассчитывали процент избытка массы тела по стандартным перцентильным таблицам и определяли степень ожирения по номограммам (Дедов, Петеркова, 2006;). Измеряли уровень АД; повышенным считали уровень АД > 90 перцентилей для данного возраста, пола и роста (Миняйлова, 2009).

Анализ эпигенетических маркеров был проведен на биологических образцах, полученных от 17 женщин, родоразрешенных при доношенных сроках беременности путем операции кесарева сечения. Девять женщин имели физиологически нормальную беременность (контрольная группа) и восемь – беременность, осложненную тяжелым гестозом. Из этих же групп были отобраны образцы для исследования уровня микроРНК.

От всех лиц, участвовавших в исследовании, было получено информированное согласие.

Экстракция геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови, клеток буккального эпителия и ворсин плаценты. Выделение ДНК проводили в соответствии с методикой, приведенной в руководстве Сэмбрука (Sambrook *et al.*, 1989), с некоторыми модификациями.

Обработка ДНК бисульфитом натрия. Для бисульфитной обработки геномной ДНК использовали набор реагентов «EpiTect Bisulfite Kit» («Qiagen», США). Все процедуры проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Экстракция микроРНК. Для создания коллекции образцов микроРНК из плаценты использовали набор реагентов «PureLink miRNA Isolation Kit» («Life technologies», США).

Обратная транскрипция и получение кДНК. Для создания коллекции образцов кДНК использовали набор реагентов «Ion Total RNA-Seq2 Kit», рекомендованный «Life technologies» (США) для приготовления библиотек с целью последующего полногеномного секвенирования.

Выбор праймеров. Нуклеотидные последовательности искомым фрагментов генов получали из интернет-базы «Nucleotide» и «Ensembl» («NCBI», США и Европейский союз, соответственно). Праймеры, необходимые для амплификации этих фрагментов, подбирали с использованием программы «Oligo 6» (США). Специфичность праймеров проверяли в программе «Nucleotide-nucleotide BLAST» («NCBI», США).

Амплификация фрагментов ДНК. Методом полимеразной цепной реакции исследовали полиморфизм гена: *ACE*. Методом ПЦР с последующим ПДРФ-анализом исследовали аллельные варианты генов: *APOE*, *LPL*, *PTGIS*, *CYP2J2*, *CYP4A11*, *CDH13*, *MTHFR*, *CDKN2/BAS* и межгенного маркера rs11191548.

Обработка эндонуклеазами рестрикции. Исследование аллельных вариантов генов *APOE*, *LPL*, *PTGIS*, *CYP2J2*, *CYP4A11*, *CDH13*, *MTHFR*, *CDKN2/BAS* и маркера rs11191548 проводили путем обработки эндонуклеазами рестрикции продуктов амплификации соответствующих генов.

Визуализация ПЦР продуктов. Наличие продуктов амплификации фрагментов генов, а также полноту их гидролиза оценивали по результатам электрофореза в 6% полиакриламидном геле.

Синтез олигонуклеотидов и изготовление микрочипов. Олигонуклеотиды для иммобилизации на микрочипе синтезировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer («Applied Biosystems», США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. Микроматрица была приготовлена путем фотополимеризации пористого полиакриламидного геля. Объем каждой капли был равен примерно 0,2 нл.

Амплификация фрагментов ДНК для анализа методом гибридизации на олигонуклеотидном биочипе. При проведении ПЦР фрагментов ДНК для анализа методом гибридизации на олигонуклеотидном биочипе гены объединяли в группы, соответствующие блокам олигонуклеотидных проб на биочипе. Продукт первого этапа ПЦР (1 мкл) использовали в качестве матрицы на втором этапе ПЦР.

Гибридизация меченого продукта на микрочипе. Гибридизацию на микрочипах проводили с использованием флуоресцентно меченых образцов, полученных на второй стадии мультиплексной ПЦР.

Регистрация изображения и его обработка. Флуоресцентный сигнал от ячеек микрочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов «Чипдетектор-01-«БЧ-ИМБ».

Анализ метилирования остатков цитозина в ДНК. Анализ метилирования остатков цитозина промоторного региона гена *H19* в образцах ДНК плаценты проводили с помощью метилчувствительной или метилспецифичной ПЦР, а также комбинированным бисульфитно-рестрикционным анализом, используя набор реагентов «EpiTect Bisulfite Kit» («Qiagen», США).

Создание ДНК-библиотек протяженных фрагментов ДНК методом «удлиняющей» ПЦР. Создание ДНК-библиотек проводили в два этапа. На первом этапе проводили амплификацию последовательности гена *ACVR2A* длиной в 89060 п.о. Праймеры, необходимые для амплификации фрагментов от 2,5 до 9 тыс. п.о. подбирали на основании рекомендаций производителя «удлиняющей» полимеразы («Roche», Швейцария) и данных литературы (Knierim *et al.*, 2011; Hernan *et al.*, 2012). На второй стадии подготавливали библиотеки для секвенирования, согласно инструкции «Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit» к одноименному набору («Life technologies», США).

Создание библиотек микроРНК. Библиотеки микроРНК подготавливали в соответствии с инструкцией к набору «Ion Total RNA-Seq Kit v2» («Life technologies», США).

NGS секвенирование на приборе «Ion Torrent». Для проведения секвенирования использовали «Ion 314™ Chip», «Ion 316™ Chip» или «Ion 318™ Chip» и наборы реагентов «Ion PGM™ Sequencing 300 Kit» или «Ion PGM™ Sequencing 200 Kit» («Life technologies», США). Запуск прибора планировали, внося соответствующие стартовые характеристики, на специальном ресурсе «Torrent Browser», согласно инструкции «Torrent Suite 3.4.1» («Life technologies», США). Анализ полученных данных проводили путем выравнивания нуклеотидных последовательностей против референсного генома HG 19LT, используя ресурс «Alignment v3.6.56201», и генерирования необходимых файлов форматов (*.fastq, *.bam и *.vcf) с помощью интернет-сервера «Torrent Server», согласно инструкции «Torrent Suite 3.4.1» («Life technologies», США). Поиск нуклеотидных замен осуществляли, используя стандартные установки ресурса «variant Caller v3.6.63335» этого же сервера, и, используя программу «UGENE» («Unipro», Россия).

NGS секвенирование на приборе «GS Junior». Подготовку библиотек для секвенирования проводили с помощью набора «GS Rapid Library Prep Kit» («Roche», Швейцария). Секвенирование полученной библиотеки проводили с помощью набора «GS Junior Titanium Sequencing Kit» («Roche», Швейцария) по стандартной процедуре. Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей с референсной последовательностью гена *ACVR2A* проводили с помощью программы «GS Reference Mapper» («Roche», Швейцария), генерируя файлы необходимого формата (*.sff).

Обработка данных NGS секвенирования. Аннотирование и «фильтрацию» вариантов проб ДНК после NGS секвенирования осуществляли с помощью известного ресурса wANNOVAR (Wang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012) и нового интернет-ресурса «Gene-Talk» (<http://www.gene-talk.de>). Статистические расчеты проводили, используя PLINK (Purcell *et al.*, 2007) и SnpSift (Cingolani *et al.*, 2012). Функциональную значимость выявленных замен проводили с помощью ресурсов

Polyphen2 (Kumar *et al.*, 2009) и SIFT (Adzhubei *et al.*, 2010). Анализ уровня микроРНК проводили, используя новый алгоритм CAP-miRSeq (Sun *et al.*, 2014). Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью пакета edgeR» (Robinson *et al.*, 2010).

Построение ассоциативных сетей. Для построения ассоциативных сетей использовали компьютерную систему «ANDSystem» (Demenev *et al.*, 2012) и «STRING» (Franceschini *et al.*, 2013).

Статистическая обработка данных. Сравнение количественных показателей выборок на нормальность проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение выборок по количественным показателям осуществляли с помощью U-критерия Манна-Уитни, коэффициент корреляции вычисляли методом Спирмена, проверку соответствия распределения комбинации аллелей ожидаемому рассчитывали методом χ^2 , анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью программы MDR (Ritchie *et al.*, 2001), расчет показателя соотношения шансов, построение логистических регрессионных моделей, «ROC-кривых» проводили с применением пакетов программ «GraphPad InStat» (США), «STATISTICA 12.0 (США) и в среде для статистических вычислений «R» с помощью программы «R Cloud Workbench» (Goncalves *et al.*, 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РАЗРАБОТКА БИОЧИП-ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА.

Система свертывания крови – «Фибр-биочип». Ранее нами был разработан алгоритм создания биочипов (Глозов *и др.*, 2005). В рамках данного алгоритма были созданы «Фармакогенетический биочип» и «Кардио-чип». Для реализации цели настоящей работы был разработан еще один тематический микрочип - «Фибр-биочип». При создании «Фибр-биочипа» были выбраны варибельные участки 6 генов: *F5* (1691G>A), *F2* (20210G>A), *SERPINE1* или *PAII* (-675 5G>4G), *FGB* (455G>A), *ITGB3* или *GP3a* (1565T>C) и *MTHFR* (677C>T), которые ассоциированы с регуляцией процессов коагуляции и имеют важное значение в развитии патологии беременности. Олигонуклеотидные пробы в составе биочипа сгруппированы в блоки. **Блок №1** предназначен для выявления полиморфизма по генам *F5* (1691G>A), *F2* (20210G>A), *FGB* (455G>A). **Блок №2** предназначен для анализа полиморфизма в генах *SERPINE1* (-675 5G>4G), *ITGB3* или *GP3a* (1565T>C) и *MTHFR* (677C>T). Примеры гибридизаций на этом биочипе приведены на рис. 1.

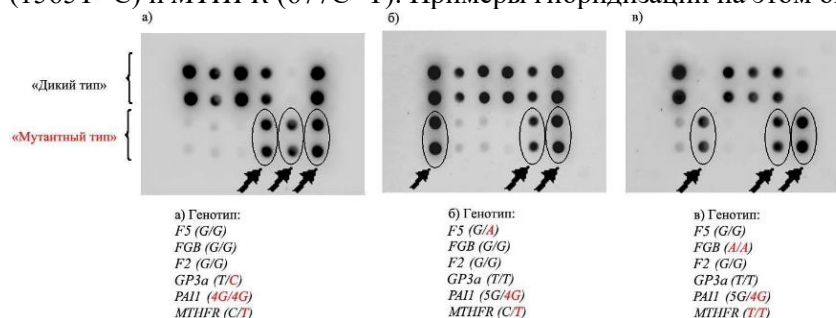


Рис. 1. Гибридизация на «Фибр-чипе» (Вашукова *и др.*, 2008). Стрелками на рисунке и красным шрифтом в подписях отмечены обнаруженные «мутантные» варианты (овалом выделены такие ячейки).

Биочип протестирован на 100 контрольных и 300 клинических образцах. Результаты тестирования контрольных образцов (идентификация мутаций в них проводили так же методами ПДРФ-анализа, секвенированием и другими) показали полное совпадение. Анализ клинических образцов выявил пять расхождений из 1800 проанализированных полиморфных вариантов. Таким образом, точность данного метода равна 99,9%. Чувствительность биочипа сопоставима с таковой у «Фармакогенетического биочипа» и «Кардиочипа» (Глозов *и др.* 2005, 2007), и составляет 10 нг геномной ДНК. Технология биочипов удобна для быстрого и точного определения (скринингования) несколько десятков замен. Разработанный нами блочный принцип конструирования биочипа позволяет достаточно быстро адаптировать эту технологию для решения практических задач. Блочный подход особенно предпочтителен для анализа генетических маркеров определенных метаболических путей (в случае «Фибр-биочипа» и «Кардиочипа»).

Оценка преимуществ метода гибридизации на биочипах для изучения генетического полиморфизма человека. Несмотря на активное развитие в последние 5-10 лет технологии полногеномного секвенирования, масспектрометрии и других методов, гибридизация на биочипах низкой плотности сохраняет большие перспективы, благодаря её низкой стоимости и возможности быстрого, точного и одновременного анализа многих генов и мутаций (Gryadunov *et al.*, 2011; Marasso *et al.*, 2014). Разработанный нами «Фибр-биочип» предназначен, прежде всего, для

рутинной диагностики. Приоритетом «Фибр-биочипа» остается диагностика наследственной тромбофилии, которая является риском развития ряда патологий, включая гестоз и тромбоз (Kupferminc, 2005; Vlachou *et al.*, 2010). Среди зарубежных аналогов можно выделить такие разработки как трехсенсорная панель для детекции мутаций в генах тромбофилии (Vlachou *et al.*, 2010), Verigene® F5/F2/MTHFR тест (Lefferts *et al.*, 2009), и другие. Большинство этих разработок пока не внедрены в практику, тогда как «Фибр-биочипа» (торговая марка «ПФ-биочип» (Тромбо) уже широко используется в клинике. Только в ФГБНУ «НИИ АГиР им.Д.О.Отта» с помощью микрочиповой технологии в год проводят более 1500 анализов.

Большинство современных биочипов являются SNP-микрочипами, с помощью которых можно исследовать более миллиона однонуклеотидных замен одновременно. Такие биочипы дороги, однако их можно использовать в микроделеционном анализе (Riggs *et al.*, 2014), в исследованиях типа GWAS (Smith *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2013), а также при диагностике некоторых наследственных заболеваний и МФЗ (Moutereau *et al.*, 2004; Theodoraki *et al.*, 2010). Несмотря на преимущества биочипов «высокой плотности», сегодня они быстро замещаются технологией секвенирования следующего поколения (NGS). NGS является наиболее высокопродуктивной технологией исследования генома (Ong *et al.*, 2013). Однако и она не лишена ряда недостатков, главным из которых является высокая частота так называемых «indel error rate» - ошибок при детекции инсерций и делеций (Robasky *et al.*, 2014). На примере анализа полиморфизма в генах *SERPINE1* (*PAI1*), rs1799762 (5G>4G) и *MTHFR* (C/T, rs1801133) было проведено сравнение метода биочипов и NGS секвенирования (Glotov *et al.*, 2016). Установлено, что обе технологии с высокой точностью определяют генотипы по гену *MTHFR* (C/T, rs1801133), однако при детекции 5G>4G замены по гену *SERPINE1* (вариант «инсерция/делеция») возникают трудности. Определять данный вариант способен только метод биочипов, тогда как при NGS секвенировании он регистрируется исключительно только как 4G/4G. Такая особенность объясняется плохой детекцией технологией полупроводникового секвенирования гомополимеров нуклеотидов (Robasky *et al.*, 2014). А так как подобных замен в геноме человека немало (Robasky *et al.*, 2014), развитие альтернативных NGS секвенированию методов генетической диагностики остается одной из приоритетных задач биомедицины.

Таким образом, ни одна из существующих технологий анализа ДНК не является универсальной, ее выбор во многом определяется задачами исследования. При необходимости рутинной диагностики, нацеленной на анализ ограниченного числа полиморфных сайтов, технология биочипов остается вполне востребованной и сегодня.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ И ПОИСК НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РИСКА ГЕСТОЗА, АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ОЖИРЕНИЯ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ.

Несмотря на длительную историю исследования патогенеза гестоза, артериальной гипертензии и ожирения с метаболическим синдромом, вклад наследственного компонента в их возникновение и развитие не выяснен. В настоящей работе проведено исследование аллелей отдельных генов-кандидатов данных болезней с использованием двух микрочипов - «Кардио-биочипа» и «Фибр-биочипа», с помощью ПЦР/ПДРФ анализа, а также метода секвенирования следующего поколения. Были изучены особенности распределения частот аллелей и их комбинации для более двадцати генов, регулирующих четыре важнейшие функции организма: АД, свертываемость крови, функцию эндотелия и липидный обмен, а также проведен углубленный анализ вклада отдельных генов и генных систем в патогенез заболеваний. Кроме того, методом NGS проведено «целевое» секвенирование нуклеотидной последовательности гена-кандидата МФЗ, изучен уровень микроРНК и роль некоторых эпигенетических маркеров в патогенезе МФЗ, показаны перспективы исследований с помощью ассоциативных сетей.

