© Коллектив авторов, 2006

А.В. Шабалдин[1], О.А. Глушкова[1], О. С. Макарченко[1], Т.А. Симонова[2], П.М. Крюков[2], А.Н. Глушков[1], М.Л. Филипенко[3], Л.М. Казакова[4]

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У ЖЕНЩИН, РОДИВШИХ ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ

[1]Институт экологии человека СО РАН, [2]Областной перинатальный центр, г. Кемерово;
[3]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск;
[4]Кемеровская государственная медицинская академия, г. Кемерово, РФ

Целью настоящего исследования являлось изучение полиморфизма генов I (CYP1A1, CYP1A2) и II (GSTT1, GSTM1) фаз биотрансформации ксенобиотиков среди женщин, родивших здоровых детей и детей с врожденными пороками развития плода (ВПРП). Проведенное исследование показало, что маркерами предрасположенности к ВПРП можно считать генотип С/С CYP1A2, сочетание генотипов С/А CYP1A2 с + GSTT1 и С/А CYP1A2 с О/О GSTM1, а маркерами устойчивости к ВПРП являются генотип А/А CYP1A2, сочетания генотипов А/А CYP1A2 с О/О GSTT1 и А/А CYP1A2 с О/О GSTM1. Выявленные маркеры могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических критериев ВПРП.

Authors studied genes polymorphysm of I (CYP1A1, CYP1A2) and II (GSTT1, GSTM1) phases of xenobiotics transformation in women born healthy neonates and neonates with congenital malformations (CMF). The study showed that genotype CYP1A2 and combinations of genotypes C/A CYP1A2+ GSTM1 and 0/0 GSTM1 could be estimated as markers of predisposition to CMF forming, but genotype A/A CYP1A2 and such combinations as A/A CYP1A2+ 0/0 GSTT1 and A/A CYP1A2+ 0/0 GSTM1 were the markers of resistance to CMF forming. These markers can be used as additive diagnostic criteria of CMF.

Врожденные пороки развития плода (ВПРП) – самые тяжелые проявления нарушений раннего онтогенеза, которые вносят значимый вклад в детскую смертность и инвалидность [1, 2]. Причины формирования ВПРП разнообразны и включают генетическую несостоятельность, влияние инфекций, неблагоприятные экосистемы, в частности воздействие ксенобиотиков. Последнее особенно актуально для Кемеровской области, где сконцентрированы предприятия угольной, углеперерабатывающей, металлургической и химической промышленности, что приводит к накоплению в окружающей среде мутагенов и тератогенов, таких как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), гетероциклические амины, полихлорированные бифенилы и 2,3,7,8-тетрахлородибензо-η-диоксины [3]. Эти вещества в организме метаболизируются до безвредных соединений под воздействием ферментов детоксикации, активность которых контролируется генами CYP1A1, CYP1A2, GSTT1, GSTM1 [3]. Процесс детоксикации ксенобиотиков осуществляется сложной системой ферментов и включает две последовательные стадии (фазы). Ферменты I фазы, монооксигеназы CYP1A1 и CYP1A2, окисляют ксено- и эндобиотики, часто с образованием промежуточных генотоксических метаболитов. Ферменты II фазы, трансферазы GSTT1 и GSTM1, – превращают оксиметаболиты в водорастворимые нетоксические производные, которые и выводятся из организма [3]. Для генов, кодирующих эти ферменты, обнаружен полиморфизм, который определяет их низкую и высокую активность [4, 5]. Тем самым предполагается, что тератогенный эффект ксено- и эндобиотиков зависит от комбинации различной активности ферментов I и II фазы метаболизма.

В связи с этим нам представлялось важным изучение полиморфизма генов CYP1A1, CYP1A2, GSTT1, GSTM1 среди женщин, родивших здоровых детей и детей с ВПРП. Такого рода исследования могут выявить генетические маркеры тератогенеза, которые будут использованы для диагностики и прогнозирования ВПРП.

Материалы и методы исследования

В нашем исследовании изучали 2 группы женщин, живущих в Кемеровской области. 1-я опытная группа состояла из 136 беременных женщин, родивших детей с ВПРП. ВПРП были диагностиро-

ваны антенатально в ходе планового мониторинга, проводимого в Областном перинатальном центре г. Кемерово. Обнаруженные посредством УЗИ (аппарат Aloka 500) ВПРП распределились следующим образом: пороки ЦНС – 53 случая, из них анэнцефалия – 10, гидроцефалия – 11, менингомиелоцеле – 6, синдром Арнольда–Киари II – 8, экзэнцефалия – 2, spina bifida – 4, гидронефроз П–Ш степени – 6, гастрошизис – 6; кроме того, были пороки мочевыводящей системы – 11 случаев, сердца – 6 и множественные пороки развития плода – 6. Средний возраст женщин в этой группе составлял 30,0±3,6 года. 2-я контрольная группа состояла из 133 беременных женщин (средний возраст 29,4±2,8 года) с неосложненным акушерским анамнезом и, по крайней мере, одним живым рождением.

