

## СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ ТЕРАПИИ УГРОЖАЮЩЕГО ВЫКИДЫША

**О. Макаров**<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор,

**С. Лунина**<sup>1</sup>,

**Л. Сальникова**<sup>2</sup>, доктор биологических наук,

**Н. Луценко**<sup>1</sup>,

**В. Гончарова**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНИМУ им. Н.И. Пирогова

<sup>2</sup>Учреждение РАН Институт общей генетики

им. Н.И. Вавилова РАН

**E-mail:** Svetlana.lunina2011@yandex.ru

*Максимальный риск невынашивания беременности, несмотря на проводимую терапию угрозы выкидыша, был ассоциирован с комбинацией «рисковых» аллелей генов ABCB1 и GSTP1; частота встречаемости такой комбинации составила 13,2%.*

**Ключевые слова:** акушерство и гинекология, невынашивание беременности, полиморфизм генов детоксикации ксенобиотиков, *GSTP1*, *ABCB1*, результаты терапии.

Во всех странах стремительно развивается персонализированная медицина, которая использует индивидуальную генетическую информацию при подборе оптимальных профилактических мер и методов лечения. Повышенная чувствительность к лекарственным препаратам, сопровождающаяся побочными эффектами, либо толерантность к проводимой терапии в значительной степени определяются индивидуальными генетическими особенностями пациентов [2].

Межиндивидуальная изменчивость до  $10^4$  раз [15] характеризует эффективность и безопасность применения большинства лекарственных препаратов. Одна из причин, определяющих такую вариабельность, – генетически детерминированные различия в активности ферментов детоксикации ксенобиотиков, метаболизирующих лекарственные вещества. Система детоксикации ксенобиотиков включает 2 стадии. В I стадии происходит активация соединений посредством цитохромов P-450 и ряда других ферментов, во II – собственно детоксикация реактивных гидрофильных метаболитов с участием глутатион-S-трансферазы и других белков.

Аллели гена I стадии детоксикации *CYP1B1* обуславливают различную активность соответствующих белковых продуктов по отношению к прогестерону [12, 13]. Последствия комплексной гормонотерапии, включающей эстрогены и прогестерон, ассоциированы с полиморфизмом 2 генов I стадии детоксикации – *CYP1B1* и *CYP1A1* [9].

Прямое участие белков системы детоксикации ксенобиотиков в метаболизме препаратов ограничено их субстратной специфичностью. Однако возможное и опосредованное влияние ферментов на фармакокинетику препаратов, непосредственно не являющихся их субстратами, в частности, через изменение внутриклеточной концентрации эндогенных регу-

ляторов. Например, показано, что у носителей различных аллелей гена *ABCB1* значительно различается базальный и индуцированный уровень экспрессии гена *CYP3A4* [10], белковый продукт которого участвует в метаболизме глюкокортикоидов и половых гормонов [5].

В настоящей работе представлены результаты изучения ассоциации между полиморфизмом генов детоксикации ксенобиотиков и терапевтическим ответом при угрозе прерывания беременности. Выбор локусов для генотипирования основывался на приведенных литературных данных. Список исследованных полиморфных сайтов размещен в табл. 1.

Клиническую часть работы проводили у 130 женщин на базе кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова в Городской клинической больнице №55. На каждую пациентку заводили специальную карту, в которую вносили данные анамнеза и обследования, характер проведенного беременной лечения, данные репродуктивного и социального анамнеза. Это позволило сопоставить факторы, оказывающие влияние на течение беременности: возраст, социальное положение, наследственность, экстрагенитальная и гинекологическая сопутствующая патология, вредные привычки, характер менструальной и репродуктивной функции, частота и особенности течения воспалительных заболеваний, характер получаемой терапии, эффект от проводимой терапии.

Средний возраст обследованных составлял  $29,57 \pm 0,51$  года (от 16 до 44 лет); средний индекс массы тела (ИМТ) –  $23,29 \pm 0,37$  кг/м<sup>2</sup> (от 16 до 39 кг/м<sup>2</sup>). Прогрессирование беременности на фоне проводимой терапии не зависело от наличия диагнозов «бесплодие» (у 11) и «привычное невынашивание беременности» (у 22), случаев невынашивания беременности в анамнезе, предшествующих аборт, генитальной патологии, патологии менструальной функции, стресса, курения, возраста, ИМТ. Отсутствие прогрессирования беременности наблюдалось у 56,2% обследованных.

Терапия, направленная на пролонгирование беременности, включала: прогестагены (дюфастон и/или утрожестан – в зависимости от схемы лечения до поступления

в стационар), симптоматическое лечение (при наличии кровяных выделений из половых путей – гемостатическое лечение, при угрозе выкидыша – спазмолитические препараты), витаминотерапию (витамин Е, фолиевая кислота, магне В<sub>6</sub>).

К критериям включения в исследуемые группы относится также срок гестации (I триместр беременности).

Генетическое исследование выполняли в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью наборов Diatom DNA Prep 200, основанных на использовании гуанидинтиоционата и Nucleus-сорбента (Лаборатория «Изоген», Москва). Генотипирование осуществлялось с использованием аллель-специфической тетрапраймерной полимеразной цепной реакции [7].

Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета WinSTAT 2003.1, интегрированного в Excel. При оценке отношения шансов (ОШ) и значимости отличий частот по точному критерию Фишера использовался свободно распространяемый пакет программ WinPepi (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>).

В случае инсерционно-делеционного полиморфизма (гены *GSTM1*, *GSTT1*) сравнение проводили для 2 вариантов генотипа: «нулевой» – гомозиготный по делеции (D/D) и «функциональный» – несущий функциональный аллель в гомо- или гетерозиготном состоянии (I/\*); здесь и далее означает произвольный аллель.

По техническим причинам число лиц, генотипированных по отдельным локусам, и, соответственно, суммарное число установленных генотипов по каждому гену может отличаться. Частота генотипов у пациенток с прогрессированием беременности (группа ПБ) и с сохраняющейся угрозой выкидыша (группа УВ) на фоне терапии приведена в табл. 2.

Для всех исследованных полиморфных вариантов распределение генотипов соответствовало равновесному по Харди–Вайнбергу. Установленная частота аллелей генов *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *ABCB1* для русских близки к значениям, характерным для европеоидов (см. табл. 2). Суще-

ственные отклонения в частоте генотипов в обследованной группе в целом от популяционных данных для европеоидов зарегистрированы для 2 локусов: *GSTM1* и *CYP1B1*. В изученной группе частоты генотипов гена *GSTM1* составила I/\* – 68,6%, D/D – 31,4% (достоверность отличий от данных для европеоидов  $p=0,002$ ; ОШ=2,46, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,43–4,25); частота аллелей гена *CYP1B1* 1294C – 71,37%; 1294G – 28,63% ( $p=0,005$ ; ОШ=2,03; 95% ДИ 1,26–3,29).

Достоверные различия частот аллелей у женщин с ПБ и УВ зафиксированы по 2 генам. У имеющих аллель 313G гена *GSTP1* в гомо- либо гетерозиготном состоянии риск прерывания беремен-

Таблица 1

Исследованные в работе полиморфные сайты генов детоксикации ксенобиотиков

Ген	Локализация в геноме	Полиморфизм ДНК/аминокислотная замена	Идентификатор dbSNP	Функция соответствующего белка
<i>CYP1A1</i>	15q22-q24	A4889G Ile462Val	rs1048943	1-я фаза детоксикации ксенобиотиков – метаболическая активация ароматических углеводородов
		T3801C	rs4646903	
<i>CYP1B1</i>	2p21	G1294C Val432Leu	rs1056836	
<i>GSTM1</i>	1p13.3	Инсерция (+) – делеция (0)	–	2-я фаза детоксикации ксенобиотиков – собственно детоксикация путем присоединения восстановленного глутатиона к электрофильным соединениям
<i>GSTT1</i>	22q11.2	Инсерция (+) – делеция (0)	–	
<i>GSTP1</i>	11q13	A313G Ile105Val	rs1695	
<i>ABCB1</i>	7q21.1	T3435C	rs1045642	Мембранный белок, гликопротеин из семейства ABC-переносчиков; удаление токсичных соединений и их метаболитов из клетки

ности на фоне проводимой терапии достоверно выше, чем у пациенток, гомозиготных по аллелю дикого типа ( $p=0,01$ ; ОШ=2,74; 95% ДИ 1,31–5,71). Наблюдается аддитивный эффект аллелей, т.е. эффект дозы гена ( $p=0,0054$ ; ОШ=2,27; 95% ДИ 1,29–4,01). Этот результат остается значимым даже с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений ( $p=0,05/6=0,0083$ ). В данном случае за число тестов принимается не число изученных сайтов ( $n=7$ ), а число генов, так как 2 сайта гена *CYP11A1* (A4889G и T3801C) сцеплены:  $D'=0,52$ ,  $r=0,25$ ,  $p=0,002$ , что совпадает с данными, полученными нами ранее на других выборках [1].

Гомозиготность по аллелю 3435C гена *ABCB1* сопряжена с повышенным шансом отсутствия терапевтического ответа ( $p=0,022$ ; ОШ=2,88; 95% ДИ 1,18–7,03). Как и для гена *GSTP1*, имеется аддитивный эффект аллелей ( $p=0,010$ ; ОШ=1,98; 95% ДИ 1,19–3,30). Проверка уровня значимости 2-го достоверного результата методом False Discovery Rate control (FDR) [6] показала, что он также остается достоверным при учете множественности сравнений ( $p=(0,05/6) \cdot 2=0,0166$ ).

Риск прерывания беременности максимален у пациенток с сочетанием неблагоприятных генотипов 313G/\* гена

Таблица 2

Частота генотипов в изученных генах-кандидатах в группах с ПБ и УВ

Локусы, аллели и генотипы	Группа ПБ		Группа УВ		Достоверность по критерию Фишера	Достоверность в соответствии с законом Харди-Вайнберга	Частота аллелей и генотипов у европейцев, % (литературные данные)
	n (%)		n (%)				
<i>CYP11A1</i> A4889G (Ile462Val) rs1048943	A	66 (94,29)	116 (98,31)				96,9
	G	4 (5,71)	2 (1,69)				3,1
	A/A	31 (88,57)	57 (96,61)	**0,19		*0,74	93,8
	A/G	4 (11,43)	2 (3,39)	***0,47		**0,90	6,2
	G/G	0 (0,00)	0 (0,00)				0,0
<i>CYP11A1</i> T3801C rs4646903	T	74 (90,24)	111 (86,72)				90,0
	C	8 (9,76)	17 (13,28)				10,0
	T/T	34 (82,93)	47 (73,44)	*0,39		*0,33	–
	T/C	6 (14,63)	17 (26,56)	**0,34		**0,29	–
	C/C	1 (2,44)	0 (0,00)	***0,52			–
<i>CYP11B1</i> G1294C (Val432Leu) rs1056836	C	75 (69,44)	99 (72,79)				55,3
	G	33 (30,56)	37 (27,21)				44,7
	C/C	25 (46,30)	33 (48,53)	*0,40		*0,64	33,6
	C/G	25 (46,30)	33 (48,53)	**0,86		**0,18	43,4
	G/G	4 (7,41)	2 (2,94)	***0,57			23,0
<i>GSTM1</i> Инсерция (I/*) – делеция (D/D)	D/D	18 (33,33)	20 (29,85)		0,70	–	53,0
	I/*	36 (66,67)	47 (70,15)				47,0
<i>GSTT1</i> Инсерция (I/*) – делеция (D/D)	D/D	8 (14,81)	17 (25,37)		0,18	–	20,0
	I/I*	46 (85,19)	204(74,63)				80,0
<i>GSTP1</i> A313G (Ile105Val) rs1695	A	86 (78,18)	82 (61,19)				59,3
	G	24 (21,82)	52 (38,81)				40,7
	A/A	33 (60,00)	23 (35,38)	*0,29		*0,70	31,9
	A/G	20 (36,36)	36 (55,38)	**0,01		**0,34	
	G/G	2 (3,64)	6 (9,23)	***0,005			13,3
<i>ABCB1</i> T3435C rs1045642	C	42 (38,89)	77 (55,80)				42,9
	T	66 (61,11)	61 (44,20)				57,1
	C/C	8 (14,81)	23 (33,33)	*0,02		*0,95	15,0
	C/T	26 (48,15)	31 (44,93)	**0,07		**0,74	55,8
	T/T	20 (37,04)	15 (21,74)	***0,01			29,2

