

ГЕННА МЕРЕЖА АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ НА ХРОНІЧНУ ГІПОКСІЮ ПРИ**ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ****Одеський національний медичний університет****(м. Одеса)**

Виконане дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи Одеського національного медичного університету МОЗ України «Молекулярно-генетичні та екологозалежні механізми розвитку пухлин репродуктивної системи: шляхи удосконалення діагностики, лікування і профілактики», № держ. реєстрації 0102U006588.

Вступ. За даними експертів ВООЗ анемія виявляється щороку в світі у 35-75% вагітних [1]. У країнах СНД за різними джерелами, на них страждає від 20 до 80% вагітних, у розвинених країнах Європи та США – від 20 до 30% [1, 2]. Особливо часто (до 78-80%) залізодефіцитні стани зустрічаються в регіонах з високим рівнем народжуваності [3], однак в останні роки з'являються дані про тісну асоціацію сідеропенії із соматичними захворюваннями [4].

На жаль, у більшості випадків резерви заліза на початку вагітності є невисокими, а наприкінці гестаційного процесу залізо дефіцит розвивається у всіх без винятку вагітних або в латентній, або в маніфестованій формі [1, 5, 6]. Це пов'язано з тим, що вагітність супроводжується додатковою втратою заліза: 320-500 мг заліза витрачається на приріст гемоглобіну і зростання клітинного метаболізму, 100 мг на побудову плаценти, 50 мг на збільшення розмірів матки, 400-500 мг на потреби плода. В результаті, з урахуванням депонованого заліза, плід забезпечується залізом в достатній кількості, але при цьому у вагітних нерідко розвиваються залізодефіцитні стани різного ступеня тяжкості [5-7].

Біологічна значимість заліза визначається його участю в тканинному диханні. При дефіциті заліза у вагітних виникає прогресуюча гемічна гіпоксія з подальшим розвитком вторинних метаболічних розладів. Оскільки при вагітності споживання кисню збільшується на 15-33%, це посилює розвиток гіпоксії [1, 6, 7]. У вагітних з тяжким ступенем залізодефіцитної анемії розвивається не тільки тканинна і гемічна гіпоксія, а й циркуляторна, обумовлена розвитком дистрофічних змін в міокарді, порушенням його скорочувальної здатності, розвитком гіпокінетичного типу кровообігу [7].

Різні дослідження показали, що при дефіциті заліза вагітні жінки більш сприйнятливі до інфекційних захворювань, тому що залізо бере участь у зростанні

нервових клітин, синтезі колагену, метаболізмі порфірину, термінальному окисненні і окисному фосфорилуванню в клітинах, роботі імунної системи [6, 7].

При тривалому перебігу анемії порушується функція плаценти, зростає ризик передчасних пологів та прееклампсії. У 10-15% випадків визначаються гіпотонія і слабкість пологової діяльності, гіпотонічні кровотечі в пологах, гнійно-септичні ускладнення та гіпогалактія [1, 3, 9]. Навіть при прихованому дефіциті заліза у 59% жінок відзначено несприятливий перебіг вагітності [5].

У зв'язку з вищевикладеним виникає потреба у розробці підходів до оцінки ризику виникнення асоційованих із залізодефіцитними станами ускладнень вагітності. Одним з найбільш перспективних напрямків є дослідження ролі генних регуляторних мереж, які визначають адаптаційні можливості організму та є чутливими до хронічної гіпоксії. До таких генів належать зокрема *HIF1A* (OMIM 603348), *eNOS* (OMIM 163729), *VEGFA* (OMIM 192240) та *PIGF* (OMIM 600153).

