

Аллельный полиморфизм генов ферментов метаболизма эстрогенов при генитальном эндометриозе

Кублинский К.С., Новицкий В.В., Уразова О.И.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия, e-mail: rector@ssmu.ru

С привлечением современных молекулярно-генетических методов исследования показано, что к развитию генитального эндометриоза у женщин предрасполагает носительство аллеля G и генотипов AG и GG полиморфного варианта A-4889G гена *CYP1A1*, а также аллеля A и генотипов CA и AA полиморфизма C-734A гена *CYP1A2*. Полиморфизмы промоторных регионов генов *SULT1A1* (G-638A) и *SULT1E1* (C-174T) не ассоциированы с развитием генитального эндометриоза у женщин.

Ключевые слова: генитальный эндометриоз, аллельный полиморфизм генов факторов метаболизма эстрогенов

Введение

Эндометриоз — дисгормональное, иммунозависимое, генетически детерминированное заболевание, связанное с доброкачественным разрастанием ткани, морфологически и функционально подобной эндометрию, за пределами слизистой оболочки полости матки. Входит в тройку наиболее распространенных гинекологических заболеваний, поражая каждую десятую женщину репродуктивного возраста [1, 3, 4, 6].

В развитии генитального эндометриоза важная роль принадлежит нарушениям, отвечающих за метаболизм эстрогенов ферментативных систем, в том числе генетически детерминированным, предрасполагающим к эстрогензависимой пролиферации тканей [2, 7]. В связи с этим представляется актуальным анализ аллельного полиморфизма генов, участвующих в метаболизме эстрогенов, с целью оценки возможного их вклада в этиологию и патогенез заболевания.

Цель исследования — оценить распределение аллельных вариантов генов ферментов метаболизма эстрогенов *CYP1A1*, *CYP1A2*, *SULT1A1*, *SULT1E1* при генитальном эндометриозе.

Объект и методы исследования

Проведено ретроспективное когортное контролируемое открытое параллельное исследование. В исследование были включены 529 женщин в возрасте от 21 до 40 лет (средний возраст $31 \pm 1,2$ года).

В основную группу вошли 417 пациенток, страдающих эндометриозом, которые были госпитализированы в гинекологическую клинику ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России в 2009—2012 гг. для проведения диагностической либо оперативной лапароскопии и гистероскопии. Лапароскопию и гистероскопию выполняли по стандартной методике с использованием аппаратуры фирмы «Karl Storz» (Германия).

Группу контроля составили 112 женщин без эндометриоза.

У всех женщин было получено добровольное информированное согласие на забор и использование крови для проведения исследований. Кровь для молекулярно-гене-

тических методов исследования получали из кубитальной вены в стандартных условиях (у женщин с эндометриозом утром в день операции). Стабилизированные образцы крови хранили при -70°C до момента исследования.

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору «ДНК-сорб-В».

Исследование полиморфных участков генов ферментов метаболизма эстрогенов A-4889G *CYP1A1*, C-734A *CYP1A2*, G-638A *SULT1A1* и C-174T *SULT1E1* проводили с использованием ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) в два этапа. На первом этапе проводили амплификацию фрагмента:

- гена *CYP1A1*, используя олигонуклеотидные праймеры к специфическому участку гена (forward 5'-TAG-GAG-TCT-TGT-CTC-ATG-CC-3' и reverse 5'-GCA-CTT-AAG-CAG-TCT-GTT-TGA-G-3');

- гена *CYP1A2*, используя олигонуклеотидные праймеры к специфическому участку гена (forward 5'-TGA-GGC-TCC-TTT-CCA-GCT-CTC-A-3' и reverse 5'-GAA-GCT-CTG-TGG-CCG-AGA-AGG-3');

- гена *SULT1A1*, используя олигонуклеотидные праймеры к специфическому участку гена (forward 5'-TAG-GAG-TCT-TGT-CTC-ATG-CC-3' и reverse 5'-GCA-CTT-AAG-CAG-TCT-GTT-TGA-G-3');

- гена *SULT1E1*, используя олигонуклеотидные праймеры к специфическому участку гена (forward 5'-GGT-AAG-CTG-TAC-CTG-TCA-CTC-3' и reverse: 5'-GAC-CCA-GGA-ATC-TGA-GCC-3').

Смесь для амплификации объемом 20 мкл содержала 100–200 нг ДНК, 2,5 нМ каждого праймера, 1 мМ смесь четырех dNTP, 1 мМ MgCl_2 , 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Лаборатория Медиген», г.Новосибирск) и 10 х буфер, поставляемый производителем с ферментом.

