

ГЕНЫ *TMEM136* И *PPP1R12C*, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ В ПЛАЦЕНТЕ, АССОЦИИРОВАНЫ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2022 г. Е. А. Решетников¹ *, В. А. Степанов², В. Н. Сереброва², А. В. Бочарова²,
Е. А. Трифонова², И. В. Пономаренко¹, Ю. Н. Решетникова¹, О. А. Ефремова¹, В. С. Орлова¹,
И. В. Батлуцкая¹, И. Н. Сорокина¹, М. И. Чурносов¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

²Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

*e-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 14.11.2021 г.

После доработки 06.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Изучены ассоциации генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с риском развития преэклампсии (ПЭ) у женщин Центральной России. Исследование проведено на выборке из 366 беременных с преэклампсией и 631 женщин контрольной группы. Всем беременным проводилось типирование специально отобранных девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте. Ассоциации SNP генов-кандидатов с преэклампсией оценивали при помощи логистической регрессии. Для полиморфных вариантов, показавших ассоциации с ПЭ, оценивали *in silico* их функциональные эффекты. Установлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* оказывает протективный эффект (ОШ = 0.65), а гаплотип *CA* гаплоглоба rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* является фактором риска (ОШ = 1.21) развития преэклампсии. Ассоциации данных SNP с формированием преэклампсии могут быть обусловлены их важным эпигенетическим значением: расположены в сайтах для модифицированных гистонов в областях промоторов и энхансеров, в ДНК-аза-гиперчувствительных сайтах, сайтах связывания с регуляторными белками, в доменах связывания с факторами транскрипции. Также данные локусы связаны с уровнем транскрипции и альтернативного сплайсинга в тканях, патогенетически значимых для развития преэклампсии.

Ключевые слова: преэклампсия, беременность, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), ассоциации, гены плаценты.

DOI: 10.31857/S0016675822120116

Возникновение различных нарушений гестации негативно сказывается на состоянии развивающегося организма (эмбриона, плода), обуславливая высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности новорожденных и приводя к неблагоприятным последствиям в дальнейшей их жизни (высокая заболеваемость в период детства и во взрослом возрасте и др.) [1–4].

Преэклампсия (ПЭ) – мультисистемное патологическое состояние, возникающее во второй половине беременности (после 20-й недели), характеризующееся артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией (≥ 0.3 г/л в суточной моче), нередко, отеками и проявлениями полиорганной/полисистемной дисфункции/недостаточности [5–8]. Как свидетельствуют литературные данные, частота встречаемости преэклампсии во всем мире составляет 2–8% [2, 9]. ПЭ является од-

ной из основных причин материнской смертности и перинатальных смертей [2]. При развитии тяжелой преэклампсии и эклампсии существенно повышается риск развития различных осложнений (отслойка плаценты, массивные акушерские кровотечения, ДВС-синдром, HELLP-синдром, острая почечная и печеночная недостаточность и др.) [10]. В последующей жизни у этих женщин значительно чаще регистрируются артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, инсульт [11]. Дети, родившиеся в результате беременностей, осложненных ПЭ, имеют низкий вес и высокий риск развития ряда неинфекционных хронических заболеваний [11].

Работы по изучению молекулярно-генетических основ ПЭ проводятся на уровне полногеномных исследований (GWAS) [12, 13]. Также проводятся исследования по поиску ассоциаций

ПЭ с однонуклеотидными полиморфными вариантами (*SNP*) различных групп генов-кандидатов: эндотелиальной дисфункции [14–17], сосудистого тонуса [18–20], иммунных и воспалительных реакций [21, 22], окислительного стресса [23, 24], обмена липидов [25, 26], ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [27–30], системы гемостаза [31, 32], обмена фолиевой кислоты [33–35] и др. группы генов-кандидатов [36–38].

Одной из групп генов-кандидатов, которые потенциально с высокой вероятностью могут быть вовлечены в развитие преэклампсии, являются гены, дифференциально экспрессирующиеся в плаценте [39–47]. Однако несмотря на “кажущуюся очевидность” весьма значимой роли данной группы генов-кандидатов в развитии ПЭ, полученные к настоящему времени результаты в этой области неоднозначны и в том числе противоречивы [23, 25, 41, 48–50], что диктует необходимость продолжения исследования в этой области.

Цель настоящей работы – изучение ассоциаций генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с риском развития преэклампсии у женщин Центральной России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета. Перед включением в исследование все участники подписали информированное согласие.

Выборка для исследования была сформирована в период с 2008 по 2016 гг. на базе профильных отделений стационара перинатального центра Белгородской областной клинической больницы. В выборку для исследования вошли женщины с преэклампсией и женщины контрольной группы (с физиологическим течением беременности), соответствующие ряду критериев: русский этнос, место рождения и проживания – регион Центрального Черноземья России. Основаниями для исключения женщин из исследовательской выборки были отказ от участия в данной работе, наличие родства между ними различной степени, выявление тяжелых хронических заболеваний, проводящих к декомпенсации, нерусский этнос и иные (нежели Центральное Черноземье России) места рождения и/или проживания [51].

