

К.С. Красильникова¹, Е.Г. Поленок¹, Т.П. Аносова¹, М.П. Аносов¹, Л.А. Гордеева¹,
О.А. Глушкова¹, О.С. Попова¹, И.В. Шаталина¹, М.В. Костянко¹, Л.С. Равинг², А.Н. Глушков¹

АССОЦИАЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА НА КСЕНО- И ЭНДОБИОТИКИ И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ ИХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ ПЛОДА

¹ Институт экологии человека Сибирского отделения РАН (Кемерово)
² ГКБ № 1 им. М.Н. Горбуновой, женская консультация № 1 (Кемерово)

Выявлена взаимосвязь иммунного ответа на бензо[а]пирен и прогестерон в сочетании с полиморфизмом генов ферментов детоксикации (CYP1A2*1F и GSTT1) и возникновения врожденных пороков развития плода. Показано, что при высоких значениях соотношения IgA-антител к бензо[а]пирену и прогестерону в сочетании с мутантным аллелем гена CYP1A2*1F и делеционным генотипом гена GSTT1 шанс развития репродуктивной патологии увеличивается в 41 раз.

Ключевые слова: антитела к бензо[а]пирену, генетический полиморфизм, врожденные пороки развития плода

THE ASSOCIATION OF IMMUNE RESPONSE TO XENO- AND ENDOBIOTIKS AND THEIR BIOTRANSFORMATION ENZYME GENE POLYMORPHISM WITH CONGENITAL MALFORMATIONS OF THE FETUS

K.S. Krasilnikova¹, E.G. Polenok¹, T.P. Anosova¹, M.P. Anosov¹, L.A. Gordeyeva¹,
O.A. Glushkova¹, O.S. Popova¹, I.V. Shatalina¹, M.V. Kostyanko¹, L.S. Raving²,
A.N. Glushkov¹

¹ Institute of Human Ecology SB RAS, Kemerovo

² Clinical Hospital No. 1 named after M.N. Gorbunova, maternity consulting centre No. 1, Kemerovo

The correlation between immune response to benzo(a)pyrene and progesterone in combination with detoxification enzyme gene polymorphism (CYP1A2*1F and GSTT1) and the occurrence of congenital malformations of the fetus was revealed. It is shown that at high ratio of IgA-antibodies to benzo(a)pyrene and to progesterone in conjunction with the mutant allele of the gene CYP1A2*1F and the deletion genotype of the gene GSTT1 chance of the reproductive pathology developing increases to 41 times.

Key words: antibodies to benzo(a)pyrene, a genetic polymorphism, congenital fetal malformations

За последние десятилетия в дородовой профилактике и диагностике врожденных пороков развития плода (ВПП) достигнуты большие успехи. Однако, генетическая гетерогенность и мультифакторная этиология затрудняет детекцию данной патологии. В России ВПП занимают второе место в структуре младенческой смертности, составляя в среднем 20,3 % смертей [8]. Высокая частота пороков развития, высокий удельный вес данной патологии в структуре причин младенческой смертности, детской заболеваемости и инвалидности делает актуальным разностороннее изучение ВПП.

Факторы, влияющие на атипичное внутриутробное развитие плода, делят на две группы в соответствии с путем их воздействия: экзогенные и эндогенные. Многие авторы отмечают, что под воздействием химических веществ развивается нарушение фетоплацентарного комплекса на органном, клеточно-тканевом и субклеточном уровнях, что способствует возникновению спонтанных аборт, мертворожденных и ВПП [11]. Доказана тератогенная активность полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), в частности, бензо[а]пирена (Вр) [12] и его аддуктов с макромолекулами организма [16].

Состояние эндокринной системы матери во многом определяет развитие плода. Недостаток или избыток различных стероидных гормонов, необходимых для возникновения и развития физиологической беременности, играют в данном случае одну из главных ролей. Прогестерон (Pg) является основным гормоном беременности, необходим для трансформации эндометрия в децидуальную ткань и подготовки к имплантации эмбриона, способствует росту и васкуляризации миометрия, снижает его тонус и возбудимость. Pg-индуцированный блокирующий фактор обеспечивает иммунологическую толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону и локальный гемостаз в эндометрии [15]. Существуют публикации, в которых показана связь между увеличением анти-Pg антител (АТ) и возникновением привычного невынашивания беременности [1, 10]. В работах Т.А. Заманской отмечается уменьшение уровня прогестерона при ВПП [6].