Мережа генної регуляції – це сукупність опосередковано пов'язаних між собою модульних елементів ДНК (генів), які приймають множинні вхідні сигнали у вигляді РНК і білків, обробляють сигнали і зумовлюють темп, з яким гени мережі транскрибуються в РНК і транслуються в білки. Архітектура мережі віддзеркалює взаємодію її різних елементів і дає найповніше уявлення щодо регуляції функціонування клітини на відміну від традиційного вивчення поодиноких генів. Таким чином, ідентифікація характеру функціональних зв'язків між різними генами-кандидатами, що входять до складу генної мережі є важливим завданням для дослідника.

Метою дослідження була оцінка експресії генів *HIF1A*, *eNOS*, *VEGFA* та *PIGF*, які формують регуляторну генну мережу, у плаценті вагітних із проявами залізодефіцитної анемії.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження виконане на базі пологового будинку № 2 (м. Одеса) та генетичної лабораторії клініки «Надія» (м. Київ). Обстежено 150 породіль, від яких були одержані зразки плаценти. При цьому були виділені наступні клінічні групи:

I група – плаценти від жінок з фізіологічним перебігом вагітності та пологів (n=30);

II група – плаценти від жінок з анемією вагітних в анамнезі (n=40);

III група – плаценти від жінок з дисфункцією плаценти і анемією в анамнезі (n=80).

Виділення РНК проводилось на базі Клініки репродуктивної медицини «Надія» зі зразків біоптату плаценти породіль з метою дослідження експресії генів *HIF1A* (OMIM 603348), *eNOS* (OMIM 163729), *VEGFA* (OMIM 192240) та *PIGF* (OMIM 600153).

Для цього послідовно проводились наступні процедури: відбір та проведення біопсії плаценти, виділення РНК, проведення зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу.

Проведення біопсії плаценти здійснювалось конхотомом. Фрагменти плаценти від часу взяття біоматеріалу до проведення дослідження зберігались у 10 еквівалентних об'ємах RNeasy Lysis Solution (Qiagen, USA, Cat# AM7024) за температури «-20°C».

Виділення РНК проводилося з використанням набору QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Німеччина, кат №52304) у відповідності до протоколу виробника для виділення нуклеїнових кислот з фрагментів тканин. Для цього за рекомендацією виробника проводились наступні дії:

- відмивання біоматеріалу від RNeasy Lysis Solution;
- розтирання шматочків тканини у рідкому азоті;
- гомогенізація розтертих фрагментів за допомогою центрифужних колонок QIAshredder (Qiagen, Німеччина) у лізуючому буфері;
- преципітація еквівалентним об'ємом 70% етанолу;
- сорбція РНК на центрифужних колонках QIAamp spin column (Qiagen, Німеччина) з наступною трикратною відмивкою та просушкою колонок;
- елюція РНК за допомогою вільної від рибонуклеаз води для молекулярних досліджень.

Характеристики виділеної РНК визначали з використанням NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, США) шляхом визначення показників A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230} .

Отримана РНК зберігалась при температурі «-20°C» та використовувалась для проведення зворотної транскрипції.

Зворотна транскрипція проводилась з використанням набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA, Cat# 4368814) відповідно до рекомендацій виробника. Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції містила (з розрахунку на 1 зразок): 2 мкл 10x буферу для зворотної транскрипції, 0,8 мкл 25x суміші dNTP (по 100 мМ кожного), 2 мкл 10x суміші розсіяних (випадкових) праймерів, 1 мкл зворотної транскриптази MultiScribe™, 4,2 мкл вільної від нуклеаз води для проведення ПЛР та 10 мкл виділеної РНК. Зворотна транскрипція проводилась з використанням ампліфікатору Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler

(Applied Biosystems, USA) з наступними температурними умовами: 1. 10'@25C; 2. 120'@37C; 3. 5''@85C; 4. 4C@∞. Отримана кДНК зберігалась при температурі «4-8C» та використовувалась для оцінки експресії генів.