Клиническое, клинико-лабораторное, клинико-инструментальное обследование беременных и новорожденных детей, верификация диагноза преэклампсия (или ее отсутствие), проводилось сертифицированными врачами профильных отделений перинатального центра. Преэклампсия определялась как наличие артериальной гипертензии, сопровождающейся протеинурией и оте-

ками. В выборку для данного исследования вошли 997 женщин: 366 беременных с ПЭ и 631 женщин группы контроля.

Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из замороженной венозной крови [52]. Отбор *SNP* для исследования проведен на основе критериев, описанных в работе [53]. Также при отборе полиморфных локусов учитывалась их связь с экспрессией и альтернативным сплайсингом генов (*eSNP* and *sSNP*) [54, 55]. Регуляторный потенциал и вовлеченность в пути регуляции транскрипции генов *SNP* (*regSNP*, *eSNP*, *sSNP*) оценивались с использованием онлайн портала *HaploReg* (v. 4.1) [56]. С учетом данных критериев для исследования были отобраны девять *SNPs* генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте: rs36011588 *TMEM136*, rs56051972 *KRT19*, rs12691 *CEBPA*, rs10423795 *LHB*, rs12609771 *SIGLEC6*, rs1671215 и rs1654439 *RDH13*, rs2532058 и rs66707428 *PPP1R12C*.

Генотипирование образцов ДНК было выполнено с использованием метода MALDI и масс-спектрометра *MassARRAY Analyzer 4* (“Sequenom”, USA) (Центр коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского национального исследовательского медицинского центра РАН). Протокол генотипирования образцов ДНК подробно описан в работе [53].

В изучаемых выборках беременных для девяти *SNP* генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, вычислены параметры наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностей (H_o и H_e соответственно), определены частоты минорных аллельных вариантов, получены данные о наблюдаемом и ожидаемом распределении генотипов (используя закономерность Харди–Вайнберга) [57, 58]. Расчет показателей проводился при помощи программного комплекса *gPLINK v2.050* [59]. Отбор *SNP* для последующего анализа проводился в соответствии со следующими критериями: $MAF > 5\%$, а также соответствие закономерности Харди–Вайнберга (HWE).

Анализ гаплоглобальной структуры осуществлялся с помощью алгоритма “Confidence intervals” (при $D' > 0.8$), имплементированного в программу *gPLINK v2.050*. Ассоциации *SNP* и частот гаплоглобальных генов-кандидатов с формированием преэклампсии оценивали при помощи логистической регрессии с включением в расчеты трех моделей – аддитивной (модель 1), рецессивной (модель 2) и доминантной (модель 3), и поправкой на ковариаты (выявленные средовые факторы риска) и множественные сравнения (использовались адаптивные пермутационные процедуры с расчетом показателя p_{perm}). Для оценки направленности ассоциации использовался показатель отноше-

ния шансов (ОШ) и его 95%-ный доверительный интервал (95%CI).

На заключительном этапе настоящего исследования мы изучили связь SNP, показавших значимые ассоциации с ПЭ, с несинонимическими заменами (база данных SIFT PolyPhen-2), эпигенетическими эффектами (базы данных HaploReg (v4.1), rSNP MAPPER, RegulomeDB (v1.1), экспрессией и альтернативным сплайсингом генов (базы данных Blood eQTL browser, GTEx portal) [56, 60–65]. При этом нами оценивались функциональные эффекты не только SNP, показавших значимые ассоциации, но и сильно сцепленных с ними SNP. SNP, находящиеся в неравновесии по сцеплению (при заданном уровне $r^2 \geq 0.8$) с “ассоциированными” SNP, устанавливались с использованием онлайн-портала HaploReg (версия 4.1) [56].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлены “рисковые” значения для формирования ПЭ: индекса массы тела (ОШ = 1.12), количества мертворождений (ОШ = 4.74), спонтанных (ОШ = 1.59) и медицинских (ОШ = 1.31) аборт, наличие артериальной гипертензии до беременности (ОШ = 5.43) и преэклампсии в анамнезе (ОШ = 9.19), а также “протективная” роль возраста менархе (ОШ = 0.42) и курения (ОШ = 0.51). Данные факторы риска (протективные факторы) ПЭ на следующем этапе исследования при изучении ассоциаций SNP с формированием ПЭ, использовались в качестве ковариат.

Данные по распределению частот генотипов и аллелей девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, у изучаемых групп беременных представлены в табл. 1. Для всех локусов наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга.

Установлены ассоциации с развитием преэклампсии полиморфного локуса rs36011588 *TMEM136*: аллель *G* связан с данным осложнением беременности в рамках рецессивной модели (ОШ = 0.65, 95%CI 0.44–0.97, $p_{\text{perm}} = 0.036$) (табл. 2).

Анализ гаплоглобальной структуры выявил два гаплоглоба среди изучаемых SNP (табл. 3). Установлена связь гаплотипа *CA* гаплоглоба rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* с риском развития преэклампсии (ОШ = 1.21, $p = 0.047$, $p_{\text{perm}} = 0.050$).