Также к эндогенным факторам, влияющим на формирование ВПП, стоит отнести полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков [4]. В связи со схожестью химической структуры ПАУ и стероидные гормоны вовлечены в схожие метаболические циклы, где из химически инертных веществ в первой фазе биотрансформации при

помощи суперсемейства цитохромов P450 (*CYP*) образуются реакционноспособные метаболиты. Активация большинства ПАУ осуществляется ферментом *CYP1A2*1F*. У людей индивидуальная вариабельность в активности фермента обусловлена наличием значительного числа полиморфизмов в структуре гена. Установлены полиморфизмы в гене *CYP1A2*, детерминирующие высокую и низкую активность фермента. Окисленные активированные соединения обладают генотоксическими свойствами за счет образования аддуктов с ДНК. Аддукты с макромолекулами инициируют выработку специфических АТ [7], роль которых до сих пор до конца не ясна. Глутатион-S-трансфераза (*GST*) – фермент II фазы биотрансформации, функция которого заключается в присоединении активных метаболитов к глутатиону, тем самым нейтрализуются продукты, наработанные в первой фазе и облегчается выведение образовавшихся комплексов из организма. *GSTT1* наряду с детоксификацией ПАУ участвует в биосинтезе биологически активных веществ, в том числе и стероидных гормонов [14]. Отсутствие его функциональной активности связано с обширными делециями в гене *GSTT1*.

Предполагается, что в раннем онтогенезе формируется баланс в системе иммунохимической адаптации организма к низкомолекулярным ксено- и эндобиотикам, обеспечивающий физиологическое течение беременности и развитие плода и новорожденного. Дисбаланс может приводить к возникновению ВПРП или другим нарушениям репродуктивной функции [13].

Цель работы: выявить взаимосвязь между уровнями антител к Вр и Рг (АТ-Вр и АТ-Рг) и полиморфизмом генов *CYP1A2*1F* и *GSTT1* у женщин с врожденными пороками развития плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 260 беременных женщин. 95 женщинам по результатам ультразвукового обследования был поставлен диагноз ВПРП. В соответствии с Международной классификацией болезней (МКБ-10: Q00 – Q99) выявлена следующая структура врожденной аномалии: пороки сердечно-сосудистой системы – 23,25 %, моче-выделительной системы – 20,7 %, патология ЦНС – 18,3 %, пороки костно-мышечной системы – 15,8 %, множественные ВПРП – 12,2 %, а также присутствовали другие пороки развития – 9,75 %, среди которых пороки желудочно-кишечного тракта, пороки моче-половой системы, порок пуповинной трубки. 165 беременных женщин с физиологическим течением беременности (ФБ) вошли в группу сравнения. Средний возраст в обеих группах составил $26,1 \pm 0,7$ года. Все женщины находились на 12 – 26 неделях беременности (II триместр). Состояние здоровья оценивалось на основе медицинских карт.

АТ к Вр и Рг определяли методом неконкурентного ИФА в собственной модификации [2]. Уровень АТ, специфичных к ксено- и эндобиотикам, определяли по формулам:

$$AT-Vp = (OD_{(Bp-BSA)} - OD_{(BSA)}) / OD_{(BSA)};$$

$$AT-Pg = (OD_{(Pg-BSA)} - OD_{(BSA)}) / OD_{(BSA)}$$

где OD – значение оптической плотности в соответствующих лунках,

Таким образом, уровень АТ к Вр и Рг показывает, во сколько раз специфическое связывание АТ с ксенобиотиком и эндобиотиком превышает неспецифическое связывание с белком-носителем.