Оцінка експресії генів проводилась з використанням пресинтезованих TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) методом відносної експресії. Використовувались наступні тест-системи для генів:

- HIF1A (OMIM 603348): Cat#4453320 – Hs00153153_m1;
- eNOS (OMIM 163729): Cat#4453320 – Hs01574659_m1;
- VEGFA (OMIM 192240): Cat# 4453320 – Hs00900055_m1;
- PIGF (OMIM 600153): Cat#4448892 – hCG1987697;
- GAPDH (OMIM 138400) – внутрішній контрольний ген: Cat# 4331182 – Hs99999905_m1.

Кожен 20x TaqMan® Gene Expression Assay містить два немічені праймера (при кінцевому 1x розведенні 900нМ на праймер, при 20x стоковій концентрації 18мкМ на праймер) та один 6-FAM™ мічений TaqMan® MGB зонд (при кінцевому 1x розведенні 250нМ, при 20x стоковій концентрації 5мкМ).

Реакційна суміш містила: 1.0 мкл 20x TaqMan® Gene Expression Assay, 10 мкл 10x TaqMan® Gene Expression Master Mix, 6мкл вільної від рибонуклеаз води для ПЛР та 3 мкл кДНК, отриманої на попередньому етапі. Ампліфікація та детекція проводилась за використання ПЛР-системи у реальному часі 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США, кат. №4351105) з програмним забезпеченням SDS 2,0,5 з наступними температурними умовами: 1.2'@50C; 2.10'@95C; 3.60x (15''@95C, 1'@60C). Зчитування даних проводилось приладом на останньому етапі кожного циклу. Аналіз результатів проводився у ручному режимі за методом за $\Delta\Delta Ct$.

Аналіз генної мережі проводили за допомогою програмного забезпечення GeneMania [8]. Статистична обробка виконана у середовищі R [10].

Результати досліджень та їх обговорення.

Клінічна картина у групах дослідження була стереотипною. Середній вік пацієток I, II та III групи склав 28,2±4,5, 31,2±6,8 й 27,2±1,8 років відповідно (p>0,05). У пацієток II групи визначалися клінічно маніфестовані ознаки залізодефіциту (залізо сироватки крові – 11,3±0,4 мкмоль/л, феритин – 11,9±1,6 нг/мл). У вагітних III групи вагітність перебігала з дисфункцією плаценти I-IIA ступеня, при чому у 11 (13,8%) пацієток гестаційний період ускладнився маловоддям, у 5 (6,3%) – низькою плацентациєю, а у 13 (16,3%) породіль виник дистрес плоду у I періоді пологів, який був показанням до оперативного розродження.

При аналізі генної мережі (рис. 1) встановлено, що до її складу увійшли гени, які контролюють синтез індукційних гіпоксії білків (родина *EGLN*), метаболізм ксенобіотиків (*ARNT*, *FLT*, *PLIN*), плацентарних факторів росту (*PGF*), стан нітрергічних систем (*NOSTRIN*), енергетичного забезпечення