Программа амплификации включала 5 мин предварительной денатурации при 95°C и 35 циклов: 95°C — 40 с, 55°C — 15 с, 72°C — 40 с. Программу завершала элонгация при 72°C в течение 5 мин.

На втором этапе исследования проводили инкубацию ампликона с добавлением рестриктазы *MspI* (для *CYP1A1*), рестриктазы *ApaI* (для *CYP1A2*), рестриктазы *HhaI* (для *SULT1A1*) и рестриктазы *SfaNI* (для *SULT1E1*) («СибЭнзим», г.Новосибирск) при 37°C в течение 5 ч.

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей в группах исследования использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR (*odds ratio*) с расчетом для него 95% доверительного интервала.

Результаты исследования и их обсуждение

Особое внимание многих исследователей уделяется вопросам своевременной диагностики и эффективного лечения заболеваний органов репродуктивной системы. В связи с этим важное значение представляет оценка генетического риска и предрасположенности к развитию генитального эндометриоза [1, 12]. Исследования последних лет доказывают, что подверженность заболеванию зависит от определенных аллельных вариантов генов, формирующих неблагоприятный наследственный фон. Поиск маркеров предрасположенности к эндометриозу среди аллелей генов метаболизма эстрогенов — новый и перспективный раздел исследований [14].

Важную роль в поддержании гормонального баланса играет окислительный катаболизм эстрогенов, осуществляемый группой ферментов суперсемейства цитохрома P450 (CYP). Доказано участие в этом процессе таких его изоформ, как CYP1A1 (цитохром P450 1A1) и CYP1A2 (цитохром P450 1A2), катализирующих образование гидроксиметаболитов эстрогенов — 2-гидроксиэстраона (2-ОН-Е1) и 2-гидроксиэстрадиола (2-ОН-Е2), обладающих низким сродством к эстрогеновым рецепторам (ERs) [5]. Посредством другой группы ферментов — термостабильных сульфотрансфераз SULT1A1 и SULT1E1 — гидроксированные метаболиты эстрогенов подвергаются конъюгации с образованием биологически неактивного продукта — сульфатов эстрогенов. Конвертация эстрогенов в гидроксиметаболиты — один из важных механизмов регуляции процессов пролиферации в эстроген-зависимых тканях и органах. Гидроксиметаболиты обладают слабым эстрогенным действием, не оказывают пролиферативного эффекта и, связываясь с ERs, могут блокировать их [11, 13].

В результате проведенного нами молекулярно-генетического исследования установлено, что среди женщин контрольной группы превалировал генотип AA (90,74%) полиморфного участка A-4889G гена CYP1A1, реже обнаруживались генотипы AG и GG (табл. 1). У женщин с эндометриозом распределение аллелей ($\chi^2 = 36,76$; $p < 0,001$) и генотипов ($\chi^2 = 36,27$; $p < 0,001$) полиморфизма A-4889G гена CYP1A1 существенно отличалось от такового в группе сравнения. Генотип AA полиморфного участка A-4889G гена CYP1A1 у них также был преобладающим (в 58,57% случаев), однако частота генотипов AG и GG была существенно выше, чем в контрольной группе. Кроме того, выявлялась положительная ассоциация эндометриоза с аллелем G (OR = 6,11) и генотипами AG (OR = 5,53) и GG (OR = 9,26) данного полиморфизма, в то время как генотип AA (OR = 0,14) промоторного региона A-4889G гена CYP1A1 оказывал протективный эффект в отношении заболевания (табл. 1).

Полиморфный вариант A-4889G гена CYP1A1 представляет собой однонуклеотидную замену аденина на гуанин в положении 4889, результатом чего является значительное увеличение экспрессии гена и активности фермента цитохрома P450 1A1 [8]. Это может приводить к повышенному образованию как гидроксированных эстрогенов (катехолэстрогенов), так и продуктов их окисления — семихинонов и хинонов, способных присоединяться к нуклеофильным группам молекул ДНК, вызывая их повреждение [9].

Что касается полиморфизма C-734A гена CYP1A2, то у пациенток с эндометриозом, как и у женщин контрольной группы, генотип CC встречался наиболее часто — у 71,31% и 81,91% соответственно, однако распределение аллелей ($\chi^2 = 17,52$; $p < 0,001$) и генотипов ($\chi^2 = 15,19$; $p = 0,001$) данного полиморфизма у них различалось (табл. 2). Частота регистрации генотипов CA и AA полиморфизма C-734A гена CYP1A2 при эндометриозе была выше, чем в группе сравнения. Носительство аллеля A (OR = 3,66) и указанных генотипов (OR = 2,75 при генотипе CA и OR = 7,77 при генотипе AA) предрасполагало к эндометриозу, а гомозиготного генотипа CC (OR = 0,28) полиморфизма C-734A гена CYP1A2 — напротив, обуславливало протективный эффект в отношении его развития (табл. 2).