На следующем этапе работы с использованием онлайн-ресурсов HaploReg (v4.1), Blood eQTL Browser и GTEx Portal были оценены регуляторные эффекты и влияние на экспрессию и альтернативный сплайсинг генов, локусов, связанных с риском формирования преэклампсии. Следует отметить, что полиморфный локус rs36011588 *TMEM136*, являющийся протективным фактором при формировании ПЭ (ОШ = 0.65), расположен

в сайте для модифицированных гистонов в области промоторов в 24 тканях, в ДНКза-гиперчувствительном сайте в 45 тканях, сайте связывания с регуляторными белками POL2, E2F6, GATA3, а также в TF-связывающем домене для трех TF: KAP1, LRH1, ZNF263. Различия между LOD scores аллелей *G* и *C* составляют –1.3 для KAP1, –11.8 для LRH1 и 1.4 для ZNF263. Таким образом, аллель *G* обуславливает понижение аффинности к KAP1 и LRH1, а аллель *C* – повышение аффинности к ZNF263. Помимо этого, с rs36011588 *TMEM136* сильно сцеплены ($r^2 \geq 0.8$) более десяти полиморфных локусов, которые находятся в сайтах для модифицированных гистонов в промоторных областях (1–24 тканей) и областях энхансеров (13–23 тканей), ДНКза-гиперчувствительных сайтах (2–47 тканей), сайтах связывания с регуляторными белками (2–4 белка) и областях регуляторных последовательностей (1–9 областей).

С помощью онлайн-ресурса GTEx Portal установлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* связан с более высокой транскрипцией гена *TMEM136* в подкожной и висцеральной жировой ткани ($\beta = 0.21$, $p = 3.7 \times 10^{-8}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$), в молочных железах ($\beta = 0.23$, $p = 2.9 \times 10^{-7}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$). С данным полиморфным локусом находятся в сильном сцеплении ($r^2 \geq 0.8$) 39 SNPs, также связанных с уровнем экспрессии мРНК гена *TMEM136* в подкожной и висцеральной жировой ткани, в молочных железах.

Выявлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* ассоциирован с пониженным уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *TMEM136* в висцеральной жировой ткани (интрон ID: 120325368:120329977:clu_9525, $\beta = -0.32$, $p = 2.9 \times 10^{-9}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$), молочных железах (интрон ID: 120325368:120329977:clu_9749, $\beta = -0.39$, $p = 4.8 \times 10^{-11}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$) и яичниках (интрон ID: 120325368:120329977:clu_7827, $\beta = -0.45$, $p = 3.4 \times 10^{-8}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$). Так же, с rs36011588 *TMEM136* находятся в сильном сцеплении ($r^2 \geq 0.8$) 39 SNP, которые ассоциированы с уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *TMEM136* в висцеральной жировой ткани, молочных железах и яичниках.

Нами впервые выявлена вовлеченность полиморфного локуса rs36011588 *TMEM136* в формирование преэклампсии. Ген *TMEM136* кодирует трансмембранный белок 136 (TLC-содержащий домен белок 5 (TLCD5)), функция которого изучена недостаточно (<https://www.genecards.org/>). Результаты исследования по анализу транскриптома (изучались образцы плаценты у 21 женщины русского этноса) показали пониженную экспрессию мРНК и белка *TMEM136* у беременных с ПЭ по сравнению с контрольной группой [24]. В исследовании, проведенном в японской популя-

Таблица 1. Распределение частот генотипов девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, в исследуемых выборках беременных

Локус (полиморфизм)	Хр	Генотипы, минорный аллель	Контроль ($n = 631$) % (n)		Беременные с преэклампсией ($n = 366$) % (n)	
			распределение генотипов, аллелей	p_{HWE}	распределение генотипов, аллелей	p_{HWE}
rs36011588	11	<i>GG</i>	16.32 (103)	0.7	10.93 (40)	0.11
		<i>GC</i>	47.70 (301)		50.00 (183)	
		<i>CC</i>	35.98 (227)		39.07 (143)	
		<i>G</i>	0.40		0.36	
rs56051972	17	<i>GG</i>	13.99 (88)	0.14	13.12 (48)	0.65
		<i>GC</i>	43.08 (271)		48.09 (176)	
		<i>CC</i>	42.93 (270)		38.80 (142)	
		<i>G</i>	0.36		0.37	
rs12691	19	<i>TT</i>	1.74 (11)	0.33	2.46 (9)	0.06
		<i>TC</i>	19.56 (123)		16.12 (59)	
		<i>CC</i>	78.70 (495)		81.42 (298)	
		<i>T</i>	0.12		0.11	
rs10423795	19	<i>CC</i>	14.42 (91)	0.26	11.20 (41)	1.00
		<i>CT</i>	44.22 (279)		44.26 (162)	
		<i>TT</i>	41.36 (261)		44.54 (163)	
		<i>C</i>	0.37		0.33	
rs12609771	19	<i>CC</i>	0.95 (6)	0.20	1.64 (6)	0.60
		<i>CA</i>	39.89 (146)		19.73 (72)	
		<i>AA</i>	75.91 (479)		78.63 (287)	
		<i>C</i>	0.13		0.12	
rs1671215	19	<i>CC</i>	8.41 (53)	0.43	6.28 (23)	0.89
		<i>CA</i>	39.05 (246)		38.80 (142)	
		<i>AA</i>	52.54 (331)		54.92 (201)	
		<i>C</i>	0.28		0.26	
rs1654439	19	<i>TT</i>	2.23 (14)	0.22	1.10 (4)	1.00
		<i>TG</i>	21.46 (135)		18.63 (68)	
		<i>GG</i>	76.31 (480)		80.27 (293)	
		<i>T</i>	0.13		0.10	
rs2532058	19	<i>AA</i>	13.35 (84)	0.35	12.02 (44)	0.82
		<i>AC</i>	48.81 (307)		44.26 (162)	
		<i>CC</i>	37.84 (238)		43.72 (160)	
		<i>A</i>	0.38		0.34	
rs66707428	19	<i>GG</i>	1.74 (11)	0.59	1.37 (5)	0.59
		<i>GA</i>	21.40 (135)		18.90 (69)	
		<i>AA</i>	76.86 (485)		79.73 (291)	
		<i>G</i>	0.12		0.11	