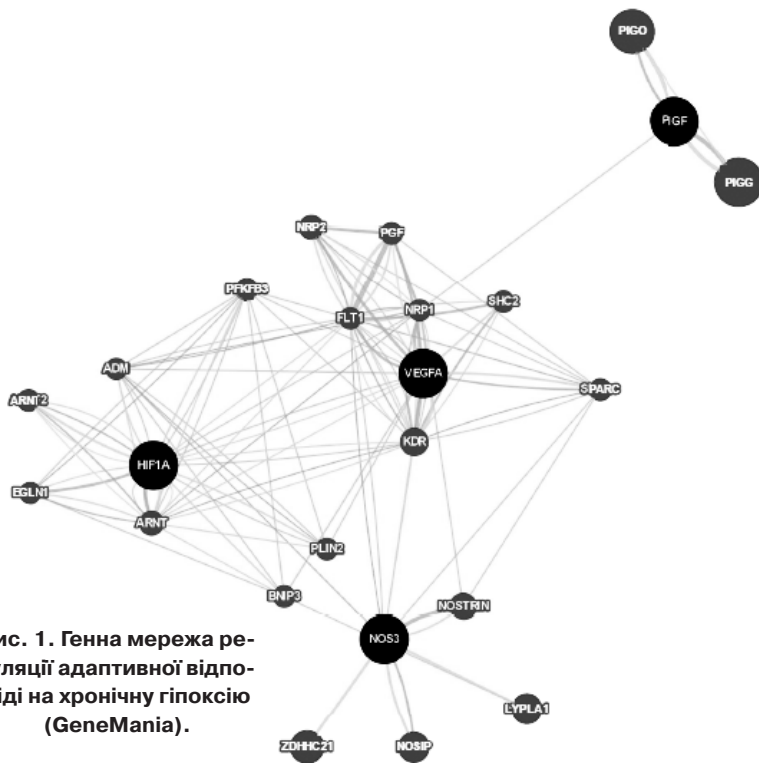


Рис. 1. Генна мережа регуляції адаптивної відповіді на хронічну гіпоксію (GeneMania).

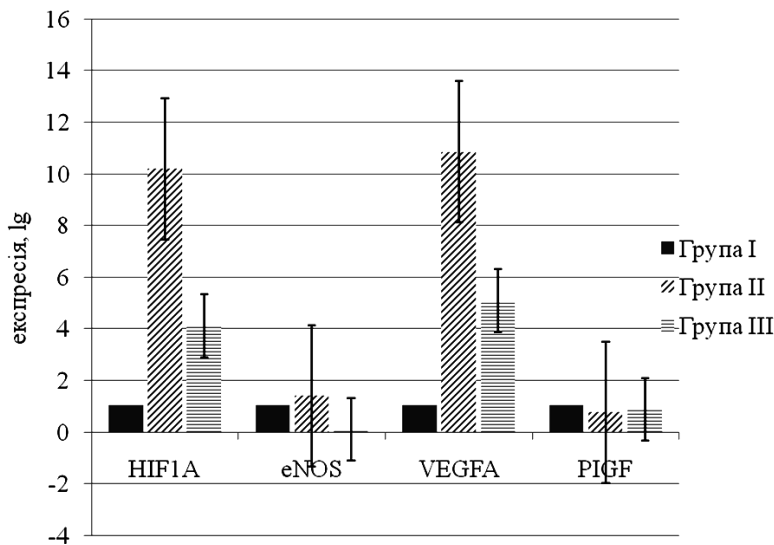


Рис. 2. Експресія генів у обстежених пацієнток.

функціонування клітин організму тощо. При цьому найбільш тісні функціональні зв'язки спостерігалися між генами *HIF1A*, *eNOS* та *VEGFA*.

Натомість, при аналізі експресії генів *HIF1A*, *eNOS*, *VEGFA* та *PIGF* встановлено (рис. 2), що

найменш виражені зміни на тлі залізодефіцитної анемії відбулися щодо експресії гену *PIGF*, тоді як активність експресії генів *HIF1A* та *VEGFA* різко збільшилася, а експресія гену *eNOS* залежала від ступеня вираженості дисфункції плаценти – при наявності даного ускладнення експресія гену різко знижувалася.

Зважаючи на те, що активність експресії генів *HIF1A* та *VEGFA* при залізодефіцитній анемії збільшувалася, відповідно, у 10,2 та 10,9 разів, менш виражений приріст експресії генів *HIF1A* та *VEGFA* у вагітних із дисфункцією плаценти, що виникла на тлі залізодефіцитної анемії, та супроводжувалася парадоксальним зниженням експресії гена *eNOS*, можна пояснити вичерпанням адаптаційних можливостей організму.

Таким чином, зміни експресії генів, залучених до генної мережі свідчать про активну адаптацію організму вагітної до хронічної гіпоксії, яка супроводжує залізодефіцитні стани. Водночас, ізольована оцінка експресії окремих генів, вочевидь, не має суттєвого значення для потреб прогнозування перебігу вагітності та її клінічних перинатальних наслідків.