Поскольку замена цитозина на аденин в положении 734 в гене CYP1A2 опосредует высокий уровень активности цитохрома P450 1A2, можно утверждать, что снижение числа мутантного аллеля определяет более низкую

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма A-4889G гена CYP1A1 (абс., %) у женщин с эндометриозом

Генотипы и аллели полиморфизма A-4889G гена CYP1A1	Характеристика обследованных лиц		χ^2 ; p	OR (95% CI)
	Женщины без эндометриоза (n = 108)	Женщины с эндометриозом (n = 251)		
AA	98 (90,74)	147 (58,57)	36,27; <0,001	0,14 (0,07-0,30)
AG	9 (8,33)	84 (33,47)		5,53 (2,56-12,36)
GG	1 (0,93)	20 (7,97)		9,26 (1,29-187,7)
G	11 (5,09)	124 (24,70)	36,76; <0,001	6,11 (3,12-12,26)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3, 4: n — количество человек в группе. Анализ качественных независимых данных проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. p — уровень статистической значимости различий между группами. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$. OR — критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению с группой контроля с 95% доверительным интервалом.

активность данного фермента. Следствием этого является увеличение концентрации эстрогенов вследствие медленной скорости их микросомального окисления и превращения в биологически неактивные продукты метаболизма, вызывая состояние гиперэстрогении [15].

На сегодняшний день известно, что *SULT1A1* оказывает протективный эффект в отношении ДНК-повреждающего действия катехолэстрогеновых метаболитов [10]. Большинство эстрогенов может сульфонироваться в результате действия эстроновой сульфотрансферазы, или *SULT1A1*. Сульфаты эстрогенов являются биологически неактивными, т.к. не могут связываться с ERs. Снижение активности фермента приводит к повышению концентрации эстрогенов и катехолэстрогенов и, следовательно, оказывает неблагоприятное действие на гормон-чувствительные клетки женских половых органов [11].

По результатам молекулярно-генетического исследования, гомозиготный по аллелю *G* генотип полиморфизма *G-638A* гена *SULT1A1* у пациенток с эндометриозом (82,07%) и женщин без данной патологии (89,91%) встречался практически с одинаковой частотой (табл. 3). Частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного

варианта *G-638A* гена *SULT1A1* у них не имели статистически значимых различий ($\chi^2 = 2,948$; $p = 0,086$ и $\chi^2 = 3,473$; $p = 0,176$ соответственно) (табл. 3).

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *C-174T* промоторного участка гена *SULT1E1* также не выявил статистически значимых различий между контрольной и основной группами обследованных женщин ($\chi^2 = 2,013$; $p = 0,156$ и $\chi^2 = 2,564$; $p = 0,278$ соответственно) (табл. 4). Гомозиготный генотип *CC* встречался у них более чем в 80% случаев, реже выявлялись генотипы *CT* и *TT* (табл. 4).

Выводы

1. К развитию генитального эндометриоза у женщин предрасполагает носительство аллеля *G* и генотипов *AG* и *GG* полиморфного варианта *A-4889G* гена *CYP1A1*, а также аллеля *A* и генотипов *CA* и *AA* полиморфизма *C-734A* гена *CYP1A2*.

2. Полиморфизмы промоторных регионов генов *SULT1A1* (*G-638A*) и *SULT1E1* (*C-174T*) не ассоциированы с развитием генитального эндометриоза у женщин.