Примечание. Хр – хромосома, p_{HWE} – уровень значимости при равновесии Харди–Вайнберга.

Таблица 2. Ассоциации девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с формированием преэклампсии

Минорный аллель (полиморфизм)	Хр	Аддитивная модель				Доминантная модель				Рецессивная модель			
		ОШ	95%CI		<i>p</i>	ОШ	95%CI		<i>p</i>	ОШ	95%CI		<i>p</i>
			L95	U95			L95	U95			L95	U95	
<i>G</i> (rs36011588)	11	0.83	0.68	1.01	0.06	0.85	0.65	1.12	0.24	0.65	0.44	0.97	0.036
<i>G</i> (rs56051972)	17	1.07	0.88	1.30	0.51	1.16	0.89	1.53	0.27	0.95	0.64	1.41	0.81
<i>T</i> (rs12691)	19	0.96	0.72	1.29	0.80	0.90	0.65	1.27	0.56	1.47	0.59	3.66	0.41
<i>C</i> (rs10423795)	19	0.92	0.75	1.12	0.39	0.91	0.70	1.20	0.51	0.85	0.565	1.2	0.42
<i>C</i> (rs12609771)	19	0.97	0.72	1.30	0.85	0.93	0.68	1.28	0.67	1.67	0.51	5.45	0.40
<i>C</i> (rs1671215)	19	0.88	0.71	1.092	0.25	0.90	0.69	1.17	0.42	0.72	0.42	1.22	0.22
<i>T</i> (rs1654439)	19	0.79	0.58	1.06	0.11	0.79	0.57	1.67	0.17	0.49	0.15	1.56	0.23
<i>A</i> (rs2532058)	19	0.86	0.71	1.05	0.15	0.81	0.61	1.07	0.12	0.88	0.59	1.31	0.52
<i>G</i> (rs66707428)	19	0.88	0.666	1.18	0.39	0.88	0.64	1.22	0.45	0.68	0.22	2.06	0.49

Примечание. ОШ – отношение шансов, 95%CI – доверительный интервал отношения шансов, L95 – нижняя граница доверительного интервала, U95 – верхняя граница доверительного интервала, *p* – уровень значимости, полужирным шрифтом выделены статистически значимые результаты с учетом адаптивного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

Таблица 3. Частоты гаплогенов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, среди женщин с преэклампсией и в группе контроля

Гапоблоки (гены) и полиморфные локусы, входящие в их состав	Гаплоген	Встречаемость гаплогенов		ОШ	<i>p</i>
		контроль (<i>n</i> = 631)	беременные с преэклампсией (<i>n</i> = 366)		
H1 (<i>RDH13</i>) rs1671215–rs1654439	<i>CT</i>	0.130	0.104	0.79	0.114
	<i>CG</i>	0.150	0.151	0.99	0.939
	<i>AG</i>	0.720	0.745	1.14	0.217
H2 (<i>PPP1R12C</i>) rs2532058–rs66707428	<i>CG</i>	0.123	0.106	0.87	0.343
	<i>AA</i>	0.376	0.341	0.86	0.142
	<i>CA</i>	0.501	0.553	1.21	0.047

Примечание. ОШ – отношение шансов, *p* – уровень значимости, полужирным шрифтом выделены статистически значимые результаты с учетом адаптивного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

ции, по анализу дифференциально экспрессируемых генов плаценты при тяжелой преэклампсии и нормотензивной беременности также был выявлен более низкий уровень транскрипции гена *TMEM136* у женщин с ПЭ [66]. Напротив, в работе V.D. Winn [67] не было выявлено связей между экспрессией гена *TMEM136* и формированием ПЭ. Ассоциации rs36011588 *TMEM136* с риском развития преэклампсии были исследованы только В.Н. Серебровой с соавт. [40]. В данной работе, проведенной на трех этнических группах (русские, якуты и буряты), анализировались ассоциации 29 SNP в 17 генах, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с предрасположенностью к ПЭ. По результатам исследования не

было обнаружено связей rs36011588 *TMEM136* с данным осложнением беременности.

