



УДК 575.17

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

И.С. ПОЛЯКОВА
М.М. ЧУРНОСОВ
Н.А. ДЕМАКОВА

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: efimka_i@mail.ru

В статье изложены результаты популяционно-генетического анализа распределения полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у беременных с преэклампсией. Установлено, что распределение частот аллелей и генотипов генов CYP1B1 (rs1056836), NAT2 (rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34), ABCB (MDR1, rs1045642) находится в соответствии с законом равновесия Харди-Вайнберга, а частоты генотипов CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, +6986 G/ACYP3A5, CYP3A4 (rs2740574) отклоняются от данного равновесия.

Ключевые слова: ферменты биотрансформации ксенобиотиков, беременные с преэклампсией, популяционно-генетический анализ.

Преэклампсия занимает лидирующие позиции в патологии беременности и остается одной из наиболее актуальных проблем современного акушерства. В России преэклампсия встречается примерно у 11-16% беременных и занимает третье место среди причин материнской смертности. Высокая частота материнской и перинатальной заболеваемости и смертности объясняется отсутствием точных сведений о патогенезе преэклампсии, достоверных лабораторных методов диагностики и, как следствие этого, действенных мер профилактики и лечения [1].

Одним из важных патогенетических факторов преэклампсии считается повреждающее действие свободных радикалов на клетки и ткани эндотелия.

CYP1B1 (rs1056836), CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, NAT2 (rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34), +6986 G/ACYP3A5, ABCB (MDR1, rs1045642), CYP3A4 (rs2740574), GSTM1, GSTT1 – гены системы биотрансформации ксенобиотиков, под которой понимается ферментативное превращение чужеродных веществ (экзотоксины, лекарственные препараты, канцерогены и другое) в полярные водорастворимые метаболиты, легко выводимые из организма. Система защиты организма от ксенобиотиков представлена трехэтапным процессом и состоит из фазы активации ксенобиотиков, в которой ведущее место занимает система цитохромов P450 или CYP; фазы нейтрализации, которая осуществляется различными трансферазами и эпоксидгидролазами, и фазы выведения из организма [2]. Нередко промежуточные продукты биотрансформации могут быть более токсичными, обладать более выраженными мутагенной, канцерогенной и даже тератогенной активностями, чем исходные соединения, и вследствие этого быть причиной различных патологических состояний и болезней [3, 4]. Способность метаболизировать ксенобиотики различается у индивидов из-за наличия мутантных вариантов, снижающих или блокирующих экспрессию генов, что во многих исследованиях связывают с повышенным риском развития многих мультифакториальных заболеваний, нарушающих женское здоровье и приводящее в дальнейшем к бесплодию или невынашиванию беременности [5, 6].

Цель исследования: осуществить генотипирование и провести популяционно-генетический анализ распределения полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у беременных с преэклампсией.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 250 беременных женщин с преэклампсией. Средний возраст обследуемых женщин составил 27,80±5,46 лет (варьировал от 19 до 45 лет). В выборку включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженками Центрально-Черноземного региона России и не имеющие родства между собой. Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции.

Клинико-лабораторное и инструментальное обследование женщин проводилось на базе Перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Пациентки включались в соответствующую группу больных только после установления точного диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов исследования.

Всем женщинам проведено типирование десяти молекулярно-генетических маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков: CYP1B1 (rs1056836), CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, NAT2



(rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34), +6986 G/ACYP3A5, ABCB (MDR1, rs1045642), CYP3A4 (rs2740574), GSTM1, GSTT1.

Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. Генотипирование локусов CYP1B1 (rs1056836), CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, NAT2 (rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34), +6986 G/ACYP3A5, ABCB (MDR1, rs1045642), CYP3A4 (rs2740574) осуществлялось методом детекции TagMap зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе IQ5 с детектирующей системой в режиме реального времени. Для дискриминации аллелей использовалась программа «Bio-RadIQ5-StandartEdition». Анализ полиморфизмов генов GSTM1 и GSTT1 проводили методом полимеразной цепной реакции на амплификаторах «Терцик», электрофоретическое разделение молекул ДНК проводили в 3% агарозном геле и визуализировали в УФ-свете. Праймеры для ПЦР были выбраны внутри области делеций в генах GSTM1 и GSTT1 таким образом, чтобы обеспечивалось отсутствие синтеза соответствующего продукта ПЦР при анализе образцов ДНК с GSTM1 0/0 или GSTT1 0/0 соответственно. Для того чтобы отличить наличие гомозиготной делеции в генах GSTT1 и GSTM1 от отсутствия ДНК матрицы или ингибирования реакции ПЦР, в амплификационную смесь вводили праймеры фрагмента ДНК бета-глобина (HBB).

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программ «STATISTICA 6.0» и «Microsoft Excel 2007».

В результате генотипирования беременных с преэклампсией по гену CYP1B1 (rs1056836) выявлено преобладание генотипа CG (44,16%). Значительно реже встречался генотип GG – 17,75%. В свою очередь генотип CC наблюдали у 38,09% беременных с преэклампсией. Анализ распределения аллелей полиморфного локуса CYP1B1 показал более высокую частоту аллеля C – 60,17%. Аллель G встречается среди беременных с преэклампсией с частотой 39,83%.

Данные по генотипированию локуса CYP1A1 (rs2606345) выявили преобладание генотипа GT (42,56%) над генотипами TT (30,21%) и GG (27,23%). Анализ распределения аллелей полиморфного локуса CYP1A1 показал незначительное преобладание частоты аллеля T – 51,49% над аллелем G (48,51%).

В результате генотипирования беременных с преэклампсией по гену GSTP1 (rs947894) выявлено преобладание генотипа AA (46,38%). Значительно реже встречался генотип GG – 20,00%. В свою очередь генотип AG наблюдали у 33,62% беременных с преэклампсией. Анализ распределения аллелей полиморфного локуса GSTP1 (rs947894) показал более высокую частоту аллеля A – 63,19%. Аллель G встречается среди беременных с преэклампсией с частотой 36,81%.

В результате генотипирования беременных с преэклампсией по гену NAT2 (rs1799930) выявлено преобладание генотипа GG (50,21%). Значительно реже встречался генотип AA – 7,66%. В свою очередь генотип AG наблюдали у 42,13% беременных с преэклампсией. Анализ распределения аллелей полиморфного локуса NAT2 (rs1799930) показал более высокую частоту аллеля G – 71,28%. Аллель A встречается среди беременных с преэклампсией с частотой 28,72%.

Данные по генотипированию локуса CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34) выявили преобладание генотипа CT (53,04%) над генотипами TT (26,53%) и CC (20,43%). Анализ распределения аллелей полиморфного локуса CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34) показал незначительное преобладание частоты аллеля T – 53,04% над аллелем C (46,96%).

В результате генотипирования беременных с преэклампсией по гену +6986 G/ACYP3A5 выявлено преобладание генотипа GG (86,97%). Значительно реже встречался генотип AG – 11,77%. В свою очередь генотип AA наблюдали всего у 1,26% беременных с преэклампсией. Анализ распределения аллелей полиморфного локуса +6986 G/ACYP3A5 показал более высокую частоту аллеля A – 55,25%. Аллель G встречается среди беременных с преэклампсией с частотой 44,75%.

В результате генотипирования беременных с преэклампсией по гену ABCB (MDR1, rs1045642) выявлено преобладание генотипа CT (54,51%). Значительно реже встречались генотипы TT (30,90%) и CC (14,59%). Анализ распределения аллелей полиморфного локуса ABCB (MDR1, rs1045642) показал более высокую частоту аллеля T – 58,15%. Аллель C встречается среди беременных с преэклампсией с частотой 41,85%.

Данные по генотипированию локуса CYP3A4 (rs2740574) выявили значительное преобладание генотипа AA (90,30%) над генотипами AG (9,28%) и GG (0,42%). Анализ распределения аллелей полиморфного локуса CYP3A4 (rs2740574) показал преобладание частоты аллеля A – 54,43% над аллелем G (45,57%).

