

# Поліморфізм генів другої фази детоксикації в ґенезі передчасного розриву плодових оболонок

О.С. Загородня, С.Ст. Леуш, В.О. Ткаліч, І.В. Страшко

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця  
Перинатальний центр, м. Київ

У статті наведено результати вивчення поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази у вагітних із передчасним розривом плодових оболонок. Установлено, що гомозиготний стан мутантних генів ферментів другої фази детоксикації є незалежним чинником ризику передчасного розриву плодових оболонок, що втринчі збільшує ймовірність даного ускладнення. Викладені можливі патогенетичні механізми такого впливу та перспективи їх вивчення.

**Ключові слова:** передчасний розрив плодових оболонок, глутатіон-S-трансфераза.

Передчасний розрив плодових оболонок (ПРПО) супроводжує 10–15% пологів, спричинюючи численні їхні ускладнення – аномалії пологової діяльності, внутрішньоутробне інфікування плода, