

Протективный эффект полиморфизма P187S гена НАД(Ф)Н-хинон оксидоредуктазы типа 1 (*NQO1*) в развитии врожденных дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца

Швецов Я.Д.¹, Лазарев К.Ю.², Бушуева О.Ю.¹, Брайко О.П.², Голубцов В.И.², Полоников А.В.¹

¹ Курский государственный медицинский университет, 305041, Курск, ул. К. Маркса 3 shvecov.miogu@rambler.ru

² Кубанский государственный медицинский университет, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4 golubcovv@rambler.ru

Фермент NQO1 препятствует образованию свободных радикалов, которые могут оказывать влияние на органогенез и способствовать развитию врожденных пороков развития. Целью настоящего исследования было изучение ассоциации полиморфизма P187S гена *NQO1* с развитием врожденных дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца. В исследование были включены дети с дефектом межпредсердной перегородки (N = 48) и с дефектом межжелудочковой перегородки (N = 103), а также здоровые дети без ВПР (N = 209) — уроженцы Краснодарского края. Установлено, что полиморфизм P187S гена *NQO1* ассоциирован с пониженным риском развития дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца у девочек.

Ключевые слова: врожденный дефект межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца, ДНК-полиморфизм, *NQO1*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The protective effect of polymorphism P187S of the *NQO1* gene in the development of congenital defects of atrial and ventricular septum of the heart

Shvetsov Y.D.¹, Lazarev K.Yu.², Bushueva O.Yu.¹, Brayko O.P.², Golubtsov V.I.², Polonikov A.V.¹

¹ — Kursk State Medical University, 305041, Kursk, Karl Marx Street, 3, shvecov.miogu@rambler.ru

² — Kuban State Medical University, 350063, Krasnodar, Sedina street, 4, golubcovv@rambler.ru

Enzyme NQO1 prevents the formation of free radicals, which can affect organogenesis and contribute to the formation of congenital malformations. The purpose of the present study was to investigate an association between polymorphism P187S of the *NQO1* gene with the development of congenital defects of atrial and ventricular septum of the heart. The study included children with atrial septal defect (N = 48) and ventricular septal defect (N = 103), as well as healthy children without CHD (N = 209) — natives of Krasnodar region. It was found that the gene polymorphism P187S *NQO1* is associated with a reduced risk of developing defects of atrial and ventricular septum of the heart at girls.

Keywords: congenital atrial and ventricular septal defect of the heart, DNA polymorphism, *NQO1*.

Введение

Врожденные пороки сердца (ВПС) привлекают пристальное внимание исследователей во всем мире не только в связи с высокой частотой встречаемости, но и потому, что они являются причиной 40% перинатальных потерь [1]. По данным CDC или «Центра контроля за болезнями» (США), именно ВПС наиболее часто по сравнению с другими аномалиями развития приводит к смерти детей в первый год жизни. При этом на долю множественных пороков развития сердца приходится 45,2%, а изолированных форм — 21,4% [2]. Врожденные дефекты межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца (ДМПП и ДМЖП) составляют почти половину всех ВПС. Высокая распространенность изолированных и комбинированных дефектов перегородок камер сердца обусловлена относительной длительностью эмбриогенеза этих анато-

мических структур, а также особенностями антенатального кровообращения [3]. К одному из наиболее частых ВПС относится ДМПП, который наблюдался с частотой 5—26,5% от всех ВПС и может встречаться как в изолированном виде, так и сочетаться с другими аномалиями, такими, как транспозиция магистральных сосудов, тотальный аномальный дренаж легочных вен, аномалия Эбштейна и др. [4]. ДМЖП является наиболее распространенным ВПС и присутствует примерно у 3—4 младенцев из 1000 новорожденных. В результате спонтанного закрытия небольших ДМЖП частота этого заболевания снижается с возрастом, особенно у взрослых [5]. Большие ДМЖП, как правило, корригируются в детском возрасте.

По этиологии ВПС относят к мультифакториальной патологии, при которой взаимодействие генетических и средовых факторов составляет основу развития поро-

ков. Неоднократно доказано, что ВПС плода чаще возникает во время беременности у тех матерей, которые проживают на экологически загрязненной территории, работают на канцерогенно-опасном производстве, испытывают никотиновую, алкогольную и наркотическую интоксикации [6, 7]. Накапливается все больше свидетельств о влиянии экологических факторов химической природы на репродуктивные функции организма, а формирующиеся под действием токсикантов активные формы кислорода (АФК) негативно влияют на процесс созревания яйцеклетки, фолликулярной атрезии, лютеолиза [8, 9], могут вмешиваться в процессы гисто- и органогенеза и, таким образом, способствовать формированию пороков развития [10]. В связи с этим к числу генов-кандидатов, которые могут оказывать влияние на риск развития ВПС, можно причислить гены ферментов биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной системы.

НАД(Ф)Н-хинон оксидоредуктаза 1 (NQO1) представляет собой одновременно фермент биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты, предотвращающий образование свободных радикалов семихинона, защищая таким образом клетку от окислительного стресса [11]. С другой стороны, NQO1 метаболически активирует отдельные виды ксенобиотиков, такие, как нитрозамины и гетероциклические амины (содержатся в табачном дыме, пище) [12]. Ген *NQO1* расположен на хромосоме 16 в локусе 16q22.1, установлено более 20 частых однонуклеотидных полиморфизмов, одним из которых является SNP Pro187Ser (P187S) [13]. В современной литературе имеются данные о вовлеченности полиморфизмов гена *NQO1* в развитие злокачественных новообразований легких [14], мочевого пузыря [15], колоректальной области [16], а также болезни Паркинсона [17].

Целью настоящего исследования было изучение ассоциации полиморфизма Pro187Ser гена *NQO1* с риском развития врожденных дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца плода.

Материалы и методы

Материалом для настоящего исследования послужила выборка детей из 44 районов Краснодарского края, родившихся в период 1998—2012 гг., не состоявших в родственной связи друг с другом. В исследование было включено 360 детей. Основная группа была представлена 48 детьми с ДМПП, а также 103 детьми с ДМЖП. Средний возраст детей с ВПС составил $3,10 \pm 0,45$ года (55 мальчиков — 36,4% и 96 девочек — 63,6%). Группу контроля составляли 209 здоровых детей (94 мальчика — 45% и 115 девочек — 55%), не имеющих врожденных пороков развития, славянской национальности, проживающих в Краснодарском крае. Средний возраст здоровых детей составил $3,53 \pm 0,42$ года. Критерии включения исследуемых в группу больных ВПС: славянская нацио-

нальность, рождение и проживание на территории Краснодарского края, подтвержденный диагноз изолированного (несиндромального) ВПС (ДМПП или ДМЖП). Сочетанные формы ДМПП и ДМЖП не включались в исследование. Все случаи ВПС, включенные в исследование, были спорадическими. Синдромальность врожденных пороков сердца была исключена квалифицированными врачами-генетиками краевой медико-генетической консультации с использованием всего арсенала лабораторных и инструментальных методов анализа. Критериями исключения пациентов из группы больных служил факт наличия ВПС как проявление хромосомного или генного заболевания, а также наличие родственной связи между обследованными детьми. Включение в группу больных с ВПС осуществлялось только после верификации диагноза с помощью комплекса клинических методов с использованием физикального обследования, анкетирования, ЭКГ, УЗИ, рентгенографии сердца и др.

У всех обследуемых проводили забор венозной крови из кубитальной вены. Выделение геномной ДНК осуществляли из размороженной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма P187S гена *NQO1* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, (США)). Для оценки качества генотипирования 10% образцов прошли повторное генотипирование, результаты которого полностью соответствовали первоначальным данным. Для оценки соответствия распределения частот генотипов исследуемого полиморфизма гена *NQO1* ожидаемым значениям при равновесии Харди—Вайнберга (РХВ) и для сравнения распределений частот аллелей и генотипов в выборках больных ВПС и здоровых детей использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к ВПС судили по величине отношения шансов (OR), показателю, отражающему, во сколько раз вероятность оказаться в группе «случай» (больные) отличается от вероятности оказаться в группе «контроль» (здоровые) для носителя изучаемого генотипа: $OR = (A/B)/(C/D)$, где A и B — количество больных, имеющих или не имеющих мутантный аллель или генотип соответственно, D и C — количество человек в контрольной группе, имеющих или не имеющих мутантный аллель или генотип соответственно. Границы 95%-ного доверительного интервала (CI) для OR вычисляли методом B.Woolf. При сравнении частот аллелей и генотипов, в случае численности какого-либо генотипа менее 5, использовался точный критерий Фишера. Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 6.0 («Statsoft») и Excel 2010 («Microsoft»).

Результаты и обсуждение

Частоты генотипов изучаемого полиморфизма P187S гена *NQO1* находились в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). В связи с тем, что ассоциация может проявлять по-разному в зависимости от пола, первым этапом исследования был анализ распределения частот генотипов отдельно у мальчиков и девочек (табл. 1). Выяснилось, что мутантный генотип 187SS *NQO1* вообще не встречался в группе больных девочек с ДМПП в отличие от группы контроля (OR 0,07; 95% CI 0,004–0,11; $p = 0,02$).

Гомозиготный генотип 187PP *NQO1* встречался чаще у девочек с ДМЖП по сравнению с группой контроля (OR 0,47; 95% CI 0,25–0,89; $p = 0,02$). В группе здоровых девочек по сравнению с группой больных ДМЖП мутантный генотип 187SS *NQO1* встречался в 6 раз чаще (OR 0,18; 95% CI 0,05–0,69; $p = 0,01$).

Учитывая, что выявленная ассоциация при обоих типах ВПС (ДМПП и ДМЖП) у девочек носит общий характер, следующим этапом исследования был анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма Pro187Ser гена *NQO1* в общей группе больных ВПС и здоровых индивидов. Как видно из представленных в табл. 2 данных, вариантный аллель 187S гена *NQO1* встречался реже в группе детей с ДМПП (OR 0,44; 95% CI 0,26–0,74; $p = 0,002$). Гомозиготный генотип 187PP *NQO1* встречался чаще у больных с ДМПП, в отличие от группы здоровых детей (OR 1,96; 95% CI 1,04–3,71; $p = 0,04$).

Кроме того, у больных с ДМПП по сравнению со здоровыми детьми имело место 10-кратное снижение частоты генотипа 187SS *NQO1* (OR 0,13; 95% CI 0,02–0,67; $p = 0,006$).

Сравнительный анализ частот аллелей между группами детей позволил выявить статистически значимую ассоциацию аллеля 187S гена *NQO1* (OR 0,44; 95% CI 0,26–0,74; $p = 0,00003$) с пониженным риском развития ДМЖП (табл. 2). Частота гомозиготного генотипа 187PP *NQO1* была выше в группе больных ДМЖП по сравнению с группой контроля (OR 2,12; 95% CI 1,31–3,43; $p = 0,002$). А у здоровых детей в сравнении с больными ДМЖП отмечалось 4-кратное увеличение генотипа 187SS *NQO1* (OR 0,23; 95% CI 0,09–0,57; $p = 0,001$).

В рамках настоящего исследования впервые установлено, что полиморфизм P187S гена *NQO1* является значимым фактором риска развития ВПС — выявлена ассоциация полиморфизма с пониженным риском развития врожденного дефекта межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца. *NQO1* функционирует как фермент II фазы детоксикации, индуцируемый под действием ксенобиотиков и окислительного стресса и катализирующий реакцию двухэлектронного восстановления гидрохинонов, тем самым предотвращая образование потенциально токсичных семихиноновых свободных радикалов. Известно, что нуклеотидная замена 609C>T (известна как полиморфизм rs1800566,

Таблица 1

Распределение частот генотипов полиморфизма P187S гена *NQO1* у больных с ВПС и здоровых детей в зависимости от пола

Аллели/ Генотипы	Частоты генотипов				p	OR (95%CI)
	ВПС		Контроль			
	n	%	n	%		
Мальчики с дефектом межпредсердной перегородки						
187PP	9	60,0	37	39,4	0,22	0,45 (0,15-1,31)
187PS	5	33,3	37	39,4	0,87	0,80 (0,26-2,44)
187SS	1	6,7	20	21,2	0,33	0,38 (0,07-2,16)
Девочки с дефектом межпредсердной перегородки						
187PP	19	57,6	50	43,4	0,15	0,57 (0,26-1,24)
187PS	14	42,4	44	38,3	0,67	1,19 (0,54-2,61)
187SS	0	0	21	18,3	0,02*	0,07 (0,01-1,11)
Мальчики с дефектом межжелудочковой перегородки						
187PP	23	57,5	37	39,4	0,05	0,48 (0,23-1,02)
187PS	14	35,0	37	39,4	0,63	0,83 (0,38-1,79)
187SS	3	7,5	20	21,2	0,09	0,34 (0,10-1,13)
Девочки с дефектом межжелудочковой перегородки						
187PP	39	61,9	50	43,4	0,02*	0,47 (0,25-0,89)
187PS	22	34,9	44	38,3	0,66	0,87 (0,46-1,64)
187SS	2	3,2	21	18,3	0,01*	0,18 (0,05-0,69)

Таблица 2

**Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма P187S гена *NQO1*
у больных с ДМПП и ДМЖП и здоровых детей**

Аллели/ Генотипы	Частоты генотипов/аллелей				p	OR (95%CI)
	ВПС		Контроль			
	n	%	n	%		
Дефект межпредсердной перегородки						
187PP	28	58,3	87	41,6	0,04*	1,96 (1,04-3,71)
187PS	19	39,6	81	38,8	0,92	1,04 (0,54-1,97)
187SS	1	2,1	41	19,6	0,006*	0,13 (0,02-0,67)
187P	0,781		0,610		0,002*	0,44 (0,26-0,74)
187S	0,219		0,390			
Дефект межжелудочковой перегородки						
187PP	62	60,2	87	41,6	0,002*	2,12 (1,31-3,43)
187PS	36	35,0	81	38,8	0,51	0,85 (0,52-1,39)
187SS	5	4,8	41	19,6	0,001*	0,23 (0,09-0,57)
187P	0,777		0,610		0,00003*	0,44 (0,26-0,74)
187S	0,223		0,390			

Pro187Ser) проявляется тремя фенотипами: генотип Pro/Pro характеризуется нормальной активностью NQO1, гетерозиготный генотип Pro/Ser — трехкратным снижением активности фермента, а гомозиготный генотип Ser/Ser — полным отсутствием ферментативной активности [18]. Можно предположить, что негативная ассоциация исследованного «loss-of-function» полиморфизма (полное отсутствие активности фермента) напрямую не связана с функцией данного фермента, а скорее отражает возможность его участия в других сигнальных путях, в частности, связанных с морфогенезом системы кровообращения. Однако это предположение требует экспериментальной проверки самостоятельными исследованиями. Таким образом, полученные нами данные показывают, что полиморфизм P187S гена *NQO1* ассоциирован с предрасположенностью к ВПС.

Список литературы

1. Бокерия ЛА, Ступаков ИН, Зайченко НМ и др. Врожденные аномалии (пороки развития) в Российской Федерации. Детская больница. 2003; (1): 7-11
2. Медведев МВ. Эхокардиография плода. М.: РА-ВУЗДПГ, Реальное Время. 2000; 73 с.
3. Долбня СВ, Герасимова ОГ, Дрепа ТГ и др. Динамика структуры септальных врожденных пороков сердца у детей Ставропольского края за период с 2002 по 2012 гг. Вестник молодого ученого. 2013; (3): 9-12.
4. Эрдынеева ББ, Плеханов АН, Дашибалова ТЛ и др. Опыт эндоваскулярного транскатетерного закрытия вторичного дефекта межпредсердной перегородки. . 2009; (2): 92-93.
5. Hoffman J, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. J. Am. Coll. Cardiol. 2002; (39): 1890-1900.

6. Антонов ОВ, Артюкова СИ, Филиппов ГП. Эпидемиологический мониторинг и факторы риска врожденных пороков сердца у детей. Вестник СурГУ. Медицина. 2012; (14): 4-8.,
7. Шабалдин АВ. Сравнительная характеристика встречаемости различных врожденных пороков развития плода с позиции оценки экологической опасности в крупном промышленном центре. Мать и Дитя в Кузбассе. 2014; (4): 19-24
8. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 2006; (18): 325-332.
9. Alpay Z, Saed G, Diamond M. Female infertility and free radicals: potential role in adhesions and endometriosis. J. Soc. Gynecol. Inv. 2006; (13): 390-398
10. Зенков НК, Ланкин ВЗ, Меньшикова ЕБ. Окислительный стресс: Биохимические и патофизиологические аспекты. М: МАИК Наука/Интерпериодика. 2001; 343 с.
11. Siegel D, Gustafson D, Dehn D. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. Mol. Pharmacol. 2004; (5): 1238-1247.
12. Sunaga N, Kohno T, Yanagitani N et al. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2002; (11): 730-738.
13. Nebert DW, Roe AL, Van der Le SE et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: a review. Genet. Med. 2002; (4): 62-70.
14. Kim JH, Hong YC. Interactive effect of smoking and NQO1 haplotypes on lung cancer risk. J. Korean Med. Sci. 2015; (30): 221-226.
15. Zhang Y, Yang D, Zhu J et al. The association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and urinary system cancer susceptibility: a meta-analysis of 22 studies. Cancer Invest. 2015; (33): 39-40.
16. Zheng B, Wang Z, Chai R. NQO1 C609T polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. Arch. Med. Sci. 2014; (10): 651-660.
17. De Palma G, Dick F, Calzetti S et al. A case-control study of Parkinson's disease and tobacco use: gene-tobacco interactions. Mov. Disord. 2010; (25): 912-919.
18. Sunaga N, Kohno T, Yanagitani N et al. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2002; (11): 730-738.