Соотношение уровней АТ ксенобиотик/эндобиотик рассчитывали по формуле:

$$AT-Vp/Pg = (OD_{(Bp-BSA)} - OD_{(BSA)}) / (OD_{(Pg-BSA)} - OD_{(BSA)}).$$

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Используемые тест-системы для молекулярно-генетического анализа SNP-полиморфизма гена *CYP1A2* (-163 A -> C) и полиморфизма *GSTT1* были разработаны в ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск). Исследование полиморфизма *CYP1A2*1F* проводили с помощью ПЦР/ПДРФ анализа. Типирование гена *GSTT1* проводилось методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени [3]. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. С использованием критерия Шапиро – Уилка был выявлен ненормальный характер распределения выборки и в дальнейшем оценку статистической значимости различий между группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манн-Уитни и критерия χ^2 с поправкой Йетса для непрерывной вариации. Отношение шансов (OR) рассчитывали по методу [5] с доверительным интервалом (CI) при 95 % уровне значимости. Нами была применена поправка Бонферрони для исключения статистических ошибок при множественных сравнениях. Отличия между группами считали статистически значимыми, если экспериментально установленный уровень значимости был меньше уровня значимости по Бонферрони: $p < 0,05/m$, где m – количество независимых статистических тестов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании показано, что сочетание генотипов *C/A + C/C CYP1A2* и *GSTT1 «+»* имеет статистически значимое отличие по критерию χ^2 между группами ВПРП и ФБ, что также отражено в работе Гордеевой Л.А. с соавторами [3]. Такое сочетание более чем в 1,5 раза чаще наблюдалось у женщин с физиологическим течением беременности (табл. 1). Шанс возникновения патологии в данном случае 0,48, в то время как шанс иметь физиологическую беременность при таких генотипах увеличивается в 2 раза. При других сочетаниях полиморфизмов генов *CYP1A2*1F* и *GSTT1* статистически значимые отличия между группами по критерию χ^2 не выявлены.

В результате проведенного исследования у женщин с ВПРП и женщин с ФБ выявлены АТ классов А, G и М к Вр и Рг. Ранее показано, что повышенные показатели соотношения уровней АТ

Таблица 1

Частота встречаемости полиморфизмов генов биотрансформации, соотношений уровней антител к ксено- и эндобиотикам и их сочетаний при физиологической беременности (ФБ) и при врожденных пороках развития плода (ВПП)

Полиморфизмы генов биотрансформации, соотношения АТ Вр/Рг, их сочетание	ФБ (%)	ВПП (%)	χ^2 ; p (p _{corr})	OR (95 % CI) для ВПП/ OR (95 % CI) для ФБ
C/A+C/C CYP1A2, GSTT1 «+»	37,5	22,3	5,7; 0,001 (0,008)	0,48 (0,18–1,2)/ 2,06 (0,8–5,3)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT «0»,	10,9	19	2,7; 0,09 (0,36)	
A/A CYP1A2, GSTT1 «+»	40,6	36,3	0,001; 0,94 (3,76)	
A/A CYP1A2, GSTT1 «0»	10,9	19	2,7; 0,09 (0,36)	
IgA Вр/Рг ≥ 2	29,3	75,6	40,5; 0,00002 (0,00016)	7,3 (2,7–19,1)/ 0,14 (0,05–0,36)
IgG Вр/Рг ≥ 3	15,4	42,6	17,4; 0,00007 (0,00056)	4,01 (1,5–10,5)/ 0,25 (0,1–0,6)
IgM Вр/Рг ≥ 2	45,5	82,9	27,2; 0,00001 (0,00008)	6,2 (2,4–16)/ 0,24 (0,09–0,6)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT1 «+», IgA Вр/Рг ≥ 2	5,4	19,1	16,6; 0,00011 (0,00088)	3,98 (1,5–10,2)/ 0,25 (0,09–0,6)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT1 «+», IgA Вр/Рг < 2	32,1	3,2	27,8; 0,000001 (0,000008)	0,08 (0,03–0,2) / 12,43 (4,8–31,9)
A/A CYP1A2, GSTT1 «+», IgA Вр/Рг ≥ 2	12,7	27,6	8,01; 0,0014 (0,0112)	2,6 (1,1–6,3)/ 0,38 (0,15–0,98)
A/A CYP1A2, GSTT «+», IgA Вр/Рг < 2	27,8	11,7	8,2; 0,0004 (0,0032)	0,35 (0,13–0,9)/ 2,8 (1,1–7,3)
A/A CYP1A2, GSTT1 «0», IgA Вр/Рг ≥ 2	0	10,6	15,5; 0,0001 (0,0008)	41,13 (15,9–105,7)/ 0,02 (0,009–0,06)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT «+», IgG Вр/Рг < 3	26,7	13,8	7,43; 0,0016 (0,012)	0,39 (0,15–0,9)/ 2,57 (1,1–6,6)
A/A CYP1A2, GSTT «0», IgM Вр/Рг ≥ 2	1,8	12,7	11,22; 0,0008 (0,0064)	7,2 (2,77–18,28)/ 0,14 (0,06–0,36)
C/A+C/C CYP1A2, GSTT «+», IgM Вр/Рг < 2	29	4,3	21,5; 0,000001 (0,000008)	0,12 (0,05–0,3)/ 8,3 (3,2–21,3)