Наследственные маркеры гестоза.

Сравнительный анализ частот аллелей и их комбинаций. С помощью биочипов: «Кардио-биочип» (Глотов *и др.*, 2007), «Фибр-биочип» и методом ПЦР-ПДРФ изучены полиморфные сайты следующих 16-ти генов: *REN* (-83G>A), *AGT* (M235T), *AGTR1* (1166A>C), *AGTR2* (3123C>A), *BDKRB2* (-58T>C), *ADRB2* (48A>G, 81C>G), *MTHFR* (677C>T), *F5* (1691G>A), *ITGB3* (196C>T), *SERPINE1* (5G>4G), *FGB* (455G>A), *F2* (20210G>A), *APOE* (*E2*, *E3*, *E4*), *LPL* (Ser447Stop), *NOS3* (-786T>C), *ACE* (I/D). Сравнительный анализ частот аллелей и их комбинаций для генов *APOE*, *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *BDKRB2*, *NOS3*, *LPL*, *F5*, *ITGB3*, *FGB* не выявил статистически значимых различий между группой женщин с патологией беременности (гестоз) и женщинами с

физиологической беременностью (см. табл. 1). Однако такие различия были выявлены по комбинациям аллелей четырех генов: *AGTR2*, *MTHFR*, *SERPINE1*, *F2* (см. табл. 1). В частности, было выявлено преобладание комбинации C/A для гена *AGTR2* и G/A для гена *F2* в контрольной группе по сравнению с группой больных ($p=0,014$ и $p=0,022$, соответственно). С другой стороны, было обнаружено, что комбинация C/T для гена *MTHFR* и 5G/4G для гена *SERPINE1* преобладают в группе с гестозом по сравнению с таковыми в контрольной группе ($p=0,021$ и $p=0,003$, соответственно) (см. табл. 2).

Таблица 1.

Сравнительный анализ частот аллелей и их комбинаций для генов *APOE*, *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, *NOS3*, *LPL*, *F5*, *ITGB3*, *SERPINE1*, *FGB*, *F2* у женщин с гестозом и в контрольной группе беременных.

Ген	Исследуемый аллельный вариант/номер rs	Комбинации аллелей			Аллели		
		χ^2	P	p'	χ^2	p	p'
<i>APOE</i>	E2/E3/E4: Cys112Arg / rs429358 Arg158Cys / rs7412	3,77	0,29	0,40	0,72	0,70	1,00
<i>REN</i>	I9-83G>A, rs2368564	1,40	0,50	0,61	1,06	0,30	0,74
<i>AGT</i>	M235T, rs699	2,99	0,22	0,40	0,65	0,42	0,76
<i>AGTR1</i>	1166A>C, rs5186	2,65	0,27	0,40	0,81	0,37	0,74
<i>AGTR2</i>	3123C>A, rs11091046	6,29	*0,04	0,16	1,75	0,19	0,69
<i>MTHFR</i>	677C>T, rs1801133	6,18	*0,05	0,16	1,71	0,19	0,69
<i>BKR2</i>	-58T>C, rs1799722	2,55	0,28	0,40	0,85	0,36	0,74
<i>NOS3</i>	Glu298Asp, rs1799983	0,03	0,98	0,98	<0,01	0,97	1,00
<i>LPL</i>	S447X, rs328	5,56	0,06	0,18	0,01	0,92	1,00
<i>F5</i>	1691G>A (Arg506Gln) rs6025	0,36	0,55	0,61	0,36	0,55	0,90
<i>ITGB3 (GP3a)</i>	1565 T>C (Leu33Pro) rs5918	1,29	0,53	0,61	<0,01	1,00	1,00
<i>PAII (SERPINE1)</i>	-675 5G>4G, rs1799768	9,53	*0,01	0,08	1,300	0,25	0,74
<i>FGB</i>	455G>A, rs1800790	0,18	0,91	0,97	<0,01	1,00	1,00
<i>F2</i>	20210G>A, rs1799963	4,05	*0,04	0,16	3,99	*0,05	0,69

*- статистически значимые отличия

Таблица 2.

Коэффициент отношения шансов по частотам аллелей и комбинаций аллелей для генов *AGTR2*, *MTHFR*, *SERPINE1*, *F2* у женщин с гестозом по сравнению с таковыми у беременных контрольной группы.

Ген	Аллели / комбинации аллелей	Беременные, гестоз, N	Беременные, контроль, N	Значение p	ОШ (95% ДИ)
<i>AGTR2</i>	Аллели, число				
	C	143	113	0,168	0,77 (0,53-1,12)
	A	143	87	0,168	1,30 (0,89-1,90)
	Комбинации аллелей, число				
	C/C	42	16	-	-
	C/A	61	55	*0,014	0,43 (0,20-0,87)
<i>MTHFR</i>	Аллели, число				
	C	199	159	0,188	0,75 (0,49-1,14)
	T	91	51	0,188	1,34 (0,88-2,05)
	Комбинации аллелей, число				
	C/C	64	58	-	-
	C/T	71	33	*0,021	1,95 (1,09-3,50)
<i>SERPINE1</i>	Аллели, число				
	5G	120	97	0,235	0,80 (0,55-1,16)
	4G	172	111	0,235	1,25 (0,86-1,82)
	Комбинации аллелей, число				
	5G/5G	18	27	-	-

	5G/4G	84	43	*0,003	2,91 (1,38-6,30)
	4G/4G	44	34	0,094	1,91 (0,87-4,39)
<i>F2</i>	Аллели, число				
	<i>G</i>	291	202	*0,023	8,61 (1,03-398,14)
	<i>A</i>	1	6	*0,023	0,12 (0,003-0,97)
	Комбинации аллелей, число				
	<i>G/G</i>	145	98	-	-
	<i>G/A</i>	1	6	*0,022	0,11 (0,002-0,96)
	<i>A/A</i>	0	0	отсутствует	отсутствует

Примечание: - комбинации аллелей/аллели сравнения; *- статистически значимые значения.

Анализ ассоциации изученных вариантов генов с показателями артериального давления и концентрацией белка в моче у женщин с гестозом. Для проведения корреляционного анализа комбинации аллелей присваивали определенное ранговое значение (см. табл. 3) и рассчитывали коэффициент корреляции. Статистически значимых различий между показателями «САД», «ДАД», «концентрация белка в моче» и комбинациями аллелей каждого гена у беременных женщин с гестозом выявлено не было (см. табл. 4).

Таким образом, сравнительный анализ частот комбинаций аллелей большинства генов, каждый из которых ранее был идентифицирован как потенциальный ген-кандидат гестоза, не выявил их достоверной ассоциации с гестозом. Исключения составили только гены *AGTR2*, *MTHFR*, *SERPINE1* и *F2*. Проведенный анализ также не позволил выявить корреляционной зависимости между такими важными клиническими маркерами гестоза как АД и концентрация белка в моче. По всей видимости, исследование вклада единичных генов в риск МФЗ является важным, но не достаточным для понимания механизма развития заболеваний, учитывая их комплексный характер. Адекватная оценки риска МФЗ требует разработки математической модели МФЗ, основанной на комплексном исследовании генетического полиморфизма.

Таблица 3.

Ранговые значения комбинации аллелей для корреляционного анализа.

ГЕН	Номер rs	Ранговое значение комбинаций аллелей					
		0	1	2	3	4	5
<i>APOE</i>	rs429358, rs7412	E3/E3	E3/E4	E2/E3	E4/E4	E2/E4	E2/E2
<i>REN</i>	rs2368564	G/G	G/A	A/A	-	-	-
<i>AGT</i>	rs699	T/T	M/T	M/M	-	-	-
<i>AGTR1</i>	rs5186	A/A	A/C	C/C	-	-	-
<i>AGTR2</i>	rs11091046	C/C	C/A	A/A	-	-	-
<i>BDKRB2 (BKR2)</i>	rs1799722	C/C	T/C	T/T	-	-	-
<i>MTHFR</i>	rs1801133	C/C	C/T	T/T	-	-	-
<i>NOS3</i>	rs1799983	T/T	T/C	C/C	-	-	-
<i>LPL</i>	rs328	C/C	C/G	G/G	-	-	-
<i>F5</i>	rs6025	G/G	G/A	A/A	-	-	-
<i>SERPINE1</i>	rs1799768	4G/4G	5G/4G	5G/5G	-	-	-
<i>ITGB3 (GP3a)</i>	rs5918	T/T	T/C	C/C	-	-	-
<i>F2</i>	rs1799963	G/G	G/A	A/A	-	-	-
<i>FGB</i>	rs1800790	G/G	G/A	A/A	-	-	-

Таблица 4.

Корреляционная связь между показателями «САД», «ДАД», «концентрация белка в моче» и комбинациями аллелей для генов *APOE*, *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, *NOS3*, *LPL*, *F5*, *ITGB3*, *SERPINE1*, *F2*, *FGB* у беременных с гестозом.

ГЕН	Номер rs	Систолическое давление (САД), мм.рт.ст.			Диастолическое давление (ДАД), мм.рт.ст.			Белок, г/л.		
		коэфф ициент коррел яции	p-value	N	коэфф ициент коррел яции	p-value	N	коэфф ициент коррел яции	p-value	N
<i>APOE</i>	rs429358, rs7412	0,09	0,48	61	-0,06	0,66	61	-0,12	0,35	61
<i>REN</i>	rs2368564	-0,07	0,38	145	0,05	0,55	145	0,01	0,89	139

<i>AGT</i>	rs699	-0,06	0,48	145	0,04	0,67	145	-0,04	0,61	139
<i>AGTR1</i>	rs5186	-0,04	0,60	145	-0,06	0,47	145	-0,02	0,80	139
<i>AGTR2</i>	rs11091046	0,10	0,22	145	0,09	0,31	145	-0,02	0,78	139
<i>BDKRB2</i> (<i>BKR2</i>)	rs1799722	-0,04	0,67	145	-0,07	0,41	145	0,02	0,84	139
<i>MTHFR</i>	rs1801133	-0,01	0,86	145	0,14	0,09	145	0,01	0,92	139
<i>NOS3</i>	rs1799983	0,27	0,04	59	0,24	0,06	59	0,13	0,32	59
<i>LPL</i>	rs328	-0,06	0,63	59	-0,06	0,64	59	-0,19	0,14	59
<i>F5</i>	rs6025	-0,07	0,40	146	0,00	0,96	146	-0,05	0,57	140
<i>SERPINE1</i>	rs1799768	-0,04	0,62	146	0,11	0,19	146	0,04	0,62	140
<i>ITGB3</i> (<i>GP3a</i>)	rs5918	0,07	0,38	146	0,05	0,59	146	-0,06	0,49	140
<i>F2</i>	rs1799963	0,10	0,24	146	0,13	0,12	146	0,04	0,64	140
<i>FGB</i>	rs1800790	-0,10	0,23	146	-0,08	0,32	146	-0,03	0,72	140

Математические модели риска гестоза. Согласно данным литературы в развитии Г, АГ и МСО, как и любой другой мультифакторной патологии, играют роль не столько отдельные полиморфные локусы генов-кандидатов, сколько сложные взаимодействия между ними (Tempfer *et al.*, 2004; Vefring *et al.*, 2004; Баранов, 2009; Халфорд-Князева *и др.*, 2013). Исходя из этого, для оценки этих взаимодействий были апробированы три математические модели: оценка «баллов», метод множественного снижения размерности («оценка» риска по анализу взаимодействия генов) и обобщённая линейная модель (моделирование болезни путем учета всех факторов риска).

Статистически значимых отличий «суммы баллов комбинаций аллелей» и «суммы неблагоприятных баллов» по генам ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем между пациентами с гестозом (N=145) и контрольной группой беременных женщин (N=100) выявлено не было (p=0,34 и p=0,81, для обоих данных подходов соответственно).

Для анализа взаимодействия генов в формировании предрасположенности к гестозу методом MDR были взяты следующие гены: *APOE*, *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, *NOS3*, *LPL*. Наилучшие характеристики имеет двухлокусная модель гестоза - *APOE* (*E2/E3/E4*) x *AGTR2* (*C/A*) со средней степенью воспроизводимости CVC=5/10 и со сбалансированной точностью 0,81. Наиболее значимой оказалась комбинация пониженного риска: *APOE* (*E3/E3*) x *AGTR2* (*C/A*) (p=5,30*10⁻⁸, OR=0,18, 95%ДИ: 0,085-0,350). Данная модель не позволяет выявлять статистически значимые варианты комбинаций аллелей повышенного риска, однако с её помощью можно выявлять протективные сочетания комбинаций аллелей.

Таблица 5.

Комбинации аллелей повышенного и пониженного риска гестоза.

Группа/генотип	Гестоз (N=146), N (%)	Контроль (N=104), N (%)	p	OR (95%ДИ)
2-х локусная модель				
Варианты комбинаций аллелей повышенного риска				
<i>APOE</i> (<i>E3/E3</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/C</i>)	15 (10,3)	7 (6,7)	0,37	1,60 (0,580 - 4,800)
Варианты комбинаций аллелей пониженного риска				
<i>APOE</i> (<i>E2/E3</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/C</i>)	1 (0,7)	4 (3,8)	0,16	0,17 (0,004 - 1,800)
<i>APOE</i> (<i>E3/E4</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>A/A</i>)	2 (1,4)	7 (6,7)	0,04	0,19 (0,019 - 1,000)
<i>APOE</i> (<i>E3/E4</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/A</i>)	3 (2,1)	8 (7,7)	0,06	0,25 (0,042 - 1,100)
<i>APOE</i> (<i>E3/E3</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/A</i>)	16 (11)	43 (41,3)	5,3e-08	0,18 (0,085 - 0,350)
3-х локусная модель				
Варианты комбинаций аллелей повышенного риска				
<i>APOE</i> (<i>E3/E3</i>) x <i>AGT</i> (<i>T/T</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/C</i>)	5 (3,4)	2 (1,9)	0,70	1,80 (0,290 - 19,290)
<i>APOE</i> (<i>E3/E3</i>) x <i>AGT</i> (<i>M/M</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/C</i>)	5 (3,4)	0 (0)	0,08	Inf (0,66 - Inf)
Варианты комбинаций аллелей пониженного риска				
<i>APOE</i> (<i>E3/E4</i>) x <i>AGT</i> (<i>M/T</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>A/A</i>)	1 (0,7)	4 (3,8)	0,16	0,17 (0,003 - 1,787)
<i>APOE</i> (<i>E3/E3</i>) x <i>AGT</i> (<i>M/M</i>) x <i>AGTR2</i> (<i>C/A</i>)	2 (1,4)	15 (14,4)	5,81e-05	0,08 (0,009 - 0,371)

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p<0,05); OR - отношение шансов; ДИ - доверительный интервал

GLM (обобщённая линейная модель) позволяет моделировать болезни путем учета всех факторов риска. Для оценки риска гестоза (табл. 6) в модель были включены гены: *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, *F5*, *ITGB3*, *SERPINE1*, *F2*, *FGB*, а также клинические данные и данные преморбидного фона: возраст (В), срок беременности (СРОК), наличие гипертонической

болезни (ГБ), тромбозы в анамнезе (ТБвАН), тяжелый гестоз в анамнезе (ТГаАН), наличие хронического пиелонефрита (ХрПНФ), желчекаменная болезнь (ЖКБ), ожирение (ОЖ), эндокринные нарушения (ЭНД), пиелонефрит беременных (ПНБ), анемия беременных (АБ). Варианты моделей приведены в табл. 6. Первая из них включает только гены, вторая – только клинические данные и данные преморбидного фона, третья – и те, и другие. В формулу первой модели вошли следующие параметры: $\sim AGTR2 + MTHFR + F2$. Ее сбалансированная точность составила всего 53,6%, что не позволяет предсказывать риск развития заболевания по генотипам соответствующих генов. Формула второй модели включала: \sim СРОК + ГБ + ХрПНФ + ЖКБ + ОЖ + ЭНД + АБ. Ее сбалансированная точность составила 92,0%. Данная точность является достаточно высокой, и при наличии всех параметров позволяет надежно предсказывать заболевание. Формула третьей модели включала следующие параметры: \sim В + СРОК + ГБ + ТГвАН + ХрПНФ + ЖКБ + ОЖ + ЭНД + *REN* + *F2*. Ее сбалансированная точность составила 94,2% и оказалась самой высокой. При наличии в анамнезе всех параметров она позволяет надежно предсказывать заболевание.