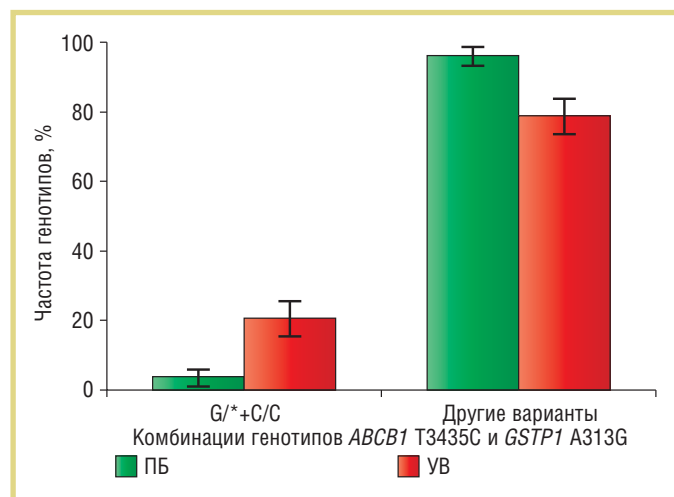
**Примечание.** Достоверность эффекта по точному двустороннему критерию Фишера: \* – рецессивная модель (001); \*\* – доминантная модель(011); \*\*\* – аддитивно; достоверность отличий распределения частот генотипов в соответствии с законом Харди-Вайнберга: \* – группа ПБ; \*\* – группа УВ. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты. Для показателя *CYP11B1* приведена частота аллелей и генотипов по данным HarMap-CEU (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Частота генотипов генов *GSTM1* и *GSTT1* приведена на основании генотипирования контрольной выборки европейцев (соответственно 10 514 и 5577 человек).

*GSTP1* и *3435C/C* гена *ABCB1*, ( $p=0,006$ ; ОШ= 7,0; 95% ДИ 1,54–31,90) (см. рисунок). Частота встречаемости такой комбинации в целом составляет 13,3%, при этом у пациенток с непрогрессирующей беременностью она достигает 21,21%, а среди тех, у кого удалось ликвидировать угрозу выкидыша, – 3,70%.

В настоящей работе выявлена ассоциация определенных аллелей генов детоксикации ксенобиотиков с эффективностью лечения при возникновении угрозы выкидыша на ранних сроках беременности. На I стадии биотрансформации (активации) ксенобиотики, в том числе лекарственные препараты, превращаются в водорастворимые соединения. Среди процессов собственно детоксикации, происходящих на 2-й фазе, значительный удельный вес приходится на конъюгацию, осуществляемую глутатион-S-трансферазами (GST), электрофильных производных I стадии с глутатионом, которые затем выводятся из организма. Риск толерантности к проводимой терапии ассоциирован с минорным аллелем 313G гена II стадии детоксикации ксенобиотиков *GSTP1* в гомо- и гетерозиготном состоянии.

Фермент *GSTP1* является самой распространенной глутатион-S-трансферазой в тканях плаценты [11], и уже при сроке 8 нед гестации показана его экспрессия в эпителии органов пищеварения, выделения и дыхания у эмбриона. Он катализирует многочисленные экзо- и эндогенные соединения, в том числе полициклические ароматические углеводороды, а также метаболиты и эстрогены. Изоформы фермента с 1 аминокислотным остатком характеризуются различной специфичностью и, соответственно, активностью по отношению к разным субстратам. Так как активность минорного варианта фермента повышена по отношению к ПАУ, к которым относится бензо(а)пирен, а бензо(а)пирен изостеричен (т.е. имеет одинаковую электронную конфигурацию) половым стероидам [5], можно предположить, что детоксикация прогестагенов у носителей минорного аллеля 313G осуществляется существенно быстрее, чем у лиц с генотипом мажорной гомозиготы по данному сайту, что и обуславливает резистентность к терапии.

В исследовании также зарегистрирована ассоциация толерантности к проводимой терапии с аллелем 3435C гена *ABCB1* ( $p=0,022$ ; ОШ=2,88).



Сравнительная частота встречаемости комбинации аллелей предрасположенности *ABCB1* 3435C/C и *GSTP1* 313G/\* и других сочетаний генотипов у женщин с ПБ и УВ на фоне проводимой терапии

P-гликопротеин, или *ABCB1*, – мембранный белок, гликопротеин из семейства ABC-переносчиков. Обеспечивает перенос веществ, таких как липиды, стероиды, пептиды, билирубин, многие лекарственные соединения и другие, через мембрану клетки. Предполагается, что фермент содержит множественные сайты, связывающие лекарства, и это одно из возможных объяснений тому, как один белок транспортирует различные вещества. Накопление любого вещества-субстрата P-гликопротеина снижено в клетках с повышенной функцией данного белка, в связи с чем его также называют белком полилекарственной резистентности (MDR-1).

*ABCB1* – один из наиболее распространенных белков-транспортеров на апикальной поверхности синцитиотрофобластов; он защищает развивающийся плод от ксенобиотиков и лекарственных препаратов, циркулирующих в организме матери, с начальных стадий беременности и до конца.