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *C-734A* гена *CYP1A2* (абс., %) у женщин с эндометриозом

Таблица 2

Генотипы и аллели полиморфизма <i>C-734A</i> гена <i>CYP1A2</i>	Характеристика обследованных лиц		χ^2 ; p	OR (95% CI)
	Женщины без эндометриоза (n = 108)	Женщины с эндометриозом (n = 251)		
CC	97 (89,81)	179 (71,31)	15,19; 0,001	0,28 (0,13-0,58)
CA	10 (9,26)	55 (21,91)		2,75 (1,29-6,02)
AA	1 (0,93)	17 (6,77)		7,77 (1,07-158,7)
A	12 (5,56)	89 (17,73)	17,52; <0,001	3,66 (1,90-7,22)

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *G-638A* гена *SULT1A1* (абс., %) у женщин с эндометриозом

Таблица 3

Генотипы и аллели полиморфизма <i>G-638A</i> гена <i>SULT1A1</i>	Характеристика обследованных лиц		χ^2 ; p	OR (95% CI)
	Женщины без эндометриоза (n = 108)	Женщины с эндометриозом (n = 251)		
GG	97 (89,81)	206 (82,07)	3,473; 0,176	0,52 (0,24-1,09)
GA	9 (8,33)	38 (15,14)		1,96 (0,87-4,55)
AA	2 (1,85)	7 (2,79)		1,52 (0,28-10,77)
A	13 (6,02)	52 (10,36)	2,948; 0,086	1,80 (0,93-3,57)

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *C-174T* гена *SULT1E1* (абс., %) у женщин с эндометриозом

Таблица 4

Генотипы и аллели полиморфизма <i>C-174T</i> гена <i>SULT1E1</i>	Характеристика обследованных лиц		χ^2 ; p	OR (95% CI)
	Женщины без эндометриоза (n = 108)	Женщины с эндометриозом (n = 251)		
CC	94 (87,04)	201 (80,08)	2,564; 0,278	0,60 (0,30-1,18)
CT	11 (10,19)	41 (16,33)		1,72 (0,81-3,73)
TT	3 (2,78)	9 (3,59)		1,30 (0,32-6,19)
T	17 (7,87)	59 (11,75)	2,013; 0,156	1,56 (0,86-2,86)

Список литературы

1. Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы: Руководство для врачей. 2-е изд. — М.: Медицина, 2006. — 416 с.
2. Артымук Н.В., Гуляева Л.Ф., Зотова О.А., Хвостова Е.П. Полиморфизм генов метаболизма эстрогенов у женщин с аденомиозом // Журнал акушерства и женских болезней. — 2012. — № 6. — С. 18–24.
3. Богуславская Д.В., Lebovic D.I. Эндометриоз и бесплодие (обзор литературы) // Проблемы репродукции. — 2011. — № 2. — С. 69–73.
4. Дамиров М.М. Современная тактика ведения больных с аденомиозом: практическое руководство. — М.: Изд-во БИНОМ, 2015. — 112 с.
5. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 1. — С. 8–12.
6. Марченко Л.А., Ильина Л.М. Современный взгляд на отдельные аспекты патогенеза эндометриоза (обзор литературы) // Проблемы репродукции. — 2011. — № 1. — С. 60–66.
7. Проданчук Н.Г., Балан Н.Г. Токсическое воздействие ксенобиотиков на стволовые клетки как фактор риска развития обшесоматической и онкологической патологии // Современные проблемы токсикологии. — 2010. — № 1. — С. 17–41.
8. Сальникова Л.Е., Замулаева И.А., Белопольская И.В. и др. Встречаемость TRC-мутантных лимфоцитов у человека в зависимости от генотипов по локусам детоксикации ксенобиотиков // Экологическая генетика человека. — 2010. — Т.8, № 2. — С. 18–23.
9. Hayashi S.I., Watanabe J., Nakashi K., Kawajiri K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene // Nucleic Acids Res. — 2009. — Vol. 15. — P. 97–118.
10. Li K., Ren Y.W., Wan Y., Yin Z.H., Wu W., Zhou B.S. SULT1A1 Arg213 His polymorphism and susceptibility of environment-related cancers: a meta analysis of 5,915 cases and 7,900 controls // Mol. Biol. Rep. — 2011. DOI: 10.1007/s11033-011-1012-y
11. Lindsay J., Wang L.L., Li Y., Zhou S.F. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases // Curr. Drug Metab. — 2008. — Vol. 7, № 2. — P. 99–105.
12. Stefansson H., Gerisson R.T., Steinhorsdottir V. et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis // Human Reproduction. — 2002. — Vol. 17. — P. 555–559.
13. Theodoras N., Sergentanis Konstantinos P. Economopoulos polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene and breast cancer risk: meta-analysis // Breast Cancer. Res. Treat. — 2010. — Vol. 122. — P. 459–469.
14. Tempfer C.B., Simoni M., Destenaves B., Fauser B.C. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders // Human Reproduction. — 2009. — Vol. 15. — P. 97–118.
15. Uslu A., Ogun C., Ozdemir T., Bilgen T., Tosun O., Keser I. The effect of CYP1A2 gene polymorphisms on Theophylline metabolism and chronic obstructive pulmonary disease in Turkish patients // BMB Rep. — 2010. — Vol. 43, № 8. — P. 530–534.