При сравнении опытной и контрольной групп по возрасту и частотам встречаемости наследственной отягощенности, хронической экстрагенитальной и генитальной патологии, воздействию возможных тератогенов достоверных различий не выявлено, что указывает на правомочность сравнения генетических показателей в этих группах.

Тест-системы для молекулярно-генетического анализа полиморфизма CYP1A1, CYP1A2, GSTT1 и GSTM1 разработаны совместно с ИХБФМ СО РАН.

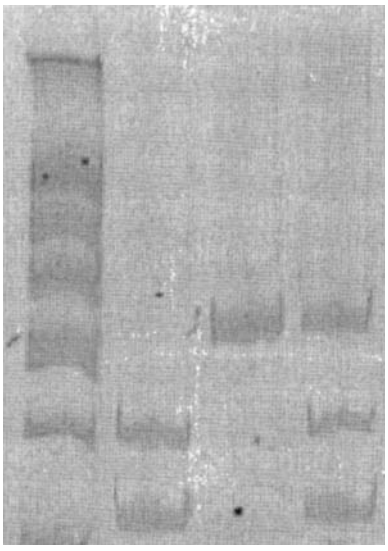
Для проведения генотипирования брали 5–10 мл венозной крови в пробирки с EDTA. Выделение ДНК проводили, используя фенол-хлороформную экстракцию [6], образцы ДНК растворяли в 10 mM Tris/1 EDTA, pH 8,0 и хранили при 4 °С.

Полиморфизм CYP1A1 связан с точковой заменой T264->C, которую можно детектировать сайт-специфической рестрикцией ферментом MspI с последующей оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [7].

Полиморфизм CYP1A2 возникает в результате точковой замены C734->A, используя фермент ApaI в ПДРФ можно обнаружить эту замену [8].

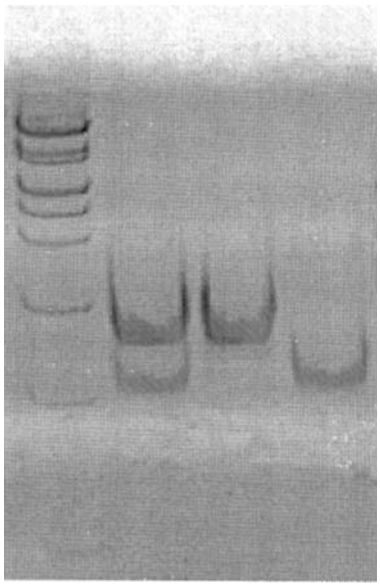
Предварительным этапом перед проведением ПДРФ являлась амплификация специфического района 1-го интрона.

Смесь для амплификации объемом 15 мкл включала 1,5 мкл 10х каждого праймера (CYP1A1 sense 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCC-3',CYP1A1 antisense 5'-GCACTTAAGCAGTCTGTTTGAG-3', и CYP1A2 sense 5'-TGAGGCTCCTTTCCAGCTCTCA-3'; CYP1A2 antisense 5'-AGAAGCTCTGTGGCCGAGAAGG-3'), 1,5 мкл 10х ПЦР буфера (10мМ трис-HCl, pH 8,3, 1,5мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl), 0,2 мМ каждого dNTP и 0,5 ед. Taq-полимеразы и 1,5 мкл геномной ДНК. ПЦР проводили при следующих температурных условиях: 3 мин – денатурации при 95 °С, за которой следовали 35 циклов амплификации в режиме 95 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин. ПЦР была терминирована при 72 °С в течение 10 мин, с последующим охлаждением до 4 °С. Амплифицированные фрагменты ДНК были смешаны с MspI (для CYP1A1) или ApaI (для CYP1A2). Продукты рестрикции анализировали в 8% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете (рис. 1).



м.в. C/C T/T T/C

а



м. в. C/A A/A C/C

б

Рис.1. Электрофореграмма продуктов амплификации CYP1A1 (а) и CYP1A2 (б) в 8% полиакриламидном геле.
Дорожки обозначены полученными генотипами. М. в. – молекулярный вес ДНК плазмиды pBluscriptSKII, гидролизованный плазмидой эндонуклеазой рестрикции MspI.

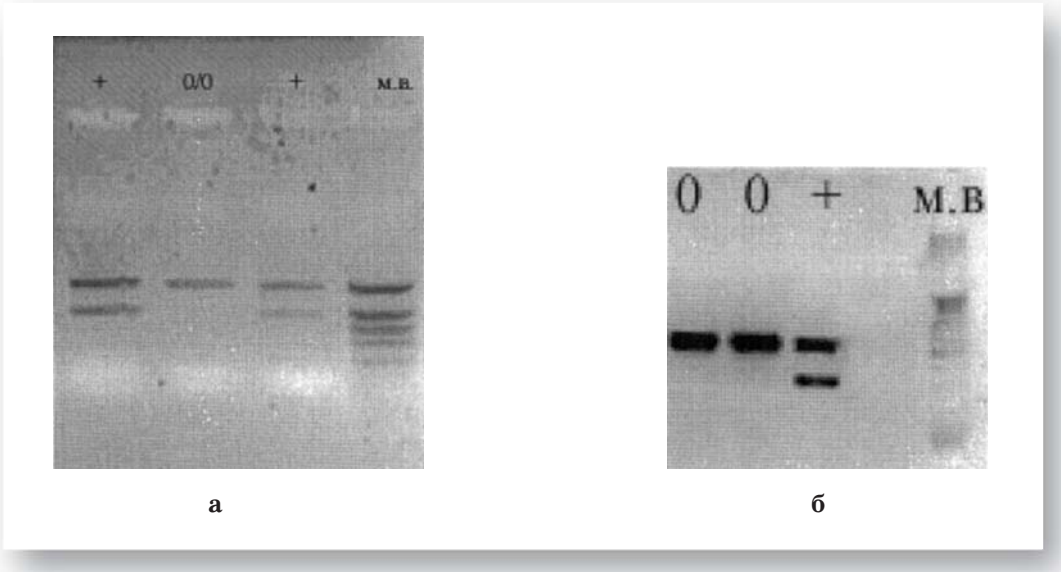


Рис.2. Электрофореграмма продуктов амплификации GSTT1 (а) и GSTM1 (б) в 1,5% агарозном геле.
Дорожки обозначены полученными генотипами. М.в. – молекулярный вес ДНК плазмиды pBluscriptSKII, гидролизованный плазмидой эндонуклеазой рестрикции Mspl.

Частоту нулевого аллеля (делеция участка гена) GSTT1 и GSTM1 исследовали методом ПЦР. Смесь для амплификации объемом 25 мкл включала 2,5 мкл 10х каждого праймера, 2,5 мкл 10х ПЦР буфера (10М трис-HCl, pH 8,3, 1,5мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl), 0,2 мМ каждого dNTP и 0,5 ед. Taq-полимеразы и 5 мкл геномной ДНК. Для амплификации фрагментов генов GSTM1(GSTM1 F GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C; GSTM1 R GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G) и GSTT1(GSTT1 F TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC; GSTT1 R TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA) использовали следующие условия ПЦР: после денатурации (95 °С, 3 мин) проводили 15 циклов амплификации в режиме 95 °С – 12 с; 65 °С – 10 с; 72 °С – 12 с; далее 20 циклов в режиме 95 °С – 7 с; 62 °С – 7 с; 72 °С – 12 с. ПЦР была терминирована при 72 °С в течение 3 мин, с последующим охлаждением до 4 °С. После амплификации анализировали продукты реакции в 1,5% агарозном геле с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете. Гомозиготы по нормальному аллелю «+» определяли по наличию на электрофореграммах продукта амплификации размером 315 н.п. для GSTT1 и фрагмента 271 н.п. для GSTM1. Отсутствие соответствующего фрагмента указывало на гомозиготность индивидуума по делеции гена [9]. В качестве внутреннего контроля использовали фрагмент гена VEG (700 н.п.) (рис. 2). Статистический анализ был выполнен при помощи MedCalc 6.0. Для выявления различий в распределении генотипов использовали точный метод Фишера. Критический уровень значимости принимали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При исследовании полиморфизма CYP1A1 для обследуемых групп была характерна высокая частота аллеля Т и низкая – С, также высокая частота генотипа Т/Т и низкая – С/С. Различий в частотах встречаемости аллелей и генотипах в контрольной и опытной группах не выявлено (табл. 1). По данным литературы, фермент CYP1A1 вовлечен в активацию основных классов проканцерогенных веществ, подобно ПАУ и ароматическим аминам, и тем самым может оказывать косвенное влияние на возникновение различной патологии, индуцированной этими соединениями. Носители мутантного аллеля С обладают более высокой активностью фермента, а дикого аллеля Т – низкой [7]. Но исходя из полученных данных, можно утверждать, что прямого влияния этого гена на формирование ВПРП нет, а значит роль детоксикации ПАУ этим ферментом не является ключевым звеном патогенеза данной репродуктивной патологии.