Выявленные в настоящей работе ассоциации по резистентности к терапии у носителей аллеля 3435C могут быть (при прочих равных факторах) связаны с более эффективной детоксикацией лекарственных препаратов. Однако сложность взаимодействий всех модуляторов активности P-гликопротеина требует отдельного изучения используемых схем терапии с учетом диеты, гормонального статуса пациентки, наличия острых и хронических заболеваний и сопутствующего им лечения.

Гены, аллели которых оказались сопряженными с риском невынашивания беременности даже на фоне проводимой терапии, относятся к сравнительно небольшому списку наиболее важных генов (important PGx genes), изучаемых фармакогенетикой (<http://www.pharmgkb.org/>). Назначение препаратов с учетом знания генетического статуса пациентов может помочь избежать нежелательных реакций и получить максимальный терапевтический ответ. Избыточная или недостаточная активность ферментов, метаболизирующих конкретные препараты, часто может быть компенсирована другими препаратами, например, за счет конкурентного связывания, ингибирования или индукции [3, 8]. Кроме того, резистентность к одним соединениям часто сопряжена с повышенной чувствительностью к другим [6]. Данное пилотное исследование ассоциации полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков с терапевтическим ответом при угрозе невынашивания беременности является одним из первых шагов на пути к персонализации терапии, которая должна назначаться индивидуально по принципу «правильное лекарство в правильной дозе» [9].

## Литература

1. Сальникова Л.Е., Замулаева И.А., Белопольская О.Б. и др. Встречаемость TCR-мутантных лимфоцитов у человека в зависимости от генотипов по локусам детоксикации ксенобиотиков // Экологическая генетика. – 2010; 8 (2): 18–23.
2. Бочков Н.П. Клиническая генетика / М.: ГЭОТАР-Мед, 2002; 457 с.
3. Bansal T., Jaggi M., Khar R. et al. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. – 2009; 12 (1): 46–78.
4. Diergaarde B., Potter J., Jupe E. et al. Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism, estrogen plus progestin hormone therapy use, and risk of postmenopausal breast cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2008; 17 (7): 1751–9.
5. Fertuck K., Matthews J., Zacharewski T. Hydroxylated benzo[a]pyrene metabolites are responsible for in vitro estrogen receptor-mediated gene expression induced by benzo[a]pyrene, but do not elicit uterotrophic effects in vivo // Toxicol. Sci. – 2001; 59 (2): 231–40.

6. Hall M., Handley M., Gottesman M. Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2009; 30 (10): 546–56.

7. Hamajima N. PCR–CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* – 2001; 1 (1): 119–23.

8. Harbottle A., Daly A., Atherton K. et al. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance // *Intern. J. Cancer.* – 2001; 92 (6): 777–83.

9. Josephy P. Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology // *Human Genom. Prot. Vol.* – 2010 (2010), Article ID 876940, 14 pages doi:10.4061/2010/876940 URL: <http://www.sage-hindawi.com/journals/hgp/2010/876940/>

10. Lamba J., Strom S., Venkataramanan R. et al. MDR1 genotype is associated with hepatic cytochrome P450 3A4 basal and induction phenotype // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2006; 79 (4): 325–38.

11. Pasanen M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1999; 38: 81–97.

12. Schilling C., Gallicchio L., Miller S. et al. Genetic polymorphisms, hormone levels, and hot flashes in midlife women // *Maturitas.* – 2007; 57 (2): 120–31.

13. Shimada T., Watanabe J., Sutter T. et al. Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants // *Carcinogenesis.* – 1999; 20 (8): 1607–13.

14. Van Lieshout E., Knapen M., Lange W. Localization of glutathione S-transferases alpha and pi in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age // *Human Reprod.* – 1998; 13 (5): 1380–6.

15. Guengerich F. Cytochrome P 450s, drugs and diseases // *Mol. Interv.* – 2003; 3 (4): 8–18.

---

## THE XENOBIOTIC DETOXIFICATION SYSTEM IN THE THERAPY OF THREATENED ABORTION

Professor **O. Makarov**<sup>1</sup>, MD; **S. Lunina**<sup>1</sup>; **L. Salnikova**<sup>2</sup>, Biol. D; **N. Lutsenko**<sup>1</sup>; **V. Goncharova**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

<sup>2</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

*Despite performed therapy for abortion, the highest risk of miscarriage was associated with a combination of the risky alleles of the ABCB1 and GSTP1 genes; the frequency of this combination was 13.2%.*

**Key words:** obstetrics and gynecology, miscarriage, xenobiotic detoxification gene polymorphisms, *GSTP1*, *ABCB1*, results of therapy.