Поступила 08.08.2015

References

1. Adamjan L.V., Kulakov V.I., Andreeva E.N. Jendometriozy: Rukovodstvo dlja vrachej. 2-e izd. — M.: Medicina, 2006. — 416 s.
2. Artyumuk N.V., Guljaeva L.F., Zotova O.A., Hvostova E.P. Polimorfizm genov metabolizma jestrogenov u zhenshhin s adenomiozom // Zhurnal akusherstva i zhenskih boleznej. — 2012. — № 6. — S. 18–24.
3. Boguslavskaja D.V., Lebovic D.I. Jendometrioz i besplodie (obzor literatury) // Problemy reprodukcii. — 2011. — № 2. — S. 69–73.
4. Damirov M.M. Sovremennaja taktika vedenija bol'nyh s adenomiozom: prakticheskoe rukovodstvo. — M.: Izd-vo BINOM; 2015. — 112 s.
5. Kulinskij V.I. Obezvrezhivanie ksenobiotikov // Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal. — 1998. — № 1. — S. 8–12.
6. Marchenko L.A., Il'ina L.M. Sovremennyy vzgljad na otdel'nye aspekty patogeneza jendometriozia (obzor literatury) // Problemy reprodukcii. — 2011. — № 1. — S. 60–66.
7. Prodanchuk N.G., Balan N.G. Toksicheskoe vozdejstvie ksenobiotikov na stvolovye kletki kak faktor riska razvitija obshhesomatischej i onkologicheskoj patologii // Sovremennye problemy toksikologii. — 2010. — № 1. — S. 17–41.
8. Sal'nikova L.E., Zamulaeva I.A., Belopol'skaja I.V. i dr. Vstrec haemost' TRC-mutantnyh lifocitov u cheloveka v zavisimosti ot genotipov po lokusam detoksikacii ksenobiotikov // Jekologicheskaja genetika cheloveka. — 2010. — T.8, № 2. — S. 18–23.
9. Hayashi S.I., Watanabe J., Nakashi K., Kawajiri K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene // Nucleic Acids Res. — 2009. — Vol. 15. — P. 97–118.
10. Li K., Ren Y.W., Wan Y., Yin Z.H., Wu W., Zhou B.S. SULT1A1 Arg213 His polymorphism and susceptibility of environment-related cancers: a meta analysis of 5,915 cases and 7,900 controls // Mol. Biol. Rep. — 2011. DOI: 10.1007/s11033-011-1012-y
11. Lindsay J., Wang L.L., Li Y., Zhou S.F. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases // Curr. Drug Metab. — 2008. — Vol. 7, № 2. — P. 99–105.
12. Stefansson H., Gerisson R.T., Steinhorsdottir V. et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis // Human Reproduction. — 2002. — Vol. 17. — P. 555–559.
13. Theodoras N., Sergentanis Konstantinos P. Economopoulos polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene and breast cancer risk: meta-analysis // Breast Cancer. Res. Treat. — 2010. — Vol. 122. — P. 459–469.
14. Tempfer C.B., Simoni M., Destenaves B., Fauser B.C. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders // Human Reproduction. — 2009. — Vol. 15. — P. 97–118.
15. Uslu A., Ogun C., Ozdemir T., Bilgen T., Tosun O., Keser I. The effect of CYP1A2 gene polymorphisms on Theophylline metabolism and chronic obstructive pulmonary disease in Turkish patients // BMB Rep. — 2010. — Vol. 43, № 8. — P. 530–534.

Received 08.08.2015

Allelic Polymorphism of the Genes of Estrogen Metabolism Enzymes in case of Genital Endometriosis

Kublinskiy K.S., Novitskiy V.V., Urazova O.I.

Siberian State Medical University, Russia, 634050, Tomsk, 2 Moskovskytrakt, e-mail: rector@ssmu.ru

Up-to-date molecular genetic research methods have revealed that women predisposed to genital endometriosis possess Allele G and Genotypes AG and GG of the polymorphic option 4889G of the CYP1A1 gene as well as Allele A and Genotypes CA and AA of the polymorphic option C-734A of the CYP1A2 gene. The polymorphism of the promoter regions of the SULT1A1 (G-638A) and SULT1E1 (C-174T) genes is not associated with genital endometriosis in women.

Key words: genital endometriosis, allelic polymorphism of the genes of estrogen metabolism enzymes