(IgA Вр/Рг ≥ 2; IgG Вр/Рг ≥ 3; IgM Вр/Рг ≥ 2) значительно чаще наблюдались у женщин с ВПП. При их наличии шанс возникновения патологии беременности значительно возрастает (OR = 7,3; CI 2,7–19,1; OR = 4,0; CI 1,5–10,5 и OR = 5,6; CI 2,1–14,7 соответственно) [9].

В настоящем исследовании нами выявлено возрастание шансов возникновения ВПП при сочетании различных полиморфизмов генов I и II фазы детоксикации и повышенных значений АТ Вр/Рг.

При относительно благополучном сочетании генотипов C/A + C/C CYP1A2, GSTT1 «+» и наличии повышенного значения IgA Вр/Рг ≥ 2 шанс развития репродуктивной патологии возрастает почти в 4 раза (табл. 1). В то же время сочетание данных генотипов с пониженным показателем IgA Вр/Рг < 2 чаще наблюдалось у женщин с физиологическим течением беременности и увеличивает шанс на беременность без патологии более чем в 12 раз.

Другое относительно благополучное сочетание генотипов A/A CYP1A2, GSTT1 «+» с повышенным значением IgA Вр/Рг ≥ 2 значительно чаще наблюдалось в группе с ВПП и способствует возрастанию шанса на возникновение патологии. В то время как сочетание данных генотипов с пониженным значением IgA – АТ увеличивает шанс на благоприятное течение беременности почти в 3 раза.

Максимальный риск возникновения ВПП наблюдается при наличии относительно благополучного сочетания генотипов A/A CYP1A2, GSTT1 «0» и повышенного показателя IgA Вр/Рг ≥ 2.

Данное сочетание было выявлено у 10,6 % женщин группы с ВПП и отсутствовало у женщин с ФБ. Шанс возникновения ВПП увеличивался более чем в 41 раз. Другие сочетания полиморфизмов генов и уровней IgA-АТ не дали достоверных различий по частоте обнаружения в группах контроля и с ВПП.

При сочетании IgG-АТ и полиморфизмов генов CYP1A2 и GSTT1 достоверная разница по критерию χ^2 имела место лишь в одном случае – при наличии у женщин C/A + C/C CYP1A2, GSTT1 «+» и IgG Вр/Рг < 3. Данное сочетание выявлялось в 26,7 % случаев физиологической беременности и в 13,8 % случаев с ВПП. Шанс вынашивания ФБ при этом увеличивается в 2,5 раза. Остальные сочетания полиморфизмов генов с показателями IgG-АТ были статистически не достоверными.