Висновки.

1. Найбільш виражені зміни експресії при залізодефіцитній анемії відбулися щодо генів *HIF1A* та *VEGFA*

2. Активність експресії генів *HIF1A* та *VEGFA* при залізодефіцитній анемії збільшується у 10,2 та 10,9 разів

3. Менш виражений приріст експресії генів *HIF1A* та *VEGFA* у вагітних із дисфункцією плаценти, що виникла на тлі залізодефіцитної анемії, може пояснюватися вичерпанням адаптаційних можливостей організму.

Перспективи подальших досліджень пов'язані із оцінкою фенотипових змін продукції індукційних гіпоксії білків, як маркеру прогнозу перебігу вагітності, ускладненої залізодефіцитною анемією.

Література

1. Малоч А. В. Железодефицитные состояния и железодефицитная анемия у женщин детородного возраста / А. В. Малоч, Л. А. Анастасевич, Н. Н. Филатова // Лечащий врач. – 2013. – №04. – С. 37.
2. Семенова М. В. Состояние плаценты при железодефицитной анемии у беременных / М. В. Семенова, Е. Л. Баженов, Н. М. Канунникова, Т. В. Терехова // Морфологические ведомости. – 2007. – Т. 1, № 1-2. – С. 218-219.
3. Amel Ivan E., A. M. Evaluation of anaemia in booked antenatal mothers during the last trimester. / Amel Ivan E., A. M. // J. Clin. Diagn. Res. – 2013. – Vol. 7(11) – P. 2487-2490.

- Blackburn S. Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology. 4 edition / S. Blackburn. – N. Y. Saunders, 2012. – 768 p.
- GeneMania Database. Електронний ресурс. Режим доступу: www.genemania.org
- Pasricha S. R. Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries / S. R. Pasricha, H. Drakesmith, J. Black [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121 (14) – P. 2607-2617.
- Salomon C. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes / C. Salomon, M. Kobayashi, K. Ashman [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(11) – P. e79636.
- Tutorial R. Електронний ресурс. Режим доступу: <http://www.r-tutor.com/r-introduction>
- Vandevijvere S. Iron status and its determinants in a nationally representative sample of pregnant women / S. Vandevijvere, S. Amsalkhir, H. Van Oyen [et al.] // *J. Acad. Nutr. Diet.* – 2013. – Vol. 113(5) – P. 659-666.
- Winter W. E. The molecular biology of human iron metabolism / W. E. Winter, L. A. Bazydlo, N. S. Harris // *Lab. Med.* – 2014. – Vol. 45(2) – P. 92-102

УДК 618.36 – 06 : 616.155.194] – 056.7 – 07 – 08

ГЕННА МЕРЕЖА АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ НА ХРОНІЧНУ ГІПОКСІЮ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

Запорожан В. М., Анчева І. А.

Резюме. Метою дослідження була оцінка експресії генів *HIF1A*, *eNOS*, *VEGFA* та *PIGF*, які формують регуляторну генну мережу, у плаценті вагітних із проявами залізодефіцитної анемії.

Наведений аналіз складових генної мережі. Показано, що при залізодефіцитній анемії експресія генів *HIF1A* та *VEGFA* зростає у 10,2 та 10,9 разів, тоді як при наявності дисфункції плаценти приріст експресії є менш вираженим, що може пояснюватися вичерпанням адаптаційних можливостей організму.

Ключові слова: залізодефіцитна анемія, вагітність, генетика, адаптація.

УДК 618.36 – 06 : 616.155.194] – 056.7 – 07 – 08

ГЕННАЯ СЕТЬ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА НА ХРОНИЧЕСКУЮ ГИПОКСИЮ ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ БЕРЕМЕННЫХ

Запорожан В. Н., Анчева И. А.