В табл. 2 приведены данные о распределении аллелей и генотипов гена CYP1A2. Из табл. 2 видно, что существует два аллеля (С и А), из которых А является мутантным, детерминирующим высокую активность фермента, а С (дикий аллель) – низкую [8]. При сопоставлении частот аллелей и генотипов CYP1A2 в опытной и контрольной группах выявлено следующее. Аллель С достоверно чаще встречался в группе с ВПРП по сравнению с контролем, тогда как А – достоверно реже. Гомозиготность по этим аллелям усиливала (С/С 9,56% в опыте против 3,01% в контроле, $p<0,05$) или соответственно подавляла (А/А 52,94% в опыте против 69,17% в контроле) вероятность возникновения репродуктивной патологии.

Таблица 1

Частота встречаемости аллелей и генотипов CYP1A1 в контрольной и опытной группах

Аллели	Контроль (n = 194)	ВПРП (n=164)	p<0,05	RR	EF	PF
C	10,31*	14,63	—	—	—	—
T	89,69	85,37	—	—	—	—
Генотип	Контроль (n = 97)	ВПРП (n = 82)	—	—	—	—
C/C	2,06	1,22	—	—	—	—
C/T	16,49	26,83	—	—	—	—
т/т	81,44	71,95	—	—	—	—

* Здесь и в табл. 2–5: данные представлены в %.

Исходя из литературных данных можно предположить, что лица с высокой активностью фермента (носители аллеля А) менее подвержены тератогенному влиянию ПАУ, так как эти вещества активно метаболизируются и не накапливаются в организме матери и плода. Тем самым гомозиготный генотип C/C CYP1A2 можно считать маркером предрасположенности к ПАУ-индуцированной репродуктивной патологии, а генотип A/A CYP1A2 – маркером устойчивости к ВПРП, индуцированных ПАУ.

Таблица 2

Частота встречаемости аллелей и генотипов CYP1A2 в контрольной и опытной группах

Аллели	Контроль (n = 226)	ВПРП (n=272)	p	RR	EF	PF
C	16,92	28,31	<0,05	1,93	0,14	0,56
A	83,08	71,69	<0,05	0,52	-0,67	0,56
Генотип	Контроль (n = 133)	ВПРП (n = 136)	<0,05	—	—	—
C/C	3,01	9,56	<0,05	3,15	0,07	0,73
C/A	27,82	37,50	<0,05	—	—	—
A/A	69,17	52,94	<0,05	0,44	–0,64	0,79

В настоящее время установлено, что ключевую роль во II фазе детоксикации ксенобиотиков играют глутатион-8-трансферазы (GST). Полиморфизм в этих генах связан с протяженной делецией (нулевой аллель), приводящей к полному отсутствию белкового продукта. Согласно данным литературы около 50% кавказоидной популяции и 20–30% афро-американской имеют нулевой аллель (генотип O/O) гена GSTM1. В основном, у индивидуумов с отсутствием гена уменьшается детоксикация канцерогенов, что вероятно приводит к возникновению рака [10]. По этой же аналогии могут формироваться репродуктивные нарушения. Исследование полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 у женщин, родивших детей с ВПРП, показало, что частота лиц без делеции или с делецией в гетерозиготе гена GSTT1 (+) была достоверно выше в группе ВПРП по сравнению с контролем (табл. 3) – 54,3% против 37,2% (p<0,05). Напротив, частота гомозигот O/O была достоверно выше в контроле по сравнению с опытом (62,8% и 45,7%; p<0,05).

При исследовании полиморфизма GSTM1 достоверных отличий достигнуто не было (табл. 4).