Полиморфные локусы rs2532058 и rs66707428 *PPP1R12C*, ассоциированные с повышенным риском развития ПЭ в составе гаплогена, имеют важное регуляторное значение: локализованы в сайтах для модифицированных гистонов в промоторных областях (24 ткани для rs66707428) и областях энхансеров (четыре ткани для rs2532058), ДНКза-гиперчувствительных сайтах (1–12 тканей для rs2532058 и rs66707428), сайтах связывания с регуляторными белками (три белка для rs66707428) и областях регуляторных мотивов (1–5 мотивов для rs2532058 и rs66707428).

Анализ данных онлайн-ресурса GTE Portal показал, что аллель *C* rs2532058 *PPP1R12C* связан

со снижением уровня альтернативного сплайсинга транскрипта гена *PPP1R12C* в висцеральной жировой ткани (интрон ID: 55093233:55094355:clu_27045, $\beta = -0.41$, $p = 4.8 \times 10^{-12}$, $p_{FDR} \leq 0.05$) и крови (интрон ID: 55096178:55098784:clu_21866, $\beta = -0.18$, $p = 4.3 \times 10^{-7}$, $p_{FDR} \leq 0.05$). Помимо этого, с rs2532058 *PPP1R12C* находится в сильном сцеплении rs62126308 ($r^2 \geq 0.8$), также ассоциированный с пониженным уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *PPP1R12C* в висцеральной жировой ткани (интрон ID: 55093233:55094355:clu_27045, $\beta = -0.40$, $p = 3.6 \times 10^{-11}$, $p_{FDR} \leq 0.05$).

Ген *PPP1R12C* кодирует регуляторную субъединицу 12С миозинфосфатазы 1, влияющую на каталитическую активность данного фермента, и таким образом связанную со сборкой актинового цитоскелета в клетках организма (<https://www.genecards.org/>). Результаты проведенных работ указывают на повышенный уровень экспрессии мРНК и протеина *PPP1R12C* у женщин с ПЭ русской [39] и северо-американской популяциях [68]. Анализ ассоциативных исследований, посвященных изучению роли rs2532058 и rs66707428 *PPP1R12C* в формировании преэклампсии, показал, что такие работы были проведены в популяциях русских, якутов, бурятов сибирского региона РФ [40]. В результате данного исследования выявлено, что аллель А и генотип АА rs66707428 *PPP1R12C* статистически чаще встречаются у женщин бурятской популяции с ПЭ, что в целом согласуется с результатами нашего исследования, в котором выявлено рискованное значение аллеля А rs66707428 *PPP1R12C* в составе гаплотипа при развитии ПЭ.

Таким образом, установлено, что аллель G rs36011588 *TMEM136* является протективным фактором (ОШ = 0.65), а гаплотип СА гапблока rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* фактором риска (ОШ = 1.21) при развитии преэклампсии у беременных Центральной России. Ассоциации данных SNP с формированием преэклампсии могут быть обусловлены их важным эпигенетическим значением: расположены в сайтах для модифицированных гистонов в области промоторов и энхансеров, в ДНК-гиперчувствительных сайтах, сайтах связывания с регуляторными белками, в доменах связывания с факторами транскрипции. Также данные локусы связаны с уровнем транскрипции и альтернативного сплайсинга в тканях, патогенетически значимых для развития преэклампсии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ “Изучение генетических факторов репродуктивного здоровья женщин” (МД-3284.2022.1.4).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-

го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reshetnikov E., Zarudskaya O., Polonikov A. et al. Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia // J. Obstet. Gynaecol. Res. 2017. V. 43(7). P. 1139–1144. <https://doi.org/10.1111/jog.13329>
2. Poon L.C., Shennan A., Hyett J.A. et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2019. V. 145(S1). P. 1–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12802>
3. Golovchenko O., Abramova M., Ponomarenko I. et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2020. V. 253. P. 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
4. Ahmed A.A.M., Azova M.M. Association of VEGFA, factor V and prothrombin gene polymorphisms with early pregnancy loss // Res. Results in Biomedicine. 2021. V. 7(2). P. 111–116. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-1>
5. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. № 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2002. V. 77(1). P. 67–75.
6. Rana S., Lemoine E., Granger J.P., Karumanchi S.A. Preeclampsia: Pathophysiology, challenges, and perspectives // Circ. Res. 2019. V. 124(7). P. 1094–1112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313276>
7. Ramos J.G.L., Sass N., Costa S.H.M. Preeclampsia // Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2017. V. 39(9). P. 496–512. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1604471>
8. Awamleh Z., Gloor G.B., Han V.K.M. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: Potential impact on gene expression and pathophysiology // BMC Med. Genomics. 2019. V. 12(1). P. 91. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0548-x>
9. Apicella C., Ruano C.S.M., Méhats C. et al. The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20(11). P. 2837. <https://doi.org/10.3390/ijms20112837>
10. Phipps E.A., Thadhani R., Benzing T., Karumanchi S.A. Pre-eclampsia: Pathogenesis, novel diagnostics and therapies // Nat. Rev. Nephrol. 2019. V. 15(5). P. 275–289. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0119-6>