В результате генотипирования беременных с преэклампсией по гену GSTM1 выявлено преобладание генотипа с гомозиготной делецией (52,77%). Анализ распределения частот генотипов по гену GSTT1 показал значительно меньшую частоту гомозиготной делеции (-/-) – 19,15% по сравнению с частотой генотипов (+/-) и (+/+).

Результаты популяционно-генетического анализа распределения генетических полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков среди беременных с преэклампсией представлены в таблице 1.



Популяционно-генетический анализ распределения генетических полиморфизмов среди беременных с преэклампсией по гену биотрансформации ксенобиотиков CYP1B1 (rs1056836) показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,44$. Уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,48$.

Анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу CYP1A1 (rs2606345) среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,43$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,50$. По данному локусу выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга в группе беременных с преэклампсией за счет снижения фактической гетерозиготности по сравнению с теоретической ($\chi^2=5,16$, $p<0,05$), о чем свидетельствует отрицательное значение индекса фиксации ($D=-0,15$).

Популяционно-генетический анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу GSTP1 среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,34$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,47$. По данному локусу среди беременных с преэклампсией выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга за счет снижения фактической гетерозиготности по сравнению с теоретической ($\chi^2=18,08$, $p<0,001$), о чем свидетельствует отрицательное значение индекса фиксации ($D=-0,28$).

Анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу NAT2 (rs1799930) среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,42$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,41$.

Анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34) среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,53$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,50$.

Популяционно-генетический анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу +6986 G/ACYP3A5 среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,87$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,50$. По данному локусу среди беременных с преэклампсией выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга за счет высокой фактической гетерозиготности по сравнению с теоретической ($\chi^2=137,07$, $p<0,001$), о чем свидетельствует положительное значение индекса фиксации ($D=+0,76$).

Анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу ABCB (MDR1, rs1045642) среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o=0,55$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E=0,49$.

Таблица 1

Результаты популяционно-генетического анализа распределения генетических полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у беременных с преэклампсией

Полиморфизм	Популяционные показатели	Беременные с преэклампсией
1	2	3
CYP1B1 (rs1056836)	ΣN	231
	χ^2 (HWE)	1,43
	p (HWE)	>0,05
	H_o	0,44
	H_E	0,48
	D	-0,08
	t	1,11
CYP1A1 (rs2606345)	ΣN	235
	χ^2 (HWE)	5,16
	p (HWE)	<0,05
	H_o	0,43
	H_E	0,50
	D	-0,15
	t	2,29
GSTP1	ΣN	235
	χ^2 (HWE)	18,08
	p (HWE)	<0,001
	H_o	0,34
	H_E	0,47
	D	-0,28
	t	3,91
NAT2 (rs1799930)	ΣN	235
	χ^2 (HWE)	0,20
	p (HWE)	>0,05
	H_o	0,42
	H_E	0,41
	D	+0,03
	t	0,32



Продолжение табл. 1

1	2	3
CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34)	ΣN	230
	χ^2 (HWE)	0,97
	p (HWE)	>0,05
	H_o	0,53
	H_E	0,50
	D	+0,06
	t	0,98
+6986 G/ACYP3A5	ΣN	238
	χ^2 (HWE)	137,07
	p (HWE)	<0,001
	H_o	0,87
	H_E	0,50
	D	+0,76
	t	16,77
ABCB (MDR1, rs1045642)	ΣN	233
	χ^2 (HWE)	3,35
	p (HWE)	>0,05
	H_o	0,55
	H_E	0,49
	D	+0,12
	t	1,74
CYP3A4 (rs2740574)	ΣN	237
	χ^2 (HWE)	159,44
	p (HWE)	<0,001
	H_o	0,90
	H_E	0,50
	D	+0,82
	t	20,65

Популяционно-генетический анализ распределения генетических полиморфизмов по локусу CYP3A4 (rs2740574) среди беременных с преэклампсией показал, что уровень наблюдаемой гетерозиготности составил $H_o = 0,90$, уровень ожидаемой гетерозиготности составил $H_E = 0,50$. По данному локусу среди беременных с преэклампсией выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга за счет высокой фактической гетерозиготности по сравнению с теоретической ($\chi^2 = 159,44$, $p < 0,001$), о чем свидетельствует положительное значение индекса фиксации ($D = +0,82$).

