

Анализ взаимосвязи полиморфизма A/G (rs1801310) гена GSS с развитием миомы матки: пилотное исследование

Кудрявцева О.К.¹, Барышева Е.М.², Сорокина М.В.³, Полшведкина О.Б.², Иванова Н.В.², Полоников А.В.², Бушуева О.Ю.²

¹ Бюджетное медицинское учреждение «Курская областная клиническая больница» комитета здравоохранения Курской области; Областная медико-генетическая консультация, 305007, Курск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Кафедра биологии, медицинской генетики и экологии, 305041, Курск, Россия

³ Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Курская городская больница № 2»; Женская консультация, 305035, г. Курск, Россия

Целью нашей работы стал анализ взаимосвязи полиморфизма A/G (rs1801310) гена глутатион-S-синтетазы (GSS) с развитием миомы матки в популяции русских жителей Центральной России. Всего было обследовано 336 пациенток с ММ и 205 относительно здоровых женщин без клинических и УЗИ-признаков миомы матки. Генотипирование полиморфизма rs1801310 гена GSS проводилось методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с использованием TaqMan-зондов. Аллель G ассоциировался с повышенным риском развития ММ (OR = 1,30; 95%CI = 1,01–1,67; P = 0,04). В то же время генотип AA обладал протективным эффектом относительно развития ММ (OR = 0,60; 95%CI = 0,39–0,94; P = 0,03).

Ключевые слова: миома матки, наследственная предрасположенность, окислительный стресс, глутатион, ген GSS.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Для корреспонденции: Бушуева Ольга Юрьевна, к.м.н., доцент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, e-mail: olga.bushueva@inbox.ru, 305004 Курск, ул. Челюскинцев, д.23, кв.62, тел. 8 910 310 35 09.

The analysis of relationship between the A/G (rs1801310) polymorphism of the GSS gene and the development of uterine myoma: a pilot study

Kudryavtseva O.K.¹, Barysheva E.M.², Sorokina M.V.³, Polshvedkina O.B.², Ivanova N.V.², Polonikov A.V.², Bushueva O.Yu.²

¹ Kursk Regional Hospital 305007, Kursk, Russian Federation

² Kursk State Medical University, 305000, Kursk, Russian Federation

³ Kursk City hospital № 2, 305035, Kursk, Russian Federation

The aim of our study was to investigate the relationship between GSS A/G (rs1801310) gene polymorphism and the development of UM in the population of Central Russia. 336 patients with UM and 205 healthy women were enrolled in this study. Genotyping of A/G gene polymorphism was performed through TaqMan assay. Allele G was associated with increased risk of UM development (OR = 1,30; 95% CI = 1,01–1,67; p = 0,04). Meanwhile we observed the protective effect of AA genotype on the development of UM (OR = 0,60; 95% CI = 0,39–0,94; p = 0,03).

Keywords: uterine fibroids, genetic predisposition, oxidative stress, glutathione, the GSS gene.

Corresponding author: Bushueva Olga Yuryevna, associate professor of the department of Biology, Medical Genetics and Ecology, e-mail: olga.bushueva@inbox.ru

Введение

Миома матки (ММ) является самой распространенной доброкачественной опухолью органов малого таза у женщин. По данным зарубежных авторов, при использовании специальных инструментальных методов исследования, миома матки обнаруживается у 70–80% женщин детородного возраста [1]. Наиболее частыми осложнениями ММ являются бесплодие, аномальные маточные кровотечения, болевой синдром, сдавление

смежных органов, внематочная беременность. ММ является одной из основных причин оперативных вмешательств в гинекологической практике, из которых 70–95% приходится на радикальные операции — экстирпации матки [2].

С точки зрения медицинской генетики ММ является мультифакториальным заболеванием, причиной развития которого является совместное влияние генетических и средовых факторов риска. В настоящее время в этио-

патогенезе ММ значительная роль отводится активным формам кислорода (АФК), избыточная продукция которых вызывает развитие окислительного стресса [3]. Было доказано, что АФК способствуют активации митоген-активируемых протеинкиназ и регулируют клеточную пролиферацию. Обезвреживание АФК осуществляется комплексом ферментных и неферментных соединений, составляющих систему антиоксидантной защиты организма.