IgM-АТ в совокупности с полиморфизмом генов CYP1A2 и GSTT1 давали статистически значимые результаты по критерию χ^2 в двух случаях: явно неблагоприятное сочетание генотипов A/A CYP1A2, GSTT1 «0» и повышенного показателя IgM Вр/Рг ≥ 2, как и ожидалось, чаще выявлялось в группе с ВПП и увеличивает шанс на развитие ВПП более чем в 7 раз. В то время как пониженный показатель IgM Вр/Рг < 2 совместно с явно благополучным сочетанием генотипов C/A + C/C CYP1A2, GSTT1 «+» обнаружен чаще в группе сравнения и увеличивает шанс на вынашивание ФБ более чем в 8 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые выявлены взаимосвязи генетических полиморфизмов ферментов биотрансформации низкомолекулярных ксено- и эндобиотиков и уровней соответствующих специфических АТ при ВПРП. Это подтверждает ранее высказанное предположение о дисбалансе в системе иммунохимического гомеостаза, как одной из причин тератогенеза. Раскрытие механизмов такого дисбаланса требует дальнейших более детальных исследований. В то же время очевидно, что молекулярно-генетический анализ в сочетании с определением уровней АТ к химическим канцерогенам и стероидным гормонам расширяет возможности ранней диагностики ВПРП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гладкова К.А., Менжинская И.В., Сухих Г.Т., Сидельникова В.М. Роль сенсбилизации к прогестерону в клинике первичного невынашивания беременности // Проблемы репродукции. — 2007. — № 6. — С. 95–98.
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А. и др. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Рос. иммунол. журн. — 2011. — Т. 5, № 1. — С. 39–44.
3. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Ермоленко Н.А., Попова О.С. и др. Сочетание материнских полиморфизмов *CYP1A2*F* и *GST* при врожденных пороках развития у плода и новорожденного // Мед. генетика. — 2011. — № 11. — С. 9–15.
4. Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. — Новосибирск, 2000. — Вып. 57. — 83 с. (серия «Экология»)
5. Двойрин В.В. Методы эпидемиологических исследований при злокачественных опухолях. — М.: Медицина, 1975. — 100 с.
6. Заманская Т.А. Неинвазивный пренатальный мониторинг в снижении перинатальных потерь: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — 2009. — 46 с.

7. Ковалев И.Е., Шипулина Н.В. Иммунохимические механизмы адаптации организма к окружающей среде // Известия РАН. — 1992. — № 1. — С. 31–41. (серия биологическая)

8. Корсунский А.А. Младенческая смертность в Российской Федерации. Пути снижения (изложение доклада на коллегии МЗ РФ 09.01.2001) // Педиатрия. — 2001. — № 2. — С. 5.

9. Красильникова К.С., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Аносов М.П. и др. Образование антител к ксено- и эндобиотикам при врожденных пороках развития плода // Мед. иммунология. — 2011. — Т. 13, № 4–5. — С. 425–426.

10. Менжинская И.В., Гладкова К.А., Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Антипрогестероновые антитела в клинике первичных потерь беременности // Иммунология. — 2008. — № 1. — С. 34–37.

11. Новикова И.И., Оглезнев Г.А., Ляпин В.А. Социально-гигиенические и экологические аспекты сохранения популяционного здоровья детей и подростков // Здоровье населения и среда обитания. — 2005. — № 6. — С. 4–12.

12. Фетцер Д.К. Химия и анализ полициклических ароматических углеводородов. — Нью-Йорк: Виллей, 2000. — 215 с.

13. Glushkov A.N. Immunological mechanisms of adaptation to the low-weight chemical compounds in ontogenesis // Medical Hypotheses. — 2003. — Vol. 61, N 3. — P. 405–411.

14. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione Transferases // Annual Review Pharmacology and Toxicology. — 2005. — Vol. 45. — P. 51–88.

15. Szekeres-Bartho J., Par G., Szereday L., Smart C.Y. et al. Progesterone and non-specific immunological mechanisms in pregnancy // American Journal Reproduction of Immunology. — 1997. — Vol. 38. — P. 176–182.

16. Weinstein J.B., Jeffrey A.M., Jennette K.W. Benzo[a]pyrene diolepoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo // Science. — 1976. — Vol. 12. — P. 193.

Сведения об авторах

Аносов Михаил Петрович – научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН
Аносова Татьяна Петровна – научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН
Глушков Андрей Николаевич – директор ИЭЧ СО РАН, доктор медицинских наук, профессор
Глушкова Ольга Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН
Гордеева Людмила Александровна – заведующая лабораторией иммуногенетики ИЭЧ СО РАН, кандидат биологических наук
Костянюк Михаил Владимирович – инженер технологи лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН
Красильникова Ксения Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН; (650071, г. Кемерово, ул. Молодежная, 13–10; тел.: 8-905-905-8411)
Поленок Елена Геннадьевна – заведующая лабораторией иммунохимии ИЭЧ СО РАН, кандидат фармацевтической науки
Попова Ольга Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН
Равинг Людмила Сергеевна – заведующая женской консультацией №1 МБУ ГКБ№1 г. Кемерово, врач акушер-гинеколог
Шаталина Ирина Викторовна – инженер-технолог I категории лаборатории иммуногенетики ИЭЧ СО РАН.