Таким образом, в результате проведенного исследования протипированы 10 генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (CYP1B1 (rs1056836), CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, NAT2 (rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34), +6986 G/ACYP3A5, ABCB (MDR1, rs1045642), CYP3A4 (rs2740574), GSTM1, GSTT1) среди беременных с преэклампсией, сделан популяционно-генетический анализ распределения полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков среди беременных с преэклампсией с использованием популяционно-статистических методов (критерий χ^2 , наблюдаемый уровень гетерозиготности (H_o), ожидаемый уровень гетерозиготности (H_E), индекс фиксации Райта (D)).

Установлено, что распределение частот аллелей и генотипов генов CYP1B1 (rs1056836), NAT2 (rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T>C. Pos.-34), ABCB (MDR1, rs1045642) находится в соответствии с законом равновесия Харди-Вайнберга, а частоты генотипов CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, +6986 G/ACYP3A5, CYP3A4 (rs2740574) отклоняются от данного равновесия.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг (государственный контракт №16.740.11.0609).

Литература

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В.С. Баранова. – СПб. – 2009. – 528 с.
2. Hayes, J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – Vol.45. – P. 51-88.
3. Polonikov, A.V. The ecological toxicogenetic concept of multifactorial diseases: from understanding the etiology to clinical application / A.V. Polonikov, V.P. Ivanov, M.A. Solodilova // Medical Genetics. – 2008 Vol.7 (11) – P. 3-20.
4. Polonikov, A.V. Genetic variation of genes for xenobiotic-metabolizing enzymes and risk of bronchial asthma: The importance of gene-gene and gene-environment interactions for disease susceptibility / A.V. Polonikov, V.P. Ivanov, M.A. Solodilova // Journal of Human Genetics – 2009 – 54 (8). – P. 440-449.



5. Полоников, А.В. Эколого-токсикогенетическая концепция мультифакториальных заболеваний: от понимания этиологии до клинического применения / А. В. Полоников, В. П. Иванов, М. А. Солодилова // Медицинская генетика : ежемесячный научно-практический журнал. — 2008. — Том 7, N 11. — С. 3-20.

6. Логутова, Л.С. Современные подходы в комплексной терапии беременных с гестозом тяжелой степени / Л.С. Логутова, Н.Х. Хапий, Ж.Ю. Пырскова // Трудный пациент. — 2008. — № 1. — С. 32-37.

POPULATION GENETIC ANALYSIS OF DISTRIBUTION OF XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION ENZYMES GENES POLYMORPHISMS IN PREGNANT WOMEN WITH PRE-ECLAMPSIA

**I.S. POLYAKOVA
M.I. CHURNOSOV
N.A. DEMAKOVA**

*Belgorod National
Research University*

e-mail: efimka_i@mail.ru

The paper presents the results of the population-genetic analysis of the distribution of gene polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes in pregnant women with preeclampsia. Found that the distribution of genotypes and allele frequencies of genes CYP1B1 (rs1056836), NAT2 (rs1799930), CYP17 (5'-UTR; T> C. Pos.-34), ABCB (MDR1, rs1045642) is in accordance with the law of equilibrium of the Hardy-Weinberg, and genotype frequencies of CYP1A1 (rs2606345), GSTP1, +6986 G / A CYP3A5, CYP3A4 (rs2740574) deviate from this equilibrium.

Key words: enzymes biotransformation of xenobiotics, pregnant women with preeclampsia, population genetic analysis.