Глутатион (GSH) — трипептид, присутствующий во всех тканях человека — играет ведущую роль в защите клеток от окислительного стресса. GSH также является ключевым фактором, вовлеченным в клеточные сигнальные пути, играет важную роль в детоксикации ксенобиотиков, модулирует пролиферацию клеток, апоптоз, иммунные процессы и фиброгенез. Глутатион-синтетаза участвует в синтезе глутатиона в клетке; она кодируется геном *GSS*. Учитывая известную роль глутатиона в борьбе с окислительным стрессом, логично предположить, что генетические вариации в гене *GSS* могут в значительной мере влиять на патогенез ММ. До настоящего времени исследований ассоциации гена *GSS* с развитием ММ в мире не проводилось.

Целью нашей работы стал анализ взаимосвязи полиморфизма A/G (rs1801310) гена *GSS* с развитием ММ в популяции русских жителей Центральной России.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужила выборка неродственных женщин русской национальности, проживающих в Курской области (уроженки Центральной России), общей численностью 541 чел. Проведение исследования было одобрено региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета. Все пациентки подписали информированное согласие на проведение исследования.

Всего было обследовано 336 пациенток с диагнозом ММ, находившихся на стационарном лечении в отделении оперативной гинекологии Курского областного перинатального центра и отделении оперативной гинекологии Курского городского клиниче-

ского родильного дома в период с 2010 по 2014 гг. Контрольную группу составили 205 относительно здоровых женщин соответствующего возраста, без доброкачественных и злокачественных новообразований в анамнезе и не имеющих клинических и УЗИ-признаков ММ.

Для проведения молекулярно-генетического исследования у всех обследуемых производился забор венозной крови. Выделение геномной ДНК осуществляли из размороженной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. В рамках исследования проводилось генотипирование полиморфизма A/G (rs1801310) гена *GSS*. Генотипирование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с использованием TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием праймеров и зондов, синтезированных компанией «Синтол» (Москва). Повторное генотипирование 10% случайно выбранных образцов показало 100% воспроизводимость полученных результатов.

Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов с риском развития ММ использовали критерий χ^2 и отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI). Значения $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica 8.0 («StatSoft») и MS Excel 2010.

Результаты исследования

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма A/G (rs1801310) гена *GSS* соответствовало популяционному равновесию Харди—Вайнберга (PXB). Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма в группах больных ММ и здоровых женщин представлен в таблице.

Как видно из данных таблицы, аллель G ассоциировался с повышенным риском развития ММ (OR = 1,30; 95%CI = 1,01—1,67; $p = 0,04$). В то же время генотип AA обладал протективным эффектом относительно развития ММ (OR = 0,60; 95%CI = 0,39—0,94; $p = 0,03$).

Таблица

Распределение аллелей и генотипов A/G (rs1801310) гена *GSS* у пациентов с ММ и здоровых лиц

Аллели, Генотипы		Больные ММ, общая группа (n = 336), n (%) ¹	Контрольная группа (n = 205), n (%) ¹	χ^2 (p) ²	OR (95% CI) ³
Аллели	A G	0,378 0,622	0,441 0,559	4,27 (0,04)*	1,30 (1,01—1,67)
Генотипы	AA AG GG	50 (14,9) 154 (45,8) 132 (39,3)	46 (22,4) 89 (43,4) 70 (34,2)	— 0,30 (0,58) 1,44 (0,23)	— 1,10 (0,78—1,56) 1,25 (0,87—1,79)

Примечание. ¹ Абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом; ² χ^2 и p -уровень значимости ($df = 1$); ³ Отношение шансов с 95% доверительными интервалами; * Показаны статистически значимые различия между группами.

Обсуждение

Окислительный стресс и нарушение системы антиоксидантной защиты выступают в качестве потенциальных факторов, участвующих в патофизиологии ММ [3]. В условиях окислительного стресса реализуется каскад патофизиологических изменений, приводящих к опухолевой прогрессии. Как известно, АФК благодаря выраженной реакционной способности приводят к повреждению ДНК клеток и нарушению процессов апоптоза [4]. Кроме того, происходит окислительная модификация белков, в том числе входящих в состав рецепторного аппарата, что приводит к изменению тканевой чувствительности к воздействию гуморальных факторов, способствующих митогенезу [5]. Гиперпродукция и накопление свободных радикалов в тканях матки вызывают повреждение клеточных мембран и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, что, в свою очередь, также способствует опухолевой прогрессии [6]. Также известно, что АФК стимулируют процессы неоангиогенеза, в значительной мере способствующие росту опухоли благодаря улучшению васкуляризации миоматозных узлов [7]. Кроме того, доказана роль свободных радикалов в гиперпродукции факторов роста [8].