Таблица 3

Частота встречаемости генотипов GSTT1 в контрольной и опытной группах

Генотип	Контроль (n = 78)	ВПРП (n=81)	p	RR	EF	PF
+	37,2	54,3	<0,05	1,99	0,27	–0,68
0/0	62,8	45,7	<0,05	0,5	–0,45	0,68

Таблица 4

Частота встречаемости генотипов GSTM1 в контрольной и опытной группах

Генотип	Контроль (n = 75)	ВПРП (n=82)	p	RR	EF	PF
+	42,6	50,0	–	–	–	–
0/0	57,4	50,0	–	–	–	–

Исследование сочетаний генов метаболизма ПАУ I и II фазы при репродуктивной патологии и в контроле показало ряд ассоциаций (табл. 5 и 6). Для группы с ВПРП была характерна высокая частота сочетаний генотипов C/A CYP1A2 и + GSTT1 (RR = 5,99) по сравнению с контролем (23,4% в опыте против 4,1% в контроле), которые могут претендовать на маркеры чувствительности к ВПРП. В то время как сочетание таких генотипов, как A/A CYP1A2 и O/O GSTT1 (табл. 5), было достоверно выше в контроле (21,3% в опыте против 46,9% в контроле), что, вероятно, позволит назвать их маркерами устойчивости к ВПРП.

Интересен тот факт, что при изучении частот встречаемости комбинаций CYP1A2 и GSTM1 получены прямо противоположные данные. Так, маркерными генотипами для ВПРП являлись сочетания C/A CYP1A2 и O/O GSTM (табл. 6) с от-

Таблица 5

Частота комбинаций генотипов CYPA2 и GSTT1 в контрольной и опытной группах

CYP1A2	GSTT1	Контроль (n = 49)	ВПРП (n=47)	p	RR	EF	PF
C/C	+	0,0	4,3	—	—	—	—
C/C	0/0	0,0	0,0	—	—	—	—
C/A	+	4,1	23,4	<0,05	5,99	0,19	–1,03
C/A	0/0	6,1	17,0	—	—	—	—
A/A	+	42,9	34,0	—	—	—	—
A/A	0/0	46,9	21,3	<0,05	0,31	–0,46	1,48

Таблица 6

Частота комбинаций генотипов CYP1A2 и GSTM1 в контрольной и опытной группах

CYP1A2	GSTM1	Контроль (n = 5)	ВПРП (n=46)	p	RR	EF	PF
C/C	+	4,0	4,3	—	—	—	—
C/C	0/0	6,0	0,0	—	—	—	—
C/A	+	6,0	10,9	—	—	—	—
C/A	0/0	6,0	30,4	<0,05	6,05	0,25	–1,12
A/A	+	36,0	34,8	—	—	—	—
A/A	0/0	42,0	19,6	<0,05	0,35	–0,37	1,37

носительным фактором риска 6,05 (30,4% в опыте против 6% в контроле) .

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что маркерами предрасположенности к ВПРП можно считать генотип C/C CYP1A2, сочетание генотипов C/A CYP1A2 и + GSTT1, а также C/A CYP1A2 и 0/0 GSTM1, в то время как маркерами устойчивости к ВПРП являются генотип A/A CYP1A2 и сочетания генотипов A/A CYP1A2 и 0/0 GSTT1 и A/A CYP1A2 и 0/0 GSTM1. Выявленные маркеры могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических критериев ВПРП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здоровье населения и окружающая среда города Кемерово. – Кемерово, 2001.

2. *Глебова Л.А., Шабалдин А.В., Брайловский В.В. и др.* // Педиатрия. – 2004. – №6. – С. 85-87.

3. *Гуляева Л.Ф, Вавилин В.А., Ляхович В.В.* // ГПНТБ СО РАН, Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН.– Новосибирск, 2000.– 85 с.

4. *Cristoph S., Jurgen Brockmoller, Steffen Bauer S.B.* // J. Clin. Pharmacol. – 1999. – Vol. 47. – P. 445–449.

5. *Catteau A., Bechtel Y.C., Poisson N., Bechtel P.R.* // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 1995. –Vol. 5.– P. 423–430.

6. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* //Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. Cold Spring Harbor, 1989.

7. *Le Marchand L., Sivaraman L., Pierce L. et al.* // Cancer Res. – 1998. – Vol. 21. – P. 4858–4863.

8. *Cristiansen L., Bygum A., Jensen A.* // Hum. Genet. – 2000. – Vol. 107. – P. 612–614.

9. *Mahadevan M. S., Shriver M. S, Foitzik M. A. et al.* // Genomics.–1993.–Vol.15.– P. 446–448.

10. *Ford J., Li Y., O'Sullivan M. et al.* // Carcinogenesis.–2000.–Vol. 11. – P. 1971–1975.