Таблица 6.

Параметры и характеристики регрессионных моделей гестоза, полученные на основании генетических и клинических данных.

№	Параметры модели	Размер выборки	Модель	Характеристики			Сбалансированная точность, %
				Параметры	Значение коэффициента	P	
1	<i>REN, AGT, AGTR1, AGTR2, BDKRB2, MTHFR, F5, ITGB3, SERPINE1, F2, FGB</i>	244	$\sim AGTR2 + MTHFR + F2$	Свободный член уравнения	0,533	0,040	53,6
				<i>AGTR2</i>	-0,284	0,129	
				<i>MTHFR</i>	0,333	0,122	
				<i>F2</i>	-2,210	0,043	
2	Возраст (В), срок беременности (СРОК), наличие гипертонической болезни (ГБ), тромбозы в анамнезе (ТБвАН), тяжелый гестоз в анамнезе (ТГаАН), наличие хронического пиелонефрита (ХрПНФ), желчекаменная болезнь (ЖКБ), ожирение (ОЖ), эндокринные нарушения (ЭНД), пиелонефрит беременных (ПНБ), анемия беременных (АБ)	246	\sim СРОК + ГБ + ХрПНФ + ЖКБ + ОЖ + ЭНД + АБ	Свободный член уравнения	34,860	1,735* 10-6	92,0
				СРОК	-0,961	6,563* 10-7	
				ГБ	17,080	0,994	
				ХрПНФ	1,431	0,013	
				ЖКБ	22,240	0,997	
				ОЖ	0,631	0,149	
				ЭНД	19,330	0,993	
				АБ	0,894	0,098	
				3	<i>REN, AGT, AGTR1, AGTR2, BDKRB2, MTHFR, F5, ITGB3, SERPINE1, F2, FGB</i> , возраст (В), срок беременности (СРОК), наличие гипертонической болезни (ГБ), тромбозы в анамнезе (ТБвАН), тяжелый гестоз в анамнезе (ТГаАН), наличие хронического пиелонефрита (ХрПНФ), желчекаменная болезнь (ЖКБ), ожирение (ОЖ), эндокринные нарушения (ЭНД), пиелонефрит беременных (ПНБ), анемия беременных (АБ)	240	
В	-0,075	0,154					
СРОК	-0,995	2,202* 10-6					
ГБ	17,590	0,994					
ТГвАН	19,360	0,998					
ХрПНФ	1,283	0,030					
ЖКБ	22,500	0,997					
ОЖ	0,681	0,114					
ЭНД	19,370	0,994					
<i>REN</i>	0,740	0,103					
<i>F2</i>	-2,746	0,150					

Анализ результатов, полученных с помощью математических моделей, был проведен с применением ROC-кривых (табл. 7). Исходя из экспертной шкалы и показателя AUC (табл. 7), модели, основанные только на «генетике», не обладали высокой достоверностью, тогда как модели, учитывающие как клинические данные, так и данные преморбидного фона, обладали значительно большей предсказательной силой. Таким образом, из проведенных расчетов следует, что до начала заболевания и при первых его симптомах с уверенностью предсказывать риск развития гестоза достаточно сложно, а можно лишь с уверенностью относить пациента к группе риска этой патологии.

Значение показателя AUC для регрессионных моделей гестоза

Показатели	Гестоз:
Гены	0,601
Клинические данные (включая преморбидный фон)	0,968
Генетические и клинические данные с преморбидным фоном	0,970

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при наличии только генетической информации целесообразно использовать метод MDR, тогда как использование GLM моделей более эффективно при наличии помимо генетической как минимум анамнестической информации. Метод подсчета баллов при предсказании риска данного заболевания оказался неэффективным.

Реконструкция первичной генной сети гестоза. Гестозосома. Для реконструкции ассоциативной генной сети гестоза - гестозосомы (Glotov *et al.*, 2015) использовали подход, реализованный в системе «ANDSystem» (Demenev *et al.*, 2012). Данная реконструкция подразумевала построение ассоциативных сетей (ассоциом гестоза), отражающих молекулярно-генетические взаимодействия между синтропными генами, нарушение работы которых являются общими факторами риска синтропных (патогенетически родственных) с гестозом заболеваний. Анализ данной сети позволил выделить четыре общих гена (рис. 2), которые «связывают» гестоз с другими болезнями: *REN*, *LPL*, *SERPINE1 (PAI1)* и *VEGF*. Построенная сеть включала 186 генов (см. рис. 2). Для каждого заболевания выявлены взаимосвязи с разным числом генов. Больше всего генов ассоциировано с сахарным диабетом и ожирением, меньше – с гестозом, и с гестационным диабетом. Большинство генов связаны с каким-то одним заболеванием, и только некоторые ассоциированы с несколькими болезнями одновременно.

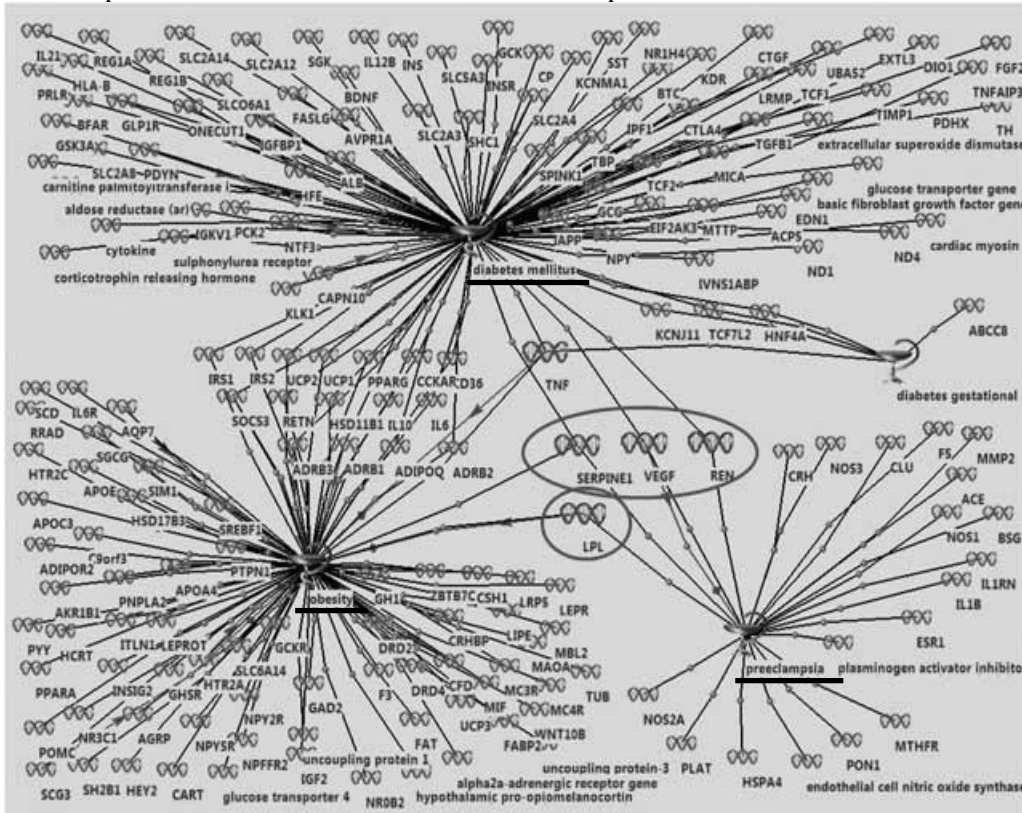
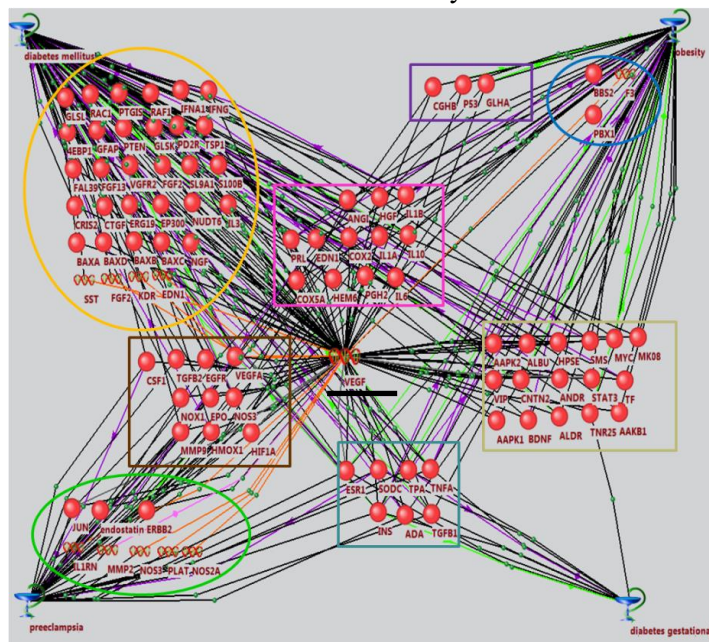


Рис. 2. Генетическая ассоциативная сеть связей гестоза (справа внизу) с сахарным диабетом (сверху), ожирением (слева внизу) и диабетом беременных (справа). Овалом выделены гены, ассоциированные с несколькими патологиями.

Генетическая сеть гестоза еще раз подтвердила факт того, что природа этого заболевания определяется многими факторами, понимание последовательного включения которых может объяснять сложную природу этой патологии.

Реконструкция первичных ассоциативных сетей молекулярных механизмов. Проведена реконструкция сети молекулярно-генетических взаимодействий между генами и белками, ассоциированных с гестозом, с одной стороны, и с сахарным диабетом, ожирением и гестационным диабетом – с другой. Во всех случаях построены сети 4-го уровня. Чтобы проследить регуляторные пути разных заболеваний был использован модуль «Pathway Discovery» программы «ANDVisio». Для всех ассоциативных генетических сетей были выделены общие и дифференцирующие (специфичные) факторы риска. Ассоциативная сеть, включающая гены и

белки, которые связывают гестоз через ген *VEGF* с сахарным диабетом, ожирением и диабетом беременных, включала 11 генов, 82 белка, объединенных 320-тью связями (см. рис. 3). Дифференцирующими факторами риска гестоза в данной сети оказались пять генов (антагонист рецептора к интерлейкину 1 (*IL1RN*), металлопротеаза *MMP2*, эндотелиальная (*NOS3*) и индуцибельная (*NOS2A*) NO-синтазы, тканевой активатор плазминогена (*PLAT*) и три белка (белок-активатор *JUN*, эндостатин и протоонкоген *ERBB2*). Ассоциативная сеть, включающая гены и белки, которые связывают гестоз через ген *LPL* с сахарным диабетом, ожирением и диабетом беременных, включала 4 гена и 24 белка, которые были объединены 122-мя связями. Дифференцирующих факторов риска гестоза в данной сети не установлено. Ассоциативная сеть, которая связывает гестоз через ген *REN* с сахарным диабетом, ожирением и диабетом беременных, включала 2 гена и 28 белков, объединенных 133-мя связями преимущественно типа «association». В этой сети, однако, был выявлен только один дифференцирующий фактор риска гестоза – белок рецептора 1 к ангиотензину II (*AGTR1*). Ассоциативная сеть генов и белков, которые связывают гестоз через ген *SERPINE1* с сахарным диабетом, ожирением и диабетом беременных включает 4 гена, 52 белка, объединенных 155-ю связями. Дифференцирующими факторами риска гестоза в данной сети были три объекта – два гена: метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) и тканевой активатор плазминогена (*PLAT*); и трансформирующий белок RHOA. Все эти факторы связаны с геном *SERPINE1* и гестозом по типу «association».



Общие факторы риска:
гестоз и сахарный диабет,
гестоз и сахарный диабет с ожирением,
гестоз и все заболевания,
гестоз и ожирение
для всех патологий кроме гестоза

Дифференцированные факторы риска:
Гестоз
Сахарный диабет
Ожирение
Диабет беременных

Рис. 3. Ассоциативная сеть генов и белков, связывающая гестоз (слева внизу) через ген *VEGF* (подчеркнут) с сахарным диабетом (слева сверху), ожирением (справа сверху) и диабетом беременных (справа внизу).

Реконструкция ассоциативных связей гестоза, сахарного диабета, ожирения и диабета беременных с помощью программ «ANDSystem» и «STRING». С помощью программ - «ANDSystem» и «STRING» были построены две независимые сети молекулярно-генетических взаимодействий при гестозе, сахарном диабете, ожирении и диабете беременных». Данные сети включали как гены, так и белки, которые объединяли в одну общую единицу, поскольку программа «STRING» не позволяет отделять гены от белков (Demenev *et al.*, 2012). Молекулярно-генетические взаимодействия 16 общих («shared») белков/генов, построенные с помощью независимых программ «ANDSystem» и «STRING» и их объединённая сеть приведены на рис. 4. В объединённой сети связанными оказались уже 63 пары генов, что на 18 больше, чем в геновой сети «ANDSystem» и на 18 больше, чем в сети «STRING» (Glotov *et al.*, 2015). Применение данного подхода (когда используется несколько биоинформатических программ) обеспечивает большую достоверность полученных результатов и позволяет надеяться, что теоретические данные получат подтверждение на практике.