АФК нейтрализуется благодаря работе антиоксидантной системы, состоящей из неферментных антиоксидантов, таких, как токоферолы, каротиноиды, аскорбиновая кислота, глутатион, и антиоксидантных ферментов. Наиболее важным компонентом, обеспечивающим антиоксидантную защиту, является глутатион, существующий в клетке в двух формах — окисленной GSSG, и восстановленной GSH. Молекула глутатиона имеет собственную антиоксидантную активность благодаря наличию высокореактивной тиоловой группы. Глутатион принимает участие в детоксикации различных электрофильных соединений [9]. Благодаря способности глутатиона активировать транскрипцию генов антиоксидантных ферментов, а также наличию его собственных антиоксидантных свойств, повышается устойчивость клеток к воздействию окислительного стресса. В ответ на окислительный стресс происходит синтез глутатиона из аминокислот *de novo*, что является важным адаптивным приспособлением организма. Процесс синтеза глутатиона в клетке происходит с участием глутатион-синтетазы. Ген *GSS*, кодирующий глутатион-синтетазу человека, расположен на хромосоме 20q11.2 [10]. Полиморфизм A/G (rs1801310) локализован в интронной области гена и не изучен относительно его функциональных эффектов. В частности, мы не обнаружили исследований по изучению влияния данного полиморфизма на экспрессию гена *GSS*.

Согласно полученным в нашем исследовании результатам, полиморфизм A/G (rs1801310) гена *GSS* ассоциирован с риском развития ММ у русских жителей

Центральной России, при этом мы установили, что носительство генотипа AA обладает протективным эффектом относительно развития ММ. Мы предполагаем, что данный полиморфизм, расположенный в интронной области гена, может снижать уровень экспрессии гена *GSS*, и, в конечном счете, влияет на концентрацию глутатиона и его антиоксидантные эффекты. Проведение функциональных исследований, включая исследования экспрессионного профиля гена, и биохимические исследования позволят подтвердить наши результаты.

Таким образом, полиморфизм A/G (rs1801310) гена *GSS* можно рассматривать как новый генетический маркер предрасположенности к ММ, однако требуются репликативные исследования в других популяциях мира. Полученные нами результаты подтверждают важную роль окислительного стресса в патогенезе ММ и открывают новые перспективы для предиктивного генетического тестирования предрасположенности к заболеванию и разработке новых препаратов для его профилактики и лечения.

Список литературы

1. Baird, D.D., Dunson, D.B., Hill, M.C., et al. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence // *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;188(1):100-107.
2. Стрижаков А.Н., Давыдов А.И., Пашков В.М. и др. Органосберегающее хирургическое лечение доброкачественных заболеваний матки // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2003; 2(3):.5-9.
3. Santulli, P., Borghese, B., Lemarechal, H., et al. Increased serum oxidative stress markers in women with uterine leiomyoma // *PLoS one*. 2013;8(8):e72069.
4. Fletcher, N.M., Saed, M.G., Abu-Soud, H.M., et al. Uterine fibroids are characterized by an impaired antioxidant cellular system: potential role of hypoxia in the pathophysiology of uterine fibroids // *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(7):969-974.
5. Короткина, Р.Н., Мацкевич, Г.Н., Девликанова, А.Ш. Сравнительное исследование активности ферментов обмена глутатиона и антиоксидантных ферментов в злокачественных и доброкачественных опухолях человека // *Бюлл экспер биол мед*. 2002;133(6):697-700.
6. Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R.M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation // *Biochemical Society Transactions*. 2003;31(6):1441-1444.
7. Maulik, N., Das, D.K. Redox signaling in vascular angiogenesis 1, 2 // *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(8):1047-1060.
8. Burdon, R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation // *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(4):775-794.
9. Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57(3):145-155.
10. Webb, G.C., Vaska, V.L., Gali, R.R., et al. The gene encoding human glutathione synthetase (*GSS*) maps to the long arm of chromosome 20 at band 11.2 // *Genomics*. 1995;30(3):617-619.