Резюме. Целью исследования была оценка экспрессии генов *HIF1A*, *eNOS*, *VEGFA* и *PIGF*, формирующих регуляторную генную сеть, в плаценте беременных с проявлениями железодефицитной анемии.

Проведен анализ составляющих генной сети. Показано, что при железодефицитной анемии экспрессия генов *HIF1A* и *VEGFA* возрастает в 10,2 и 10,9 раз, тогда как при наличии дисфункции плаценты прирост экспрессии менее выраженный, что может объясняться истощением адаптационных возможностей организма.

Ключевые слова: железодефицитная анемия, беременность, генетика, адаптация.

UDC 618.36 – 06 : 616.155.194] – 056.7 – 07 – 08

Gene Network of the Adaptive Response to Chronic Hypoxia with Iron Deficiency Anemia during Pregnancy

Zaporozhan V. M., Ancheva I. A.

Abstract. A gene regulatory network or genetic regulatory network is a collection of DNA segments in a cell which interact with each other indirectly (through their RNA and protein expression products) and with other substances in the cell, thereby governing the expression levels of mRNA and proteins. In general, each mRNA molecule goes on to make a specific protein (or set of proteins).

Genetic differences in the ability to regulate iron in the placenta tissue are likely to contribute; however, identifying the underlying genes is difficult. Placenta iron regulation is highly complex, involving many genes and biochemical pathways. These genes act at multiple levels, e. g., transcriptionally and post-transcriptionally, and by different mechanisms, e. g. transport, absorption, storage, and export. Moreover, they may interact with environmental factors such as diet.

The aim of the study was to evaluate the expression of genes *HIF1A*, *eNOS*, *VEGFA* and *PIGF*, which form a gene regulatory network in the placenta of pregnant women with signs of iron deficiency anemia.

Material & Methods. The research was performed at the maternity hospital № 2 (Odessa) and Genetic Laboratories “Nadiya” (Kyiv). The study involved 150 women in labor and placenta samples were obtained from them. Thus were the following clinical groups: I group – the placenta samples of women with physiological pregnancy and childbirth (n = 30). The second group – the placenta samples of pregnant women with a history of anemia (n = 40). The third group – the placenta samples of women with placental dysfunction and a history of anemia (n = 80).

RNA analysis was conducted at the Clinic of Reproductive Medicine “Nadiya” from biopsy samples of placentas to investigate gene expression *HIF1A* (OMIM 603348), *eNOS* (OMIM 163729), *VEGFA* (OMIM 192240) and *PIGF* (OMIM 600153). For completing the analysis of gene expression there were consistently carried out the following procedures: sampling and biopsy of the placenta, the selection of RNA by the reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR) in real time.

Analysis of genetic networks was performed using the software GeneMania. Statistical analysis performed in the R environment.

Results. In the analysis of gene network revealed that its membership includes genes that control the synthesis of hypoxia inducible protein (family of EGLN), metabolism of xenobiotics (ARNT, FLT, PLIN), placental growth factor (PGF), state of nitric oxide depending regulatory systems (NOSTRIN), energy supply functioning of body cells and so on. The most strong functional relationships were observed between genes HIF1A, eNOS and VEGFA.

The analysis of gene network components determined that with iron deficiency anemia gene expression of *HIF1A* and *VEGFA* increased in 10.2 and 10.9 folds, while the presence of placental dysfunction increment expression is less pronounced, which may be due to the exhaustion of the adaptive capacity of the organism.

Thus the changes in expression of genes involved in studied genetic networks indicate active adaptation during pregnancy to chronic hypoxia that accompanies iron deficiency. However, an isolated score expression of individual genes were apparently not essential to predict the needs of pregnancy and perinatal outcomes of clinical.

Keywords: iron deficiency anemia, pregnancy, genetics, adaptation.

Рецензент – проф. Ліхачов К. В.

Стаття надійшла 14. 07. 2014 р.