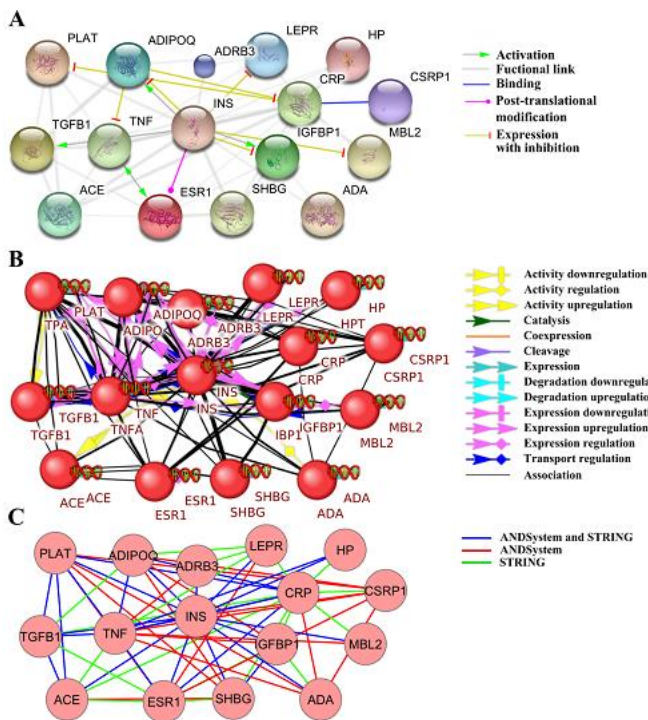
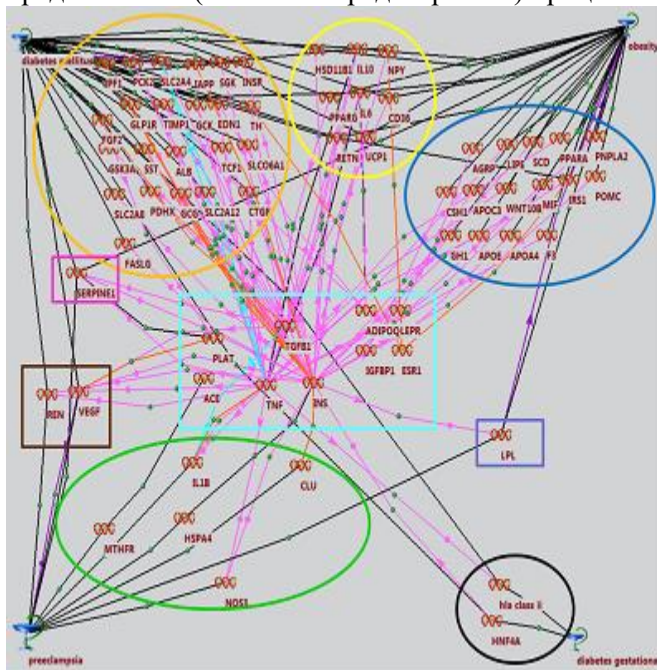


Рис. 4. Ассоциативные молекулярно-генетические сети белков/генов гестоза, СД, ожирения и гестационного диабета. Сети построены с помощью программ «STRING» (А) «ANDSystem» (В), и с помощью обеих программ (С). В сети «ANDSystem» шариками показаны белки, картинками с двойной спиралью обозначают гены. В сети «STRING» шариками показаны гены/белки (даны названия белков). Объединённая сеть построена с помощью программы «Cytoscape» (Smoot et al., 2011). Линии и стрелки во всех трёх сетях указывают на связь между элементами. В сетях «ANDSystem» и «STRING» цвет и форма стрелок указывают на тип связи. Цвет линий в объединённой сети указывает на источник связи (красный – «ANDSystem», зелёный – «STRING», синий – связь присутствует в обеих сетях «ANDSystem» и «STRING») (по Glotov et al., 2015).

Реконструкция ассоциативных сетей гестоза, сахарного диабета, ожирения и диабета беременных на основании данных сверхпредставленности биологических процессов. Для поиска общих процессов, которые лежат в основе гестоза, СД, ожирения и гестационного диабета, проведен анализ сверхпредставленности биологических процессов - GO (т.е. тех процессов, которые наиболее часто встречаются при том или ином фенотипе). Анализ был проведен как для групп белков/генов, ассоциированных отдельно с каждым из рассматриваемых заболеваний, так и для групп белков/генов, общих для пар заболеваний, а также для белков/генов, ассоциированных одновременно с 4 заболеваниями (Glotov et al., 2015). В каждом варианте найдено более 1000 сверхпредставленных процессов. После была проведена реконструкция молекулярно-генетических взаимодействий между генами *PLAT*, *ADIPOQ*, *ADRB3*, *LEPR*, *HP*, *TGFB1*, *TNFA*, *INS*, *CRP*, *CSR1*, *IGFBP1*, *MBL2*, *ACE*, *ESR1*, *SHBG*, *ADA*, выявленными с помощью анализа сверхпредставленности биологических процессов, и программами «ANDSystem» и «STRING». После фильтрации сети 4-го уровня было выявлено 9-ть наиболее значимых генов - *PLAT*, *ADIPOQ*, *LEPR*, *TGFB1*, *TNFA*, *INS*, *IGFBP1*, *ACE*, *ESR1* и установлены общие факторы риска для таких сочетаний как: гестоз + сахарный диабет, гестоз + сахарный диабет + ожирение, гестоз + все 3 заболевания, гестоза + ожирения (рис. 5). Были так же выделены специфичные факторы риска. Наибольшее число связей отмечено для генов *TNFA*, *TGFB1*, *INS*. Эти гены, как было установлено, участвуют во многих процессах с высоким индексом CR, таких как: позитивная регуляция сигналинга протеинкиназы B, регуляция митоза, регуляция деления ядра и другие (Glotov et al., 2015). Ассоциативная сеть генов и белков, общих для анализируемых заболеваний, включала 67 генов и 167 связей (Glotov et al., 2015). Специфичными факторами риска гестоза в данной сети оказались: ген интерлейкина 1В (*IL1B*), ген эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*), ген белка теплового шока 4 (*HSP74*), ген аполипопротеина J (*CLU*), 5,10-метилентетрагидрофолат редуктаза (*MTHFR*). Исходя из анализа ассоциативных сетей, можно считать, что в отличие от СД, ГД, ОЖ, именно эти гены следует рассматривать как дифференцированные факторы риска гестоза. Можно предполагать, что метаболический путь, нарушения которого ведут к гестозу, «стартует» с общих генов - *TGFB1*, *TNFA*, *INS*, *ACE*, нарушает экспрессию генов *IL1B*, *NOS3*, *HSPA4*, *CLU*, *MTHFR* и манифестирует как прогрессирующее осложнение беременности - гестоз (ПЭ). Не исключены и другие сценарии молекулярного патогенеза гестоза (ПЭ): *TGFB1* или *TNFA* - *IL1B* - ПЭ; *TNFA* или *INS* - *NOS3* - ПЭ; *INS* - *HSPA4* или *CLU* - ПЭ; *ACE* - *MTHFR* - ПЭ. Следовательно, в зависимости от аллельных вариантов кандидатных генов и провоцирующих экзогенных факторов начальные стадии патогенеза гестоза могут быть различными, однако, начиная с ранних этапов, процесс становится каналезированным и, в конечном счете, проявляется в виде характерной для гестоза клинической триады: гипертония, нарушения почек и отеки.

Применение генных сетей позволило не только установить общие и специфичные факторы риска гестоза, но и предположить определенные патофизиологические пути развития этого

заболевания. Последнее представляет большое значение для практики, т.к. позволяет предположить (а значит - предотвратить) процессы перехода одной патологии в другую.



Общие факторы риска: Рис. 5. Ассоциативная сеть генов и белков, общая для гестоза (слева внизу), сахарного диабета (слева сверху), ожирения (справа сверху) и диабета беременных (справа внизу) (по Glotov *et al.*, 2015).

Дифференцированные факторы риска:
 Гестоз
 Сахарный диабет
 Ожирение
 Диабет беременных

Секвенирование гена ACVR2A у женщин с гестозом и у женщин с физиологической беременностью. Для комплексного изучения новых маркеров гестоза был применен подход с использованием метода полногеномного секвенирования. В качестве платформ для секвенирования были выбраны приборы «GS Junior» фирмы «Roche» и «Ion Torrent» фирмы «Life Technologies». Фрагменты гена ACVR2A секвенировали с 30-ти кратным покрытием. Суммарно в 65-ти образцах выявлено 246 нуклеотидных вариаций, половина из которых не представлена в базах данных «1000 геномов» и «dbSNP135», а 135 имеют номер «rs». 25 замен представляют собой делеции/инсерции и 221 – однонуклеотидные вариации (SNP).

«Фильтрацию» данных секвенирования образцов ДНК проводили с использованием двух биоинформатических подходов. Первый проведен с применением общедоступных интернет-ресурсов - «Gene-Talk» (<http://www.gene-talk.de>). Ресурс позволяет «отфильтровывать» данные по разным критериям, одним из которых является научная и клиническая значимость выявленного генетического маркера. Задачей данного этапа было выяснить, какие, и в каком количестве у пациенток с гестозом встречаются клинически значимые варианты. После «фильтрации» данных было установлено, что максимальной научной и медицинской значимостью, обладает 31 из 246 обнаруженных вариантов. Наличие этих вариантов было подтверждено в «ручном режиме» с помощью программы «UGENE» (Okonechnikov *et al.*, 2012). Клинически значимые варианты обнаружены у каждой пациентки, при чем, у некоторых из них были выявлены несколько таких замен одновременно. На это указывают достаточно высокая частота альтернативного варианта, которая в ряде случаев достигала 80-100% (например, для rs1424943). Большое число вариантов в гене ACVR2A и их высокая представленность среди больных с гестозом не позволяет рассматривать данные варианты как «исключительные» маркеры этого заболевания (Глотов *и др.*, 2014). Другой биоинформатический подход заключался в анализе функциональной значимости выявленных замен для оценки их возможного влияния на функцию белка. Однако алгоритмы PolyPhen и SIFT (Wang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012), которые были использованы для решения этой задачи, не выявили ни одного маркера, значимо влияющего на активность фермента ACVR2A (Глотов *и др.*, 2014).

Следующий этап работы был направлен на поиск дополнительной доказательной базы относительно группы ранее выявленных «значимых» вариантов в гене ACVR2A. С этой целью был использован метод корреляции по Пирсону, позволяющий оценить влияние комбинаций аллелей по «медицински значимым» вариантам гена ACVR2A на изменения таких диагностически значимых параметров при гестозе как «САД», «ДАД» и «наличие белка в моче». Статистически значимая корреляция была выявлена между rs1364657, rs7601098, rs3820716 гена ACVR2A и белком в моче, а также между rs7601098 и диастолическим артериальным давлением ($p < 0,03$) (Глотов *и др.*, 2014). С помощью точного теста Фишера, была выявлена достоверная ассоциация

между вариантом rs3764955 тяжестью гестоза и образованием отеков ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что эти результаты противоречат данным аналогичного сравнения, выполненного отечественными авторами (Ворожищева *и др.*, 2013), но соответствует таковым в работе норвежских исследователей (Roten *et al.*, 2009).

Далее нами был проведен сравнительный анализ данных секвенирования гена ACVR2A в группе пациентов и в группе контроля, используя разработанный ранее алгоритм, который позволяет применять две аддитивные модели (Glotov *et al.*, 2015). Одна из них, предполагает, что клинический эффект зависит от наличия альтернативной аллели («доминантная модель»), другая – от альтернативного генотипа («рецессивная модель»). В доминантной модели идентифицировано 246 вариантов. Из них были отобраны главные маркеры, согласно следующим критериям: score > 10 и/или $p < 0,01$ и мутация «покрыта» более чем в 90% образцах (см. табл. 8). Семнадцать вариантов, из которых только 6 имели свой rs номер (это варианты rs145399059, rs115418286, rs41468049, rs111430637, rs373204686, rs148618849), характеризовали наличие риска заболевания, а один вариант - протекцию против него (rs17742573).

Таблица 8.

ACVR2A-маркеры гестоза («доминантная модель»).

Стартовая позиция	Исходная последовательность	Нуклеотидная замена	Тип замены	Номер rs	Болезнь /здоровье в %	Score	Score 2	p-value (CC_DOM модель, snpSift)
148642724	T	TAA	indel	.	18/0	70	-350	0,0232
148606243	G	C	SNP	rs145399059	13/0	50	-250	0,0871
148613074	G	T	SNP	rs115418286	8/0	30	-150	0,2080
148609077	T	C	SNP	rs41468049	5/0	20	-100	0,3811
148646876	G	C	SNP	.	5/0	20	-100	0,3892
148652327	T	C	SNP	.	5/0	20	-100	0,3778
148686453	T	C	SNP	rs111430637	5/0	20	-100	0,3811
148643432	A	G	SNP	.	3/0	10	-50	0,6071
148645421	T	C	SNP	.	3/0	10	-50	0,6207
148651206	T	C	SNP	.	3/0	10	-50	0,6393
148652167	C	G	SNP	rs373204686	3/0	10	-50	0,6441
148654065	A	G	SNP	.	3/0	10	-50	0,6316
148655053	A	G	SNP	.	3/0	10	-50	0,6379
148657857	G	A	SNP	rs148618849	3/0	10	-50	0,6379
148659844	G	A	SNP	.	3/0	10	-50	0,6271
148680419	G	A	SNP	.	3/0	10	-50	0,6140
148687457	A	G	SNP	.	3/0	10	-50	0,6393
148643956	A	G	SNP	rs17742573	0/23	-250	50	0,0069

Таблица 9

ACVR2A-маркеры гестоза («рецессивная модель»).

Стартовая позиция	Исходная последовательность	Нуклеотидная замена	Тип замены	Номер rs	Болезнь /здоровье в %	Score	Score 2	p-value (CC_REC модель, snpSift)
148606243	G	C	SNP	rs145399059	3/0	10	-50	0,6271
148606674	A	C	SNP	rs62169479	3/0	10	-50	0,6271
148607210	G	T	SNP	rs62169480	3/0	10	-50	0,6207
148687731	A	C	SNP	*rs17692648	3/0	10	-50	0,6333

* - клинически значимый маркер согласно portalу «Gene-Talk».

Необходимо отметить, что согласно SNPSIFT тесту ($p < 0,05$), наиболее существенными заменами были инсерция insAA в позиции 148642724, связанная с риском болезни, и протективная замена A на G в позиции 148643956 (rs17742573). Можно предполагать, что наличие инсерции insAA хотя бы на одной из хромосом стимулирует развитие гестоза, тогда как наличие варианта G в rs17742573 – наоборот, оказывает протективный эффект. В рецессивной модели (табл. 9) идентифицировано 57 вариантов, из которых только четыре соответствовали выбранным критериям (см. выше). Для замен rs145399059, rs62169479, rs62169480, rs17692648 показана ассоциация с заболеванием. Важно отметить, что вариант rs145399059 выявлен как маркер гестоза в двух моделях, а вариант rs17692648 является клинически значимым маркером гестоза согласно portalу «Gene-Talk». Эти результаты позволяют рассматривать варианты rs145399059 и rs17692648 как возможные маркеры риска развития гестоза.

Сравнительный анализ уровня микроРНК в плаценте у больных гестозом и при нормальной беременности. Для поиска и комплексного изучения маркеров гестоза на уровне транскриптомов использован метод полногеномного секвенирования. Были изучены спектр и уровень микроРНК в ворсинчатом хорионе плаценты у рожениц с нормальной беременностью и с беременностью, осложненной различными формами гестоза. Всего секвенировано 14 библиотек кДНК. В

результате секвенирования получено 2241561, 2527969 и 1502484 «ридов» (просеквенированных фрагментов ДНК), соответствующих контролю, гестозу (в целом) и гестозу, осложненному гипертонией, соответственно, выровненных на геном человека, со средней длиной «рида» от 19 до 24 нуклеотидов. Необходимо отметить, что для всех трех групп образцов были выявлены около 500 известных микроРНК с покрытием не менее 5 ридов.

Дальнейшие эксперименты по сравнению спектров микроРНК, в ворсинчатом хорионе плаценты рожениц с гестозом в целом и с гестозом, осложненным гипертонией, в сравнении с нормой, позволили выявить 13 микроРНК, достоверно отличающихся ($p < 0,01$) экспрессией в образцах плацент от женщин с гестозом по сравнению с контрольной группой (Vashukova *et al.*, 2016). Однако, с учетом поправки на множественные сравнения ($FDR < 0,05$), таких микроРНК выявлено не было (Vashukova *et al.*, 2016).

С другой стороны, гестоз на фоне гипертонической болезни характеризовало изменение уровня 51 микроРНК ($p < 0,01$), из которых 22 соответствовали поправке на множественные сравнения ($FDR < 0,05$). 7-мь из них снижали уровень при гестозе: miR-135b-5p, miR-195-5p, let-7f-5p, miR-34c-5p, miR-1-3p, miR-98-5p, miR-223-3p, а 15-ть – повышали: miR-515-3p, miR-31-5p, miR-210-3p, miR-518a-3p, miR-524-3p, miR-518c-3p, miR-520a-3p, miR-515-5p, miR-516a-5p, miR-519e-5p, miR-193b-3p, miR-4532, miR-518f-3p, miR-518a-5p, miR-518e-3p (Vashukova *et al.*, 2016).

В нашем исследовании не было обнаружено специфических маркеров гестоза в целом, но были обнаружены маркеры гестоза на фоне сопутствующего заболевания – гипертонии, что свидетельствует в пользу предположения о том, что данная патология представляет собой сложный синдромокомплекс, молекулярно-генетические механизмы которого следует рассматривать только с учетом клинических данных.

Необходимо отметить, что некоторые из микроРНК, выявленные нами при гестозе на фоне гипертонии, соответствуют ранее установленным маркерам данного заболевания другими авторами (Zhu *et al.*, 2009; Ishibashi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). К таким микроРНК относятся и 11 микроРНК C19MC кластера. Для восьми из них (miR-515-3p, miR-515-5p, miR-516a-5p, miR-518c-3p, miR-518f-3p, miR-519e-5p, miR-520a-3p, miR-524-3p) ранее была показана повышенная экспрессия в плацентах женщин с гестозом (Ishibashi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014). Но для трех (miR-518a-3p, miR-518a-5p, miR-518e-3p) – такая ассоциация была установлена впервые.

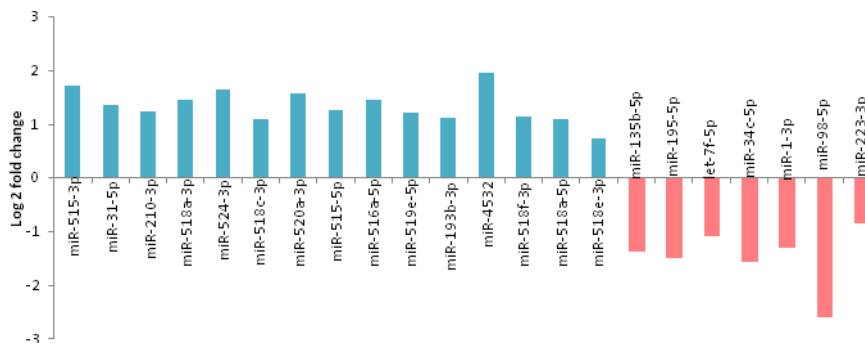


Рис. 6. Сравнение спектров микроРНК в плаценте при гестозе и в норме.

Следует отметить, что некоторые микроРНК ранее были обнаружены не только в плаценте, но и в крови беременных женщин. MiR-515-3p, miR-515-5p, miR-518c-3p и miR-518e-3p находили в плазме беременных женщин, но не детектировали на следующий день после родоразрешения (Miura *et al.*, 2010). Концентрация miR-515-5p, miR-518a-3p, miR-518a-5p, miR-518e-3p, miR-519e-5p и miR-524-3p в сыворотке крови была существенно выше в третьем триместре беременности в сравнении с таковой у небеременных женщин (Gilad *et al.*, 2008). Янг с коллегами (Yang *et al.*, 2011) обнаружил повышенную экспрессию miR-518e в сыворотке крови пациенток с преэклампсией по сравнению с контролем, а Ли с коллегами (Li *et al.*, 2013) выявил подобные изменения для miR-515-3p. Эти находки свидетельствуют о том, что микроРНК могут стать удобными прогностическими биомаркерами развития гестоза.

В дополнении к микроРНК C19MC кластера в плаценте рожениц с гестозом на фоне гипертонии была выявлена дисрегуляция еще восьми микроРНК (miR-210, miR-195, miR-223, miR-1, miR-34c, miR-193b, miR-let-7f, miR-31). MiR-210, ответственная за функцию митохондрий плаценты (Muralimanoharan *et al.*, 2012), является одним из самых значимых маркеров гестоза

(Pineles *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Enquobahrie *et al.*, 2011; Ishibashi *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014; Weedon-Fekjær *et al.*, 2014). Такая связь обнаружена во многих работах. Уровень экспрессии miR-210 существенно повышен в плаценте больных гестозом женщин по сравнению с нормой (Gunel *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014). Было так же установлено, что повышенная экспрессия miR-210 может быть индуцирована гипоксией тканей плаценты, а микроРНК miR-210 является маркером именно этого состояния (Zhu *et al.*, 2009). Важно, что локальная гипоксия и ишемия плаценты являются важным патофизиологическим механизмом, запускающим развитие гестоза (Zhu *et al.*, 2009). Таким образом, выявленные в данной работе закономерности не только подтверждают полученные ранее данные, но и конкретизируют связь повышенной экспрессии miR-210 с развитием гестоза на фоне имеющейся гипертензии.

В настоящем исследовании в плаценте рожениц с гестозом на фоне гипертензии обнаружено снижение экспрессии miR-195, что согласуется с данными ряда авторов (Zhu *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014). Однако, наши результаты противоречат исследованию плацент от рожениц с тяжелым гестозом, где уровень экспрессии данной микроРНК напротив повышен (Hu *et al.*, 2009). Повышенная экспрессия miR-195 провоцирует инвазию трофобласта путем репрессирования секреции белка ACVR2A (Bai *et al.*, 2012). Сниженная экспрессия данной микроРНК приводит к увеличению синтеза белка ACVR2A, следствием чего является нарушение инвазии трофобласта и процесса ремоделирования спиральных артерий, что хорошо согласуется с центральной патофизиологической гипотезой развития гестоза (Bai *et al.*, 2012). Данный факт особенно важен, так как ген ACVR2A является одним из генов-кандидатов преэклампсии.

Согласно базе данных miRDB (<http://mirdb.org>), мРНК гена ACVR2A может быть мишенью для miR-223, уровень экспрессии которой также снижен в плаценте женщин с гестозом. Сниженная экспрессия miR-223 на фоне преэклампсией показана ранее во многих работах (Zhu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Ishibashi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014) в тканях плаценты, но и при анализе крови беременных женщин с патологией (Yang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Более того, низкий уровень экспрессии данной микроРНК более характерен для раннего гестоза (Weedon-Fekjær *et al.*, 2014). Благодаря связи miR-195 и miR-223 с регуляцией экспрессии гена ACVR2A, их исследование представляется одним из приоритетных направлений в поиске наиболее значимых маркеров гестоза.

Исследование роли микроРНК при гестозе находится на начальной стадии. Полученные артефакты и результаты, подтверждающие предыдущие данные, свидетельствует о том, что в изучении микроРНК в настоящее время идет лишь накопление данных и однозначные выводы преждевременны (Fu *et al.*, 2013).

Исследование метилирования промоторных регионов гена *H19* в плаценте при гестозе и в контроле. Имеются данные о том, что метилирование промоторного региона гена *H19* может играть роль в развитии гестоза (Yu *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2011). Нами исследованы два промоторных региона гена *H19* тремя методами: МЧ-ПЦР, МСП и КОБРА. Совместное использование данных методов было продиктовано необходимостью исследовать внутри промотора максимальное число CpG сайтов, относящихся, к так называемым, DMR регионам (дифференциально метилированным регионам).

На рис. 7 представлены электрофореграммы ПЦР-продуктов плаценты от женщин с гестозом, полученные после проведения МЧ-ПЦР первого района гена *H19*. Как видно из рис. 7, ПЦР-продукт, соответствующий гену *H19*, выявлен только после обработки эндонуклеазой рестрикции Hpa II, а не MspI. Это доказывает, что все цитозины данного региона гена *H19* метилированы.

Оценку метилирования района 2 гена *H19* проводили методом МС-ПЦР. ПЦР продукт, соответствующий данному району, выявлялся только при использовании m-праймеров, а не u-праймеров, что свидетельствовало о метилированном состоянии участка 2 гена *H19*. Для оценки статуса метилирования обоих районов гена *H19* использовали комбинированный бисульфитно-рестрикционный анализ. Цитозинные нуклеотиды второго района этого гена метилированы, а первого района представлены аллелями, различающимися по метилированию. Таким образом, полученные результаты подтверждают данные о метилированном состоянии промоторной области гена *H19* в клетках хориона при гестозе. Однако в связи с тем, что метилированы были не только все образцы плацент женщин с гестозом, но и все образцы контрольной группы пациентов, полученные результаты не позволяют утверждать о вовлеченности в гестоз метилирования регионов данного гена.

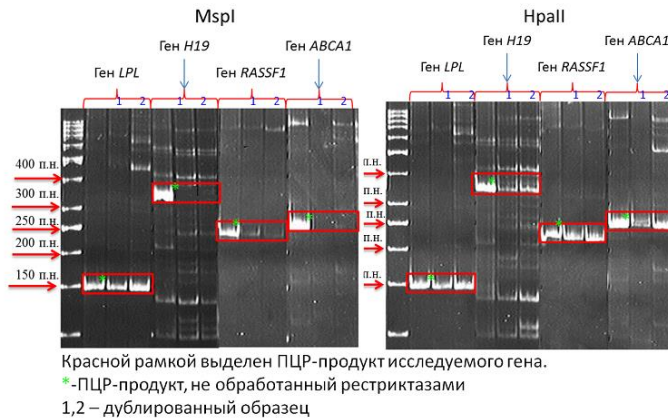


Рис. 7. Электрофореграмма ПЦР-продуктов промоторных регионов генов *H19* (район 1), *RASSF1A* и *LPL* после обработки ДНК рестриктазами *HpaII* и *MspI*

С одной стороны, данный факт можно объяснить тем, что мы, в отличие от зарубежных авторов (Gao *et al.*, 2011), не дифференцировали гестоз на ранний и поздний. Но в нашем эксперименте все образцы были метилированы однотипно, что исключает, возможность подобного предположения. Следует иметь в виду, что в работе Гао с коллегами проводили количественный анализ статуса метилирования всей DMR области гена *H19*, тогда как мы исследовали только отдельные CpG островки этого региона. Кроме того, имеются данные, которые не подтверждают роль метилирования промоторного региона гена *H19* в развитии гестоза (Bourque *et al.*, 2010). Следовательно, вклад метилирования локуса гена *H19* в развитие гестоза не очевиден.

Таким образом, как традиционные «классические» подходы (анализ частот аллелей, их комбинации), так и математические модели оценки риска позволили подтвердить ассоциацию с гестозом ряда известных генов-кандидатов и установить наличие многих других неслучайных ассоциаций. Эти подходы не позволяют с уверенностью предсказать индивидуальный риск развитие гестоза, но дают достаточно оснований для формирования групп повышенного риска по этой частой патологии. Новые маркеры гестоза были выявлены при анализе гена-кандидата гестоза – *ACVR2A*, и изучении пула микроРНК образцов плаценты. Полученные данные подтверждает сложную природу патогенеза гестоза, развивающегося вследствие нарушения взаимодействия продуктов материнского и плодного геномов.

Наследственные маркеры артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением у детей.

Сравнительный анализ частот аллелей и их комбинаций. С помощью биочипов: «Кардио-биочип» (Глотов *и др.*, 2007), и методом ПЦР-ПДРФ изучены полиморфные сайты следующих 11-ти генов: *REN* (-83G>A), *AGT* (M235T), *AGTR1* (1166A>C), *AGTR2* (3123C>A), *BDKRB2* (-58T>C), *ADRB2* (48A>G, 81C>G), *MTHFR* (677C>T), *APOE* (*E2, E3, E4*), *LPL* (Ser447Stop), *NOS3* (-786T>C), *ACE* (I/D). Сравнительный анализ частот комбинаций аллелей и аллелей генов-кандидатов у детей с АГ и детей контрольной группы позволил выявить ассоциацию с АГ одного из генов-кандидатов – гена *AGTR2* ($p < 0,001$). В группе контроля чаще, чем у детей с АГ встречается гетерозиготный генотип - C/A ($p < 0,001$; ОШ=0,39), тогда как генотип A/A превалирует у детей с АГ, то есть является фактором риска АГ ($p = 0,004$; ОШ=1,91). При разделении по полу такая тенденция сохранилась только для мальчиков ($p = 0,008$; ОШ=1,99) (см. табл. 10). При изучении распределения частот комбинаций аллелей для гена *AGTR1* отдельно по полу у мальчиков контрольной группы выявлено преобладание протективного генотипа A/C по сравнению с больными АГ ($p = 0,033$; ОШ=0,55). Различия в частотах вариантных аллелей и их комбинаций между выборкой детей, больных АГ или МС и контрольной выборкой при разделении по полу были отмечены и для других генов. В частности, было показано, что существуют статистически значимые различия в частотах аллелей гена *APOE* между девочками с АГ и школьницами контрольной группы (табл. 11). Аналогичные закономерности были установлены и для полиморфизма -786T>C по гену *NOS3*. У школьниц было обнаружено преобладание генотипа T/C по сравнению с девочками, больными АГ ($p = 0,003$; ОШ=0,12). Различия частот аллелей, но не комбинаций аллелей гена *AGTR2* были найдены при сравнении девочек группы МСО и контроля ($p = 0,06$, $\chi^2 = 5,65$ и $p = 0,05$, $\chi^2 = 3,84$) (см. табл. 12). У данной группы по сравнению с контролем преобладала аллель A (ОШ=0,67; 95%ДИ: 0,45-1,00). У девочек с МСО (табл. 12) обнаружено преобладание аллели C гена *LPL* в отличие от контрольной группы школьниц ($p = 0,048$; ОШ=2,35).

Таблица 10.

Значения коэффициента отношения шансов по частотам аллелей и их комбинаций для генов *AGTR1*, *AGTR2* в группе мальчиков с АГ по сравнению с контрольной группой.

Ген	Аллели / комбинации аллелей	Дети с АГ, N	Школьники, N	Значение p	Значение скорректированного p	ОШ (95% ДИ)
<i>AGTR1</i>	Аллели, число					
	A	201	190	0,072	0,288	1,49 (0,96-2,32)
	C	49	68	0,072	0,288	0,67 (0,43-1,04)
	Комбинации аллелей, число					
	A/A	82	68	-	-	-
	A/C	37	54	*0,033	0,275	0,55 (0,31-0,97)
	C/C	6	7	0,576	1,000	0,71 (0,19-2,61)
<i>AGTR2</i>	Аллели, число					
	C	108	146	*<0,001	*0,002	0,50 (0,34-0,73)
	A	142	98	*<0,001	*0,002	1,99 (1,37-2,90)
	Комбинации аллелей, число					
	C/C	54	73	-	-	-
A/A	71	49	*0,008	0,100	1,99 (1,17-3,42)	

Примечание: - комбинации аллелей сравнения; * - статистически значимые значения.

Таблица 11.

Значения коэффициента отношения шансов по частотам аллелей и их комбинаций для генов *APOE*, *NOS3* в группе девочек с АГ по сравнению с контрольной группой.

Ген	Аллели / комбинации аллелей	Дети с АГ, N	Школьники, N	Значение p	Значение скорректированного p	ОШ (95% ДИ)
<i>APOE</i>	Аллели, число					
	E2	2	11	0,228	0,532	0,33 (0,03-1,55)
	E3	73	140	-	-	-
	E4	5	25	*0,039	0,188	0,36 (0,10-1,01)
	Комбинации аллелей, число					
	E2/E2	0	0	отсутствует	отсутствует	отсутствует
	E2/E3	2	10	0,200	0,651	0,31 (0,03-1,60)
	E2/E4	0	1	1,000	1,000	0 (0-61,40)
	E3/E3	33	51	-	-	-
	E3/E4	5	18	0,145	0,628	0,43 (0,11-1,36)
E4/E4	0	3	0,285	0,759	0,00 (0,00-3,95)	
<i>NOS3</i>	Аллели, число					
	T	86	142	0,570	0,900	0,85 (0,47-1,55)
	C	6	20	0,570	0,900	1,18 (0,65-2,13)
	Комбинации аллелей, число					
	T/T	41	64	-	-	-
	T/C	4	14	*0,003	*0,043	0,12 (0,01-0,58)
C/C	3	6	1,000	1,000	0,97 (0,14-5,22)	

Примечание: - комбинации аллелей сравнения; * - статистически значимые значения.

Таблица 12.

Значения коэффициента отношения шансов по частотам аллелей и их комбинаций для генов *AGTR2*, *LPL* у девочек группы МСО и в контрольной группе.

Ген	Аллели / комбинации аллелей	Дети с МС, N	Школьники, N	Значение p	Значение скорректированного p	ОШ (95% ДИ)
<i>AGTR2</i>	Аллели, число					
	C	69	181	*0,041	0,165	0,67 (0,45-1,00)
	A	85	145	*0,041	0,165	1,49 (1,37-2,90)
	Комбинации аллелей, число					
	C/C	17	48	-	-	-
	C/A	35	85	0,866	1,000	1,10 (0,54-2,29)
A/A	25	30	0,056	0,311	2,21 (0,97-5,10)	
<i>LPL</i>	Аллели, число					

<i>C</i>	134	142	*0,048	0,165	2,35 (0,95-6,39)
<i>G</i>	8	20	*0,048	0,165	0,43 (0,16-1,05)
Комбинации аллелей, число					
<i>C/C</i>	63	64	-	-	-
<i>C/G</i>	8	14	0,355	0,872	0,58 (0,20-1,61)
<i>G/G</i>	0	3	0,245	0,741	0 (0-2,55)

Примечание: - комбинации аллелей сравнения; *- статистически значимые значения.

Таким образом, аллели генов *APOE*, *NOS3* ассоциированы с риском развития АГ у девочек, а аллели генов *AGTR1* и *AGTR2* - с риском развития АГ у мальчиков, в то время как варианты генов *AGTR2* и *LPL* - с риском развития МС у девочек.

Анализ ассоциации показателей ИМТ, САД, ДАД и вариантов генов у детей с артериальной гипертензией. При разделении групп, больных артериальной гипертензией, по полу, корреляционная связь была установлена у мальчиков: между показателем «САД» и комбинациями аллелей по гену *REN* ($\rho=0,26$; 95%ДИ: 0,034-0,467; $p=0,03$), между показателем «ДАД» и комбинациями аллелей по гену *NOS3* ($\rho=-0,27$; 95%ДИ: -0,474 - -0,043; $p=0,02$), у девочек: между показателем «САД» и комбинациями аллелей по гену *AGT* ($\rho=-0,45$; 95%ДИ: -0,699 - -0,098; $p=0,01$), по гену *AGTR1* ($\rho=0,39$; 95%ДИ: 0,024-0,660; $p=0,04$) и по гену *BKR1* ($\rho=-0,45$; 95%ДИ: -0,704 - -0,106; $p=0,01$), между показателем «ИМТ» и комбинациями аллелей по гену *NOS3* ($\rho=0,50$; 95%ДИ: 0,157-0,729; $p=0,01$).

Математические модели риска гестоза артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением. Статистически значимых отличий «суммы баллов комбинаций аллелей» и «суммы неблагоприятных баллов» по генам ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем между пациентами с АГ и контрольной группой, а также между пациентами с МСО и контрольной группой, выявлено не было.

Анализ межгенных взаимодействий при формировании предрасположенности к АГ проведен для генов *APOE*, *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, *NOS3*, *LPL*, *ACE*. Лучшей моделью риска АГ оказалась комбинация генов *AGTR2* (*C/A*) \times *NOS3* (*T/C*) с высокой степенью воспроизводимости $CVC=9/10$ с тестируемой сбалансированной точностью 0,81, специфичностью 0,94, чувствительностью 0,68 и $\chi^2=170,18$ ($p<0,0001$). Анализ данной модели позволил установить три сочетания повышенного риска и две комбинации пониженного риска развития АГ. Лучшей моделью риска АГ у мальчиков была комбинация локусов *APOE* (*E2/E3/E4*) \times *NOS3* (*T/C*). Лучшей моделью риска АГ у девочек была комбинация локусов *AGT* (*M/T*) \times *NOS3* (*T/C*). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важной роли аллелей гена *NOS3* в риске развития гипертонии у детей независимо от пола. Также необходимо отметить, что развитию АГ независимо от пола способствует наличие аллели *A* гена *AGTR2*.

В модель по изучению предрасположенности к МСО были включены гены *APOE*, *REN*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, *NOS3*, *LPL*, *ACE*. Взаимодействия между ними анализировали как в группе в целом, так в отдельности у мальчиков и девочек. Модель из трех локусов - *APOE* (*E2/E3/E4*) \times *BR1* (*BDKRB2*) (*T/C*) \times *LPL* (*C/G*) имела высокую воспроизводимости ($CVC=9/10$) при тестируемой сбалансированной точности 0,82, чувствительности 0,98, и специфичности 0,66, $\chi^2=195,06$ ($p<0,0001$). К сочетаниям пониженного риска развития МСО отнесены три варианта ($p>0,06$), и два варианта отнесено к комбинациям повышенного риска этого заболевания. Оптимальной моделью риска МСО у мальчиков была комбинация локусов *APOE* (*E2/E3/E4*) \times *AGT* (*M/T*). Анализ данной модели обнаружил четыре сочетания повышенного и ни одну- комбинации пониженного риска развития МСО у мальчиков. Лучшей моделью риска МСО у девочек была комбинация локусов *APOE* (*E2/E3/E4*) \times *BR1* (*BDKRB2*) (*T/C*). Анализ данной модели установил одно сочетание повышенного риска и четыре - пониженного риска развития МС. Таким образом, анализ межгенных взаимодействий генов-кандидатов МСО показал, что наряду с генами *APOE*, *BDKRB2* и *LPL*, важный вклад в развитие данной патологии у детей может вносить ген *AGT*.

При построении GLM модели для оценки риска артериальной гипертензии в расчет были включены гены *REN*, *AGT*, *ACE*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *MTHFR*, а также клинические данные: возраст (*B*), наличие повышенного АД у матери (АД М), наличие повышенного АД у отца (АД О), наличие хронических заболеваний при беременности у матери (ХЗ Б), наличие АГ в период беременности у матери (АГ Б), вес, рост, ИМТ и пол. В формулу первой модели общего риска АГ вошли только гены $\sim REN + AGTR2$, её сбалансированная точность составила всего 58,5%. Формула вторая включала $\sim B + АД О + ХЗ Б$. Ее сбалансированная точность составила 70,7%.

Третья (~ В + ИМТ + АД О + ХЗ Б + ПОЛ), четвертая (~ В + АД М + *AGTRI*) и пятая (В + ВЕС + *AGTRI*) модели позволяли достичь высокой сбалансированной точности в 70,9%, 80,3% и 82,9%, соответственно. Таким образом, наиболее высокие показатели сбалансированной точности получены для третьей, пятой и шестой модели, т.е. моделей, в которых, помимо клинических и генетических параметров, обязательно присутствуют показатели преморбидного фона. Подобные модели были построены для оценки риска АД для мальчиков и девочек в отдельности. Установлено, что для оценки риска АГ у мальчиков целесообразно использовать формулу ~ В + ВЕС + РОСТ + АД М + *AGTRI* + *MTHFR* + *ACE*, а для формирования группы риска – формулу ~ *AGTRI* + *AGTR2* + *MTHFR*, а для девочек – общие модели с высокой сбалансированной точностью.

Аналогичные расчеты сбалансированной точности с помощью GLM модели были проведены и для оценки риска МСО. Как и при других GLM моделях максимальная сбалансированная точность (более 90%), позволяющая надежно предсказывать заболевание была получена для тех GLM моделей, в которых, помимо клинических и генетических параметров, обязательно включали показатели преморбидного фона.

Анализ классификаций наиболее значимых моделей был произведен с применением ROC-кривых (табл. 13). Пригодность метода классификации оценивали по площади, ограниченной ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций (см. табл. 13).

Таблица 13.

Значение показателя AUC для регрессионных моделей АГ и МСО.

Показатели, включенные в модель	АГ:	МСО:
Гены	0,586	0,561
Клинические (анамнестические) данные	0,810	0,587
Клинические данные (включая преморбидный фон)	0,918	0,971
Генетические и анамнестические данные	0,766	0,565
Генетические и клинические данные с преморбидным фоном	0,889	0,969

Исходя из экспертной шкалы для значений AUC, модели, основанные только на «генетике», обладали не высоким качеством теста. Показатели AUC для моделей, включающих как генетические, так и клинические показатели, были разными и составили 0,766 и 0,565 для АГ и МСО, соответственно. При добавлении к клиническим данным данные преморбидного фона (первых симптомов заболевания) качество предсказания риска для АГ и МСО резко возрастало ($AUC > 0,918$). Таким образом, до начала заболевания и при наличии некоторой клинической информации о пациенте можно предсказывать риск развития АГ у детей. Тогда как, риск МСО у детей можно предсказывать только при наличии информации о преморбидном фоне, когда заболевание уже прогрессирует.

Реконструкция первичной генной сети артериальной гипертензии и метаболического синдрома и ожирения. Реконструкцию генной сети АГ и анализ её ассоциации с генными сетями ожирения («obesity»), метаболического синдрома (инсулинорезистентности) («syndrome x» и «insulin resistance»), проводили с помощью программы ANDVisio. Ассоциативная сеть включала 154 гена (см. рис. 8), и каждое заболевание было ассоциировано с разным числом генов. Максимальное число генов было связано с гипертензией и ожирением, несколько меньше – с инсулинорезистентностью, и единичные гены ассоциированы с метаболическим синдромом. В большинстве случаев выбранные гены были связаны только с одним заболеванием, и только некоторые из них были ассоциированы с несколькими патологиями одновременно. Метаболический синдром (МС) оказался наиболее изолированным заболеванием, т.е. имел только один общий ген (*SREBF1*), связанный с ожирением. Гипертензия, ожирение и инсулинорезистентность имели несколько общих генов. В зависимости от особенностей взаимодействия эти гены были подразделены на четыре группы.

На основании проведенного анализа сложно выделить специфичные факторы риска изученных патологий, однако можно предполагать, что есть общие механизмы развития данных заболеваний, и их вероятными участниками являются гены *ADRB3*, *ADIPOQ*, *ADRB2*, *LPL*, *GHI*, *TNFA*, *POMC*.

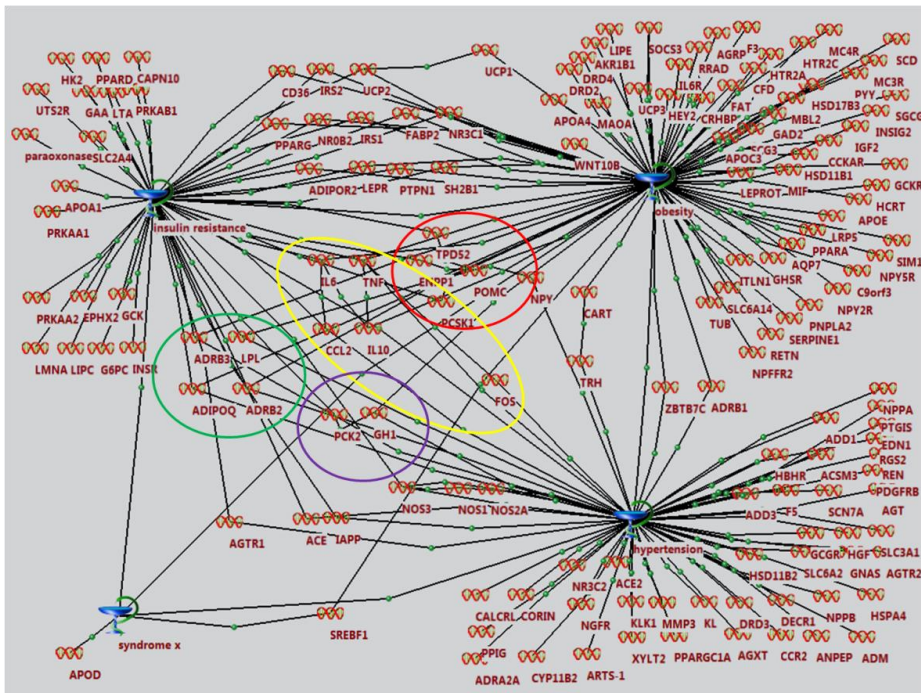


Рис. 8. Генетическая ассоциативная сеть артериальной гипертензии с ожирением и метаболическим синдромом (инсулинрезистентностью). Овалами выделены общие группы гены, ассоциированные с несколькими патологиями (желтым – группа «цитокинов», красным – группа «проопиомеланокортина», фиолетовым – группа «гормона роста», зеленым – независимые гены).

С помощью классических подходов было установлено, что определенные аллели генов *AGTR1* (1166A>C) и *AGTR2* (3123C>A) ассоциированы с риском развития АГ. Математические модели построенные на основе метода MDR и метода GLM для АГ, включали гены-кандидаты: *AGTR1*, *AGTR2*, *MTHFR*, *NOS3*, *AGT*, *REN*, *ACE*, а для МСО - гены *LPL*, *APOE*, *BR1* (*BDKRB2*), *AGT*. Необходимо отметить, что использование как «классического» расчета риска, так и оценку риска заболевания на основании математического моделирования следует проводить исключительно для формирования групп риска, но не его индивидуального прогноза заболевания. Для точного прогноза риска АГ не могут быть использованы и GWAS-маркеры. Важно подчеркнуть, что помимо известных генов-кандидатов АГ и МС, теоретические исследования генных сетей показывают, что реальными генами – кандидатами этих заболеваний могут быть гены - *FOS*, *NPY* (артериальная гипертензия) и *IL10*, *IL6*, *TPD52*, *ENPP1*, *PCSK1* (метаболический синдром и ожирение).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов настоящего исследования позволил изучить эффект полиморфизма одних и тех же генов на патогенез разных МФЗ, оценить целесообразность использования в диагностике МФЗ GWAS-маркеров, провести поиск дифференциальных маркеров риска этих болезней, а также оценить перспективы применения системно-генетического подхода в изучении Г, АГ и МСО.

Для решения этих задач был разработан «Фибр-биочип» и апробирован «Кардиочип», позволяющие эффективно выявлять замены в генах «артериального давления» и в генах «системы свертывания крови и фибринолиза». Они достаточно просты в использовании и благодаря своей универсальности уже получили широкое применение в практике (Глотов и др., 2005, 2007, 2008). Сегодня можно констатировать, что в методах диагностики мутаций достигнут определенный консенсус – технология биочипов больше подходит для реализации скрининговых программ, а активно развивающееся NGS секвенирование – для проведения научных и специальных диагностических исследований.

Используются несколько подходов для оценки риска МФЗ. С одной - классический подход, основанный на идентификации новых генов и аллелей риска заболеваний. Он включает: а) поиск и сравнительный анализ частот аллелей и комбинации аллелей генов-кандидатов, б) корреляционный анализ между вариантами кандидатных генов и «основными» клиническими проявлениями заболевания, в) математическое моделирование риска. С другой стороны - подход, основанный на принципах системной генетики. Он включает построение генных сетей, нацеленных на выявление ключевых (триггерных) маркеров патологии и новых метаболических путей каждого заболевания, а также комплексное изучение новых маркеров заболевания на геномном (полногеномное секвенирование), транскриптомном (исследование уровня микроРНК) и

эпигеномном уровнях (исследование метилирования промоторных регионов) реализации генетической информации.

Итогом работы можно считать новый дополненный список генов Г, АГ и МСО, который позволяет сделать некоторые обобщения. Во-первых, с помощью генных сетей удалось подтвердить наличие общих молекулярно-генетических механизмов у Г, АГ и МСО, то есть их синтропность. В пользу генетической близости этих заболеваний свидетельствует наличие у них «общих» генов, часть из которых представлена генами «артериального давления»: *ACE*, *ADRB2*, *LPL*, *REN*. Во-вторых, нам не удалось подтвердить вклад GWAS-маркеров в патогенез МФЗ на нашей выборке, что свидетельствует о важности наличия собственной выборки пациентов по каждой нозологии и необходимости более «осторожной трансляции» результатов зарубежных исследований на российские популяции. В-третьих, показано, что генетическое тестирование генов-кандидатов на современном этапе развития предиктивной медицины не позволяет делать долгосрочных индивидуальных прогнозов здоровья, но позволяет сформировать группу риска по тому или иному МФЗ. Для этого можно использовать как традиционные оценки - коэффициент отношения шансов (OR), так и расчет риска на основании MDR и GLM моделей. При отсутствии анамнестических и клинических данных, целесообразно использовать метод MDR, тогда как при наличии таковых – лучше применять GLM моделирование. В-четвертых, необходимо отметить, что таргетное NGS секвенирование нуклеотидной последовательности гена-кандидата (*ACVR2A* - для гестоза) позволяет выявить новые маркеры заболевания, перспективные для развития персонализированной медицины. В-пятых, секвенирование и анализ спектра микроРНК является перспективным подходом для понимания механизмов эпигенетической регуляции функции генов. Анализ спектра 14-ти микроРНК может быть использован для оценки риска одного из подтипов гестоза (на фоне АГ). В-шестых, нужно отметить определенный скепсис относительно эпигеномных исследований метилирования как перспективного направления предиктивной медицины. Поскольку в настоящей работе данный подход не дал никаких результатов. В-седьмых, в ходе выполнения работы были выявлены не только маркеры риска патологии, но и протективные маркеры заболевания, тестирование которых не менее важно и до настоящего времени мало учитывается.

Таким образом, влияние генетических факторов на экспрессию и пенетрантность фенотипических признаков (на примере Г, АГ и МСО) в значительной мере обусловлено наличием «качественного» генетического полиморфизма, связанного с однонуклеотидными заменами. Модели для прогноза риска МФЗ могут быть созданы только на основании исследования полиморфизма ДНК и тестирования экспрессии. Как следует из проведенной работы, перспективы дальнейших исследований наследственной предрасположенности к МФЗ связаны с комплексным анализом стандартизированных образцов биобанков, включающим проведение NGS секвенирования генов (генома), изучение данных экспрессионных и эпигенетических профилей с учетом состояния их метаболических путей. Наш многолетний опыт показывает, что только с позиции системной генетики удастся создать компьютерные модели, которые позволят не только оценить уникальные особенности тканей и органов конкретного человека, но и откроют новые возможности для более точного прогноза индивидуального риска МФЗ, для оптимизации досимптоматической диагностики и эффективного персонализированного лечения.

ВЫВОДЫ

1. Показана эффективность применения оригинальных гелевых биочипов для анализа аллельного полиморфизма генов-кандидатов, ассоциированных с наследственной предрасположенностью к таким частым мультифакторным заболеваниям как гестоз, артериальная гипертензия и метаболический синдром с ожирением.
2. Определенные аллели генов ренин-ангиотензиновой системы, свертывания крови и метаболизма липидов, ассоциированные с риском гестоза у женщин, артериальной гипертензии и метаболического синдрома с ожирением у детей. Эти аллели и их комбинации являются факторами риска развития исследуемых мультифакторных заболеваний, и могут выступать в качестве протективных маркеров, снижающих вероятность развития этих патологий.
3. Комбинации аллелей генов ренин-ангиотензиновой системы и метаболизма липидов коррелируют с клиническими показателями у детей, больных артериальной гипертензией.
4. При отсутствии анамнестических и клинических данных моделирование риска мультифакторных заболеваний предпочтительно проводить методом множественного снижения размерности (MDR), а при их наличии - с помощью линейных моделей (GLM).

5. Тестирование аллелей генов ренин-ангиотензиновой системы, свертывания крови и метаболизма липидов, дополненное расчетами коэффициента соотношения шансов и оценкой риска на основании MDR и GLM моделей, позволяет сформировать группы риска по этим мультифакторным заболеваниям.
6. Генетические маркеры гипертонии, выявленные на основании полногеномного анализа ассоциаций, не являются факторами риска развития данного заболевания у детей Северо-Западного региона РФ.
7. Ассоциативные сети позволяют выявлять не только общие, но и специфичные факторы риска сочетанных патологий (МФЗ).
8. Целевое NGS секвенирование позволяет идентифицировать новые маркеры заболевания. Значимыми молекулярными маркерами риска гестоза являются аллели rs145399059C, rs17692648C, инсерция insAA в позиции 148642724 гена ACVR2A. Протективным маркером гестоза является аллель rs17742573G гена ACVR2A.
9. Маркером гестоза на фоне гипертонической болезни является изменение уровня микроРНК плаценты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности скрининга генетически обусловленных нарушений работы систем свертывания крови и регулирования артериального давления целесообразно использовать «Фибр-биочип» и «Кардиочип».
2. Для формирования группы риска гестоза необходимо проводить исследование следующих молекулярно-генетических маркеров: rs11091046 гена *AGTR2*, rs1801133 гена *MTHFR*, rs1799768 гена *SERPINE1*, rs1799963 гена *F2*, rs7412 гена *APOE*, rs145399059, rs17692648, инсерция insAA в позиции 148642724 гена *ACVR2A*.
3. Для формирования группы риска артериальной гипертензии у девочек необходимо проводить исследование следующих молекулярно-генетических маркеров: rs7412 гена *APOE*, rs1799983 гена *NOS3*, rs699 гена *AGT*; артериальной гипертензии у мальчиков - rs11091046 гена *AGTR2*, rs5186 гена *AGTR1*, rs7412 гена *APOE*, rs1799983 гена *NOS3*, rs1801133 гена *MTHFR*.
4. Для формирования группы риска метаболического синдрома и ожирения у девочек необходимо проводить исследование следующих молекулярно-генетических маркеров: rs11091046 гена *AGTR2*, rs328 гена *LPL*, rs7412 гена *APOE* и rs1799722 гена *BRI (BDKRB2)*, у мальчиков - rs7412 гена *APOE*, rs699 гена *AGT*.
5. При наличии только генетических данных формирование группы риска МФЗ целесообразно проводить на основании расчета коэффициента соотношения шансов (OR) и MDR моделей. При наличии анамнестических, клинических и генетических данных расчет риска гестоза у женщин и артериальной гипертензии у мальчиков целесообразно осуществлять, используя GLM моделирование.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патенты РФ:

1. **Глотов А.С.**, Вашукова Е.С., Бикмуллина Д.Р., Зайнуллина М.С., Баранов В.С., Айламазян Э.К. Способ прогнозирования риска развития гестоза на основе генетических маркеров. Патентная заявка №2010127026, 29.06.2010 Патент №2431842 20.10.2011
2. Махрова И.А., Глотов О.С., **Глотов А.С.** Способ оценки риска развития метаболического синдрома у детей на основе генетических и биохимических маркеров. Патентная заявка №2012108059/15(012159) от 27.02.2012. Патент №2492485 от 10.09.2013.
3. **Глотов А.С.**, Глотов О.С., Вашукова Е. С., Асеев М. В., Иващенко Т. Э., Диткина Е. Ю., Тарковская И.В., Пугачева И.В. Способ прогнозирования роста человека на основании исследования ДНК в рамках русской популяции. Патентная заявка №2012145757, 23.10.2012. Патент № 2531341 от 22.08.2014.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

4. Образцова Г.И., **Глотов А.С.**, Степанова Т.В., Иващенко Т.Э., Ковалев Ю.Р. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы и рецептора брадикинина у детей и подростков с первичной артериальной гипертензией // Артериальная гипертензия. - 2006. - Т. 12, №2. - С. 156-160.
5. Глотов А.С., Иващенко Т.Э., Образцова Г.И., Наседкина Т.В., Баранов В.С. Зависимость между возникновением стабильной артериальной гипертензии у детей и полиморфизмом генов

- ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем // Молекулярная биология. - 2007. - Т. 41, №1. - С. 18-25.
6. Глотов А.С. Биочипы как новый метод ДНК-диагностики в акушерстве и гинекологии // Медицинская генетика. - 2007. - Т. 6, №4 (58). - С. 30-35.
 7. Образцова Г.И., Глотов А.С., Степанова Т.В., Иващенко Т.Э., Ковалев Ю.Р. Клинико-генеалогические и молекулярно-генетические аспекты артериальной гипертензии у детей и подростков // Вестник Санкт-Петербургского университета. - 2008. - Серия 11, В. 1. - С. 127-133.
 8. Глотов А.С., Иващенко Т.Э., Наседкина Т.В., Баранов В.С. ДНК-микрочипы для диагностики наследственных и мультифакториальных заболеваний у детей // Российский педиатрический журнал. - 2008. - В. 2. - С. 43-46.
 9. Вашукова Е.С., Глотов А.С., Бикмуллина Д.Р., Зайнулина М.С., Баранов В.С. Наследственная тромбофилия и риск развития гестоза у беременных женщин России // Медицинская генетика. - 2010. - Т. 9, №11. - С. 39-45.
 10. Вашукова Е.С., Глотов А.С., Канаева М.Д., Полушкина Л.Б., Шабанова Н.А., Татарский П.Ф., Носенко Е. Н., Мертил Б., Жабченко И. А., Похитун М. В., Лившиц Л.А., Зайнулина М.С., Баранов В.С. Исследование полиморфизма генов системы свертывания крови и фибринолиза у условно здоровых беременных России и Украины // Экологическая генетика. - 2011. - Т. 9, №1. - С. 70-80.
 11. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Канаева М.Д., Двоглазова М.О., Данилова М.М., Пакин В.С., Марочкина Е.Ю., Бикмуллина Д.Р., Глебова М.А., Махрова И.А., Образцова Г.И., Глотов О.С., Зайнулина М.С., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Исследование ассоциации полиморфизма генов APOE, LPL И NOS3 с риском сосудистой патологии у детей и беременных женщин // Экологическая генетика. - 2011. - Т. 9, №. 4. - С. 25-34.
 12. Диткина Е.Ю., Вашукова Е.С., Глотов А.С., Иващенко Т.Э. Методы диагностики полиморфизма генов метаболизма липидов человека // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). - 2012. - №41 (15). - С. 68-74.
 13. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Канаева М.Д., Курилов Р.В., Бикмуллина Д.Р., Зайнулина М.С., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы и риск развития сосудистой патологии у беременных женщин с гестозом // Журнал акушерства и женских болезней. - 2012. - Т. 63, В. 3. - 61-68.
 14. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Глотов О.С., Тарковская И.В., Пугачева И.В., Белоног О.Л., Махрова И.А., Пакин В.С., Асеев М.В., Иващенко Т.Э. Исследование молекулярно-генетических маркеров роста человека // Экологическая генетика. - 2012. - Т. 10, №. 4. - С. 77-84. Glotov A.S., Vashukova E.S., Glotov O.S., Tarkovskaya I.V., Kirilova R.V., Ditkina E. Y., Pugacheva I.V., Belonog O.L., Makhrova I.A., Pakin V.S., Aseev M.V. and Ivashenko T.E. Identification and Analysis of Genetic Markers of Human Height // Russian Journal of Genetics: Applied Research. - 2014. - V. 4, №2. - P. 98–104.
 15. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Глотов О.С., Насыхова Ю.А., Мазур А.М., Курилов Р.В., Пехов В.М., Храмеева Е.Е., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Исследование популяционных частот полиморфизма генов, ассоциированных с гестозом // Экологическая генетика. - 2013. - Т. 11, №. 1. - С. 91-100. Glotov A.S., Vashukova E.S., Glotov O.S., Nasykhova Yu.A., Mazur A.M., Kurilov R.V., Pekhov V.M., Khrameyeva Ye.E., Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Study of the population frequencies of gene polymorphisms, associated with preeclampsia // Russian Journal of Genetics: Applied Research. - 2014. - V. 4, №5. - P. 388–396.
 16. Канаева М.Д., Глотов А.С., Вашукова Е.С., Образцова Г.И., Баранов В.С. Исследование генетической предрасположенности к развитию гипертензии у детей Северо-Западного региона России // Экологическая генетика. - 2013. - Т. 11, №. 2. - С. 34-40. Kanaeva M.D., Glotov A.S., Vashukova E.S., Obratsova G.E., and B. S. Baranov Study of Genetic Susceptibility to the Development of Arterial Hypertension in Children in Northwestern Russia // Russian Journal of Genetics: Applied Research. - 2014. - V. 4, №5. - P. 382–387.
 17. Глотов О.С., Глотов А.С., Пакин В.С., Баранов В.С. Мониторинг здоровья человека — возможности современной генетики // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. - 2013. - Т. 2. - С. 95-107.
 18. Образцова Г.И., Юрьев В.В., Глотов А.С., Иващенко Т.Э. Генетические аспекты формирования артериальной гипертензии у детей // Молекулярная медицина. - 2013. - № 3. - С. 32-35.

19. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Зайнулина М.С., Баранов В.С. Подходы к диагностике и профилактике осложнений у беременных с наследственными формами тромбофилии // Лабораторная служба. - 2014. - № 1. - С. 23-28.
20. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Данилова М.М., Пакин В.С., Машарский А.Э., Федотов П.В., Зайнулина М.С., Аржанова О.Н., Мозговая Е.В., Баранов В.С. Секвенирование нового поколения (NGS) для изучения гена ACVR2A у беременных с гестозом // Молекулярная медицина. - 2014. - №5. - С. 33-40.

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus и WoS:

21. Glotov A.S., Tiys E.S., Vashukova E.S., Pakin V.S., Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Arzhanova O.N., Mozgovaya E.V., Zainulina M.S., Kolchanov N.A., Baranov V.S., Ivanisenko V.A. Associative networks of potential molecular and genetic contributors in combined preeclampsia (preeclampsia associome) // BMC. Systems. biology. - 2015. - V.9, S. 4. - P. 2-12.
22. Glotov A.S., Kazakov S.V., Zhukova E.A., Alexandrov A.V., Glotov O.S., Pakin V.S., Danilova M.M., Tarkovskaya I.V., Niyazova S.V., Chakova N.N., Komissarova S.M., Kurnikova E.A., Sarana A.M., Sherbak S.G., Sergushichev A.A., Shalyto A.A., Baranov V.S. Targeted next-generation sequencing (NGS) of nine candidate genes with custom AmpliSeq in patients and a cardiomyopathy risk group // Clinica. Chimica. Acta. - 2015. - V. 15; 446. - P. 132-140.
23. Vashukova E.S., Glotov A.S., Fedotov P.V., Efimova O.A., Pakin V.S., Mozgovaya E.V., Pendina A.A., Tikhonov A.V., Koltsova A.S., Baranov V.S. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by superimposed pre-eclampsia on chronic hypertension // Molecular. Medicine. Reports. - 2016. - V. 14. P. 22-32.
24. Glotov A.S., Sinitsyna E.S., Danilova M.M., Vashukova E.S., Walter J.G., Stahl F., Baranov V.S., Vlach E.G., Tennikova T.B. Detection of human genome mutations associated with pregnancy complications using 3-D microarray based on macroporous polymer monoliths // Talanta. - 2016. - V. 15;147. - P. 537-546.

Статьи в прочих изданиях:

25. Глотов А.С., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Опыт использования биочипов в молекулярно-генетической диагностике // Клинико-лабораторный КОНСИЛИУМ. - 2007. - № 15. - С. 46-51.
26. Глотов А.С., Иващенко Т.Э., Образцова Г. И., Баранов В.С. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к артериальной гипертензии // Клинико-лабораторный КОНСИЛИУМ. - 2008. - № 23. - С. 46-51.
27. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Полушкина Л.Б., Потулова С.В., Глотов О.С., Иващенко Т.Э., Гра О.А., Наседкина Т.В., Аверьянова Н.С., Березнева Н.А., Пинелис В.Г., Баранов В.С. Диагностика наследственно обусловленных заболеваний у детей с помощью ДНК-микрочиповой технологии // Вопросы диагностики в педиатрии. - 2009. - Т. 1, №. 1. - С. 14-17.
28. Глотов А.С. Современные подходы к идентификации наследственного риска сердечно-сосудистых заболеваний // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Сб. статей. Новосибирск. Альта Виста - 2012. - В. 13. - С. 17-35.

Тезисы:

29. Глотов А.С., Иващенко Т.Э., Образцова Г.И., Наседкина Т.В., Баранов В.С. Комплексный подход для оценки влияния полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой и кинин-брадикининовой систем на развитие и формирование стабильной артериальной гипертензии у детей // Международная конференция "Генетика в России и мире", посвященная 40-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова. 28 июня – 2 июля 2006 г. Москва. Стр. 46.
30. Glotov A.S., Obratsova G., Ivaschenko T.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V. Baranov V.S. Complex approach for the estimation of renin-angiotensin-bradykinin system genes polymorphism contribution in arterial hypertension in children // European Journal of Human genetics - European Congress of Human Genetics Conference 2006, May 6 - 9, 2006, Amsterdam, The Netherlands. P. 303.
31. Glotov A.S., Obratsova G., Ivaschenko T.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V. Baranov V.S. Complex approach for the estimation of genes polymorphism influence on arterial hypertension // 3-rd International Conference "Genomix, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine", July 12-16, 2006, Novosibirsk, Russia. P. 32.
32. Глотов А.С., Образцова Г.И., Иващенко Т.Э., Наседкина Т.В., Баранов В.С. Новый подход при анализе полиморфизма генов, регулирующих артериальное давление у детей // XI Конгресс педиатров России "Актуальные проблемы педиатрии". 5-8 февраля 2007 г. Москва. Стр. 165.
33. Глотов А.С. Разработка скрининговых молекулярно-генетических методов на основе биочипов для изучения и диагностики нарушений системы фибринолиза у беременных // Сборник

- тезисов докладов участников Двенадцатой Санкт-Петербургской ассамблеи молодых ученых и специалистов. Санкт-Петербург. 2007. Стр. 92.
34. Вашукова Е.С., Глотов А.С. Разработка биочипа для анализа генетической предрасположенности к тромбофилии // *Донозология* - 2007. 29-30 ноября 2007г. Санкт-Петербург. Стр. 41-42.
 35. Глотов О. С., Глотов А.С., Вахарловский В.Г., Москаленко М.В., Демин Г.С., Швед Н.Ю., Шапашников А.М., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Изучение полиморфизма генов сердечно-сосудистой системы и системы детоксикации в трех возрастных группах Санкт-Петербурга // *Донозология* -2007. 29-30 ноября 2007г. Санкт-Петербург. Стр. 43-44.
 36. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Полушкина Л.Б., Иващенко Т.Э., Зайнулина М.С., Айламазян Э.К., Баранов В.С. Тромбочип – новый метод диагностики наследственных тромбофилий // *Фундаментальная наука и клиническая медицина*. 15-16 ноября 2007г. Санкт-Петербург. Стр. 34-35
 37. Glotov A.S., Favorova O.O., Favorov A.V., Obratsova G.I., Ivaschenko T.E., Nasedkina T.V., Baranov V.S. New approaches for the estimation of renin-angiotensin-bradykinin system genes polymorphism // *European Journal of Human genetics - European Congress of Human Genetics Conference 2007, 16-19 June, 2007, Nice, France*. P. 274.
 38. Vashukova E.S., Glotov A.S., Nasedkina T.V., Ivaschenko T.E., Zainulina M.S., Baranov V.S. Universal array-based multiplexed test for polymorphism detection of genes associated with inherited thrombophilia // *European Journal of Human genetics - European Congress of Human Genetics Conference 2007, 16-19 June, 2007, Nice, France*. P. 322.
 39. Glotov A.S., Vashukova E.S., Moskalenko M.V., Ivaschenko T.E., Gra O.A., Nasedkina T.V., Baranov V.S. Biochip technology for gene polymorphism detection in multifactorial studies // *Abstract book of Conference for Yong Scientist, PhD Students and Students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of M.I.Vavilov, 20-22 September, 2007, Kyiv, Ukraine*. P. 121.
 40. Баранов А.А., Баранов В.С., Глотов А.С., Пинелис В.Г., Смирнов И.Е., Вашукова Е.С., Давыдова О.Н., Намазова Л.С., Глотов О.С., Иващенко Т.Э., Наседкина Т.В. ДНК-нанобиочипы в изучении генетической основы мультифакториальных и наследственных заболеваний у детей // *Международный форум по НАНОТЕХНОЛОГИЯМ Rusnanotech 08. 03-05 декабря 2008г., Москва*. Стр. 312-313.
 41. Glotov A.S., Vashukova E.S., Polushkina L.B., Mityaeva O.N., Nasedkina T.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Ivaschenko T.E., Zainulina M.S., Baranov V.S. Advantages of universal primers use in biochip analysis of trombosis genes polymorphism // *European Journal of Human genetics - European Congress of Human Genetics Conference 2008, May 31 – June 3, 2008, Barcelona, Spain*. P. 412.
 42. Polushkina L.B., Glotov A.S., Vashukova E.S., Mityaeva O.N., Nasedkina T.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Ivaschenko T. E., Baranov V. S. Advantages and perspectives of universal sequences applying for multiplex PCR // *XX International Congress of Genetics, July 12 – June 17, 2008, Berlin, Germany*. P. 87.
 43. Vashukova E.S., Polushkina L.B., Glotov A.S., Nasedkina T.V., Ivaschenko T.E., Baranov V.S. Biochip-Test for Diagnostics Of Inherited Thrombophilia In Pregnant Women // *XX International Congress of Genetics, July 12 – June 17, 2008, Berlin, Germany*. P. 158.
 44. Glotov A.S., Vashukova E.S., Polushkina L.B., Nasedkina T.V., Ivaschenko T.E., Zainulina M.S., Baranov V.S. Biochips - New Method of Gene Screening Investigation in Obstetrics and Gynecology // *XX International Congress of Genetics, July 12 – June 17, 2008, Berlin, Germany*. P. 193.
 45. Glotov A.S., Vashukova E.S., Polushkina L.B., Mityaeva O.N., Nasedkina T.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Ivaschenko T. E., Baranov V. S. Multiplex PCR universal primers in biochip analysis of thrombosis genes polymorphism // *Clin Chem Lab Med –Fourth Santorini Conference Biologie Prospective 2008, September 21 - 23, 2008, Santorini Island, Greece*. V. 46(8). P. A130-131.
 46. Глотов А.С., Полушкина Л.Б., Вашукова Е.С., Митяева О.Н., Наседкина Т.В., Гра О.А., Голденкова-Павлова И.В., Баранов В.С. ПЦР-амплификация с использованием универсальных праймеров: разработка, усовершенствование и опыт использования в клинической практике // *Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина. V съезд ВОГиС. 21-28 июня 2009 г. Москва. Часть I*. Стр. 403.
 47. Глотов А.С., Пинелис В.Г., Вашукова Е.С., Потулова С.В., Глотов О.С., Иващенко Т.Э., Аверьянова Н.И., Тюменцова Е.С., Намазова-Баранова Л.С., Наседкина Т.В., Баранов А.А., Баранов В.С. Глотов А.С., Пинелис В.Г., Вашукова Е.С., Потулова С.В., Глотов О.С., Иващенко Т.Э., Аверьянова Н.И., Тюменцова Е.С., Намазова-Баранова Л.С., Наседкина Т.В., Баранов А.А.,

Баранов В.С. ДНК-биочипы для генетического тестирования многофакторных и моногенных заболеваний у детей // 1-ая Международная научная школа “Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах”. 29 июня – 4 июля 2009г., Пансионат «Заря», Московская область, Ступинский район. Стр. 118.

48. Полушкина Л.Б., Глотов А.С., Вашукова Е.С., Голденкова-Павлова И.В., Митяева О.Н., Наседкина Т.В., Пинелис В.Г., Баранов В.С. Биочип-диагностика на основе амплификации с универсальными праймерами // Сборник тезисов докладов участников Второго международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий. Международный форум по нанотехнологиям, 6-8 октября, 2009, Москва, Россия, с. 801-802.

49. Глотов А.С., Вашукова Е.С., Канаева М.Д., Бикмуллина Д.Р., Зайнулина М.С., Татарский П.С., Лившиц Л.А., Баранов В.С. Совместное исследование по разработке новых методов диагностики и профилактики акушерских осложнений у беременных женщин России и Украины с генетически обусловленными формами тромбофилии // Сборник тезисов Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург. 2010. Клинико-лабораторный КОНСИЛИУМ. 2010. № 2-3. С. 131-132.

50. Глотов А.С., Глотов О.С., Вашукова Е.С., Иващенко Т.И., Зайнуллина М.С., Баранов В.С. Оценка данных генетического тестирования наследственной предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям // Сборник тезисов I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Москва, 17-19 ноября 2010.

51. Vashukova E.S., Glotov A.S., Bicmullina D.R., Zainulina M.S., Baranov V.S. Inherited thrombophilia as a risk factor for preeclampsia // European Journal of Human genetics - European Congress of Human Genetics Conference 2010, June 12-15, 2010, Gothenburg, Sweden. P. 241

52. Глотов А.С., Баранов В.С. Моделирование риска развития мультифакторных заболеваний // Сборник материалов II всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии», Курск, 17-19 мая 2011, Стр. 161.

53. Вашукова Е.С., Глотов А.С., Бикмуллина Д.Р., Зайнулина М.С., Баранов В.С. Современные представления о генетических механизмах развития гестоза заболеваний // Сборник материалов II всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии», Курск, 17-19 мая 2011, Стр. 42.

54. Vashukova E.S., Glotov A.S., Glotov O.S., Makchrova I.A., Kanaeva M.D., Obratsova G.I., Baranov V.S. Analysis of renin-angiotensin-bradykinin system genes polymorphism in preeclampsia, hypertension and metabolic syndrome in children of North-West of Russia // European Journal of Human genetics - European Congress of Human Genetics Conference 2011, May 28 - 31, 2011, Amsterdam, Netherland. P. 317.

55. Вашукова Е.С., Глотов А.С., Баранов В.С. Роль микроРНК в риске развития гестоза у беременных женщин // Медицинский академический журнал. Приложение 2012. Материалы II всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 12-14 ноября, 2012, Стр. 199-200.

56. Глотов А.С., Баранов В.С. Генетический паспорт и современные методы ранней диагностики - необходимые компоненты формирования здоровья: за и против // Материалы 7-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «ЗДОРОВЬЕ – ОСНОВА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ», Санкт-Петербург, 22 – 24 ноября, 2012 г. Стр. 813.

57. Глотов А.С. Исследование популяционных частот полиморфизма генов, ассоциированных с риском гестоза у беременных женщин // Сборник тезисов докладов участников Семнадцатой Санкт-Петербургской ассамблеи молодых ученых и специалистов. Санкт-Петербург. 2012. Стр. 97.

58. Глотов А.С., Баранов В.С. Новые методические и методологические подходы в исследовании наследственной предрасположенности к мультифакторным заболеваниям // XX Российский национальный Конгресс «Человек и Лекарство» Москва, 15-19 апреля 2013 года

59. Глотов А.С., Баранов В.С. Опыт использования технологии полногеномного секвенирования в диагностике и профилактике наследственных и мультифакторных заболеваний // ДОНОЗОЛОГИЯ-2013 на тему: «Проблемы разработки и использования нанотехнологий в

современной профилактической медицине» г. Санкт-Петербург, 18-19 декабря 2013 года <http://www.donosology.narod.ru/donosology2013.htm>

60. Glotov O.S., Tarkovskaya I., Glotov A.S., Pakin V.S., Danilova M.M., Namozova S., Shadrin L., Pugacheva I.V., Baranov V.S. First results of monitoring of health of the students - possibilities of modern genetics // *European Journal of Human genetics*. 2013. V.21. Supl. 2. P. 561. European Congress of Human Genetics Conference 2013, June 8 - 11, 2013, Paris, France

61. Глотов А.С., Пакин В.С., Вашукова Е.С., Михайлин Е.С., Тийс Е.С., Иванисенко В.А., Аржанова О.Н., Мозговая Е.В., Зайнулина М.С., Баранов В.С. НОВОЕ В ГЕНЕТИКЕ ГЕСТОЗАВИ СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ г. Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014 г. Стр. 116. <http://conf.nsc.ru/vogis2014/ru>

62. Glotov A. S., Pakin V. S., Vashukova E. S., Danilova M. M., Mihailin E. S., Arzhanova O. N., Baranov V. S. Analysis of micrnas expression profile in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *European Human Genetics Conference May 31 - June 3, 2014, Milan, Italy. European Journal of Human genetics*. 2014. V.22. Supl. 1. P. 61.

63. Глотов А.С. Генетическое тестирование в профилактике наследственных болезней III Национальный конгресс «Дискуссионные вопросы современного акушерства», который пройдет с 28 мая по 30 мая 2015 года г. Санкт-Петербург. <http://akusherkongress.spb.ru/pdf/podrobno-prog-28-05-15-ot-19-05-15.pdf>

64. Andrey S. Glotov, Sergey V Kazakov, Elena A Zhukova, Anton V Alexandrov, Oleg S Glotov, Vladimir S Pakin, Maria M Danilova, Irina V Tarkovskaya, Svetlana S Niyazova, Natalia N Chakova, Svetlana M Komissarova, Elena A Kurnikova, Alexey A Sergushichev, Anatoly A Shalyto, Vladislav S Baranov. Targeted next-generation sequencing (NGS) of nine candidate genes with custom AmpliSeq in patients and a cardiomyopathy risk group. *European Journal of Human genetics*. 2015. V.23. Supl. 1. P. 304. European Congress of Human Genetics Conference 2015, June 6 - 9, 2015, Glasgow, Scotland, United Kingdom.

65. O.S. Glotov, A.S. Glotov, E.A. Zukova, E.B. Bashnina, O.S. Beresneva, M.E. Turkunova, I.V. Polyakova, T.E. Ivaschenko, S.V. Apalko, M.A. Fedyakov, N.Y. Schwed, E.S. Shabanova, T.A. Dubinina, L.V. Tyrtova, M.A. Polyanskaya, N.N. Lobanova, A.S. Olenov, V.V. Platonov, T.E. Korytko, A.V.Karpushkina, V.S. Baranov Exome sequencing in infants with monogenic diabetes mellitus in Russia // *European Journal of Human genetics*. 2016. European Human Genetics Conference May 21-24, 2016, Barcelona, Spain.

Монографии (включая главы в книгах):

66. Под ред. В. С. Баранова и Э. К. Айламазяна (Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Глотов А.С., Глотов О.С., Швед Н.Ю., Асеев М.В., Кречмар М.В., Потин В.В., Зайнулина М.С., Беспалова О.Н., Мозговая Е.В., Ермолинская М.И., Оржанова О.Н., Тарасова М.А., Лаврова О.С.) Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности. Генетическая карта репродуктивного здоровья: методические рекомендации. — СПб.: «Изд-во Н-Л», ООО, 2009. — 66 с. Тираж 2000 экз.

67. Под ред. В. С. Баранова (Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Глотов А.С., Баранова Е.В., Асеев М.В., Глотов О.С., Беспалова О.Н., Демин Г.С., Москаленко М.В., Швед Н.Ю.) Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины. — СПб.: «Изд-во Н-Л», ООО, 2009. — 528 с. Тираж 2000 экз.