11. *Caillon H., Tardif C., Dumontet E. et al.* Evaluation of sFlt-1/PlGF ratio for predicting and improving clinical management of pre-eclampsia: Experience in a specialized perinatal care center // *Ann. Lab. Med.* 2018. V. 38. P. 95–101.
<https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.95>
12. *Johnson M.P., Brennecke S.P., East C.E. et al.* Genome-wide association scan identifies a risk locus for pre-eclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene // *PLoS One.* 2012. V. 7(3). P. e33666.
<https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.95>
13. *Zhao L., Bracken M.B., DeWan A.T.* Genome-wide association study of pre-eclampsia detects novel maternal single nucleotide polymorphisms and copy-number variants in subsets of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study cohort // *Ann. Hum. Genet.* 2013. V. 77(4). P. 277–287.
<https://doi.org/10.1111/ahg.12021>
14. *Reshetnikov E., Ponomarenko I., Golovchenko O. et al.* The VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and blood pressure in women at the end of pregnancy // *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 2019. V. 58(3). P. 390–395.
<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.11.035>
15. *Hamid H.M., Abdalla S.E., Sidig M. et al.* Association of VEGFA and IL1 β gene polymorphisms with pre-eclampsia in Sudanese women // *Mol. Genet. Genomic. Med.* 2020. V. 8(3). P. e1119.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.1119>
16. *Shaheen G., Jahan S., Bibi N. et al.* Association of endothelial nitric oxide synthase gene variants with pre-eclampsia // *Reprod. Health.* 2021. V. 18(1). P. 163.
<https://doi.org/10.1186/s12978-021-01213-9>
17. *Abbasi H., Dastgheib S.A., Hadadan A. et al.* Association of endothelial nitric oxide synthase 894G > T polymorphism with pre-eclampsia risk: A systematic review and meta-analysis based on 35 studies // *Fetal Pediatr. Pathol.* 2021. V. 40(5). P. 455–470.
<https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1710880>
18. *Azimi-Nezhad M., Teymoori A., Ebrahimzadeh-Vesal R.* Association of *CYP11B2* gene polymorphism with pre-eclampsia in north east of Iran (Khorasan province) // *Gene.* 2020. V. 733. P. 144358.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144358>
19. *Bogacz A., Bartkowiak-Wieczorek J., Procyk D. et al.* Analysis of the gene polymorphism of aldosterone synthase (*CYP11B2*) and atrial natriuretic peptide (*ANP*) in women with preeclampsia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016. V. 197. P. 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.11.012>
20. *Aung M., Konoshita T., Moodley J., Gathiram P.* Association of gene polymorphisms of aldosterone synthase and angiotensin converting enzyme in pre-eclamptic South African Black women // *Pregnancy Hypertens.* 2018. V. 11. P. 38–43.
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2017.12.004>
21. *Zheng Y., Ma C., Liu X. et al.* Association between HLA-A gene polymorphism and early-onset pre-eclampsia in Chinese pregnant women early-onset // *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020. V. 20(1). P. 656.
<https://doi.org/10.1186/s12884-020-03340-w>
22. *Wu W., Yang H., Feng Y. et al.* Polymorphisms in inflammatory mediator genes and risk of preeclampsia in Taiyuan, China // *Reprod. Sci.* 2017. V. 24(4). P. 539–547.
<https://doi.org/10.1177/1933719116660844>
23. *Yi K., Xu J., Peng B.* The association between GSTP1 polymorphism and pre-eclampsia risk: A system review and meta-analysis // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2020. V. 301(1). P. 11–18.
<https://doi.org/10.1007/s00404-019-05411-6>
24. *Zhao G., Liu J., Meng T.* Oxidative stress-related genes (EPHX1 and MnSOD) polymorphism and risk of pre-eclampsia: A meta-analysis // *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* 2021. V. 15. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1887123>
25. *Abyadeh M., Heydarinejad F., Khakpash M. et al.* Association of apolipoprotein E gene polymorphism with preeclampsia: A meta-analysis // *Hypertens. Pregnancy.* 2020. V. 39(2). P. 196–202.
<https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1753068>
26. *Thakoordeen-Reddy S., Winkler C., Moodley J. et al.* Maternal variants within the apolipoprotein L1 gene are associated with preeclampsia in a South African cohort of African ancestry // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. V. 246. P. 129–133.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.01.034>
27. *Abedin D.A., Esmailzadeh E., Amin-Beidokhti M. et al.* ACE gene rs4343 polymorphism elevates the risk of pre-eclampsia in pregnant women // *J. Hum. Hypertens.* 2018. V. 32(12). P. 825–830.
<https://doi.org/10.1038/s41371-018-0096-4>
28. *Procopciuc L.M., Nemeti G., Buzdugan E. et al.* Renin-angiotensin system gene variants and risk of early- and late-onset preeclampsia: A single center case-control study // *Pregnancy Hypertens.* 2019. V. 18. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.08.006>
29. *Huang T., Yan Y., Li J. et al.* An insertion-deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme is associated with a reduced risk of preeclampsia: an evidence-based meta-analysis from 44 studies // *Hypertens. Pregnancy.* 2020. V. 39(3). P. 336–347.
<https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1769644>
30. *Jansaka N., Pornwattanakrirlert W., Tongsong T. et al.* A study of the association between angiotensinogen (AGT) gene polymorphism (M235T) and preeclampsia in Thai pregnant women // *J. Obstet. Gynaecol.* 2021. V. 16. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1080/01443615.2020.1837757>
31. *Ababio G.K., Adu-Bonsaffoh K., Abindau E. et al.* Effects of factor V Leiden polymorphism on the pathogenesis and outcomes of preeclampsia // *BMC Med. Genet.* 2019. V. 20(1). P. 189.
<https://doi.org/10.1186/s12881-019-0924-6>
32. *Ahmed N.A., Adam I., Elzaki S.E.G. et al.* Factor-V Leiden G1691A and prothrombin G20210A polymorphisms in Sudanese women with preeclampsia, a case-control study // *BMC Med. Genet.* 2019. V. 20(1). P. 2.
<https://doi.org/10.1186/s12881-018-0737-z>
33. *Mohammadpour-Gharehbagh A., Teimoori B., Narooei-Nejad M. et al.* The association of the placental MTHFR 3'-UTR polymorphisms, promoter methylation, and MTHFR expression with preeclampsia // *J. Cell Biochem.* 2018. V. 119(2). P. 1346–1354.
<https://doi.org/10.1002/jcb.26290>

34. Mishra J., Talwar S., Kaur L. et al. Differential global and MTHFR gene specific methylation patterns in pre-eclampsia and recurrent miscarriages: A case-control study from North India // *Gene*. 2019. V. 704. P. 68–73.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.036>
35. Ahmed S.F., Ali M.M., Kheiri S. et al. Association of methylenetetrahydrofolatereductase C677T and reduced-f carrier-1 *G80A* gene polymorphism with pre-eclampsia in Sudanese women // *Hypertens. Pregnancы*. 2020. V. 39(2). P. 77–81.
<https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1725037>
36. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А. Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *CORO2A* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов // *Науч. рез. биомед. исследований*. 2018. Т. 4. № 3. С. 38–48.
<https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4>
37. Wang T., Lian Y. The relationship between Fas and Fas ligand gene polymorphism and preeclampsia risk // *Biosci. Rep.* 2019. V. 39(2). P. BSR20181901.
<https://doi.org/10.1042/BSR20181901>
38. Pinarbasi E., Cekin N., Bildirici A.E. et al. *STOX1* gene Y153H polymorphism is associated with early-onset preeclampsia in Turkish population // *Gene*. 2020. V. 754. P. 144894.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144894>
39. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И. и др. Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2014. Т. 6. № 2(21). С. 77–90.
40. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Габидулина Т.В. и др. Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, дифференциально экспрессирующихся в плацентарной ткани // *Мол. биология*. 2016. Т. 50. № 5. С. 870–879.
41. Kleinrouweler C.E., van Uiter M., Moerland P.D. et al. Differentially expressed genes in the pre-eclamptic placenta: A systematic review and meta-analysis // *PLoS One*. 2013. V. 8(7). P. e68991.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068991>
42. Christians J.K., Leavey K., Cox B.J. Associations between imprinted gene expression in the placenta, human fetal growth and preeclampsia // *Biol. Lett.* 2017. V. 13(11). P. 20170643.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0643>
43. Luo S., Pei J., Li X., Gu W. Decreased expression of *JHDMID* in placenta is associated with preeclampsia through *HLA-G* // *J. Hum. Hypertens.* 2018. V. 32(6). P. 448–454.
<https://doi.org/10.1038/s41371-018-0062-1>
44. Liu S., Jiang S., Huang L., Yu Y. Expression of *SASH1* in preeclampsia and its effects on human trophoblast // *Biomed. Res. Int.* 2020. V. 2020. P. 5058260.
<https://doi.org/10.1155/2020/5058260>
45. Deysenroth M.A., Li Q., Escudero C. et al. Differences in placental imprinted gene expression across pre-eclamptic and non-preeclamptic pregnancies // *Genes (Basel)*. 2020. V. 11(10). P. 1146.
<https://doi.org/10.3390/genes11101146>
46. Zheng Z., Chen H., Zhu S., Hu Y. *CXCR4/CXCR7* protein expression levels in placentas of patients with pre-eclampsia // *Med. Sci. Monit.* 2021. V. 27. P. e931192.
<https://doi.org/10.12659/MSM.931192>
47. Yong H.E., Melton P.E., Johnson M.P. et al. Genome-wide transcriptome directed pathway analysis of maternal pre-eclampsia susceptibility genes // *PLoS One*. 2015. V. 10(5). P. e0128230.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128230>
48. Brew O., Sullivan M.H., Woodman A. Comparison of normal and pre-eclamptic placental gene expression: A systematic review with meta-analysis // *PLoS One*. 2016. V. 11(8). P. e0161504.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161504>
49. Huang X., Anderle P., Hostettler L. et al. Identification of placental nutrient transporters associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia // *BMC Genomics*. 2018. V. 19(1). P. 173.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4518-z>
50. Vennou K.E., Kontou P.I., Braliou G.G., Bagos P.G. Meta-analysis of gene expression profiles in preeclampsia // *Pregnancy Hypertens.* 2020. V. 19. P. 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.12.007>
51. Starikova D., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the *MMP9* gene with exfoliation glaucoma in the caucasian population of Central Russia // *Ophthalmic Res.* 2021 V. 64(3). P. 458–464.
<https://doi.org/10.1159/00051250y>
52. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia // *Gene*. 2020. V. 757. P. 144933.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
53. Stepanov V.A., Trifonova E.A. Multiplex genotyping of single nucleotide polymorphisms by MALDI-TOF mass-spectrometry: Frequencies of 56 SNP in immune response genes in human populations // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2013. V. 47(6). P. 976–986.
54. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis // *Reprod. Biomed. Online*. 2020. V. 41(5). P. 943–956.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
55. Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // *Scientific Reports*. 2021 V. 11(1). P. 5224.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4>
56. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44(D1). P. D877–D881.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
57. Zang Y., Yuan Y. A shrinkage method for testing the Hardy–Weinberg equilibrium in case-control studies // *Genet. Epidemiol.* 2013. V. 37(7). P. 743–750.
<https://doi.org/10.1002/gepi.21753>
58. Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. P. 1490–1494.
<https://doi.org/10.18240/ijjo.2017.10.02>

59. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. P. 559–575.
60. Xu Z., Taylor J.A. SNPinfo: Integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies // *Nucl. Ac. Res.* 2009. V. 37(2). P. W600–W605.
61. Boyle A.P., Hong E.L., Hariharan M. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB // *Genome Res.* 2012. V. 9. P. 1790–1797.
62. Westra H.J., Peters M.J., Esko T. et al. Systematic identification of transe QTLs as putative drivers of known disease associations // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. P. 1238–1243.
<https://doi.org/10.1038/ng.2756>
63. Guo L., Du Y., Chang S. et al. rSNPBase: A database for curated regulatory SNPs // *Nucl. Ac. Res.* 2014. V. 42. P. D1033–D1039.
64. Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al. Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // *Kardiologiya.* 2019. V. 59(7S). P. 31–39.
<https://doi.org/10.18087/cardio.2598>
65. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma // *Front. Genet.* 2021. V. 11. P. 512940.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>
66. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M. et al. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 9. P. 107.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-107>
67. Winn V.D., Gormley M., Fisher S.J. The impact of pre-eclampsia on gene expression at the maternal-fetal interface // *Pregnancy Hypertens.* 2011. V. 1(1). P. 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2010.12.001>
68. Tsai S., Hardison N.E., James A.H. et al. Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signalling pathways // *Placenta.* 2011. V. 32(2). P. 175–182.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.014>

Genes *TMEM136* and *PPP1R12C* Differentially Expressed in the Placenta Are Associated with Preeclampsia

E. A. Reshetnikov^{a, *}, V. A. Stepanov^b, V. N. Serebrova^b, A. V. Bocharova^b, E. A. Trifonova^b,
I. V. Ponomarenko^a, Yu. N. Reshetnikova^a, O. A. Efremova^a, V. S. Orlova^a,
I. V. Batlutskaya^a, I. N. Sorokina^a, and M. I. Churnosov^a

^aBelgorod National State University, Belgorod, 308015 Russia

^bResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia

*e-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru

The associations of genes differentially expressed in the placenta with the risk of preeclampsia in women in Central Russia were studied. The study was conducted on a sample of 366 pregnant women with preeclampsia and 631 women in the control group. All pregnant women underwent typing of specially selected nine SNPs of genes differentially expressed in the placenta. Associations of SNPs of candidate genes with preeclampsia were assessed using logistic regression. For polymorphisms that showed associations with PE, their functional effects were assessed *in silico*. It was established that the G allele rs36011588 *TMEM136* is a protective factor (OR = 0.65), and the CA haplotype of the rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* is a risk factor (OR = 1.21) for the development of preeclampsia. The associations of these SNPs with the formation of preeclampsia may be due to their important epigenetic significance: they are located at the sites of modified histones in the regions of promoters and enhancers, in DNase-hypersensitive sites, binding sites for regulatory proteins, and in the binding domains for transcription factors. Also, these loci are associated with the level of transcription and alternative splicing in tissues pathogenetically significant for the development of preeclampsia.

Keywords: preeclampsia, single nucleotide polymorphism (SNP), associations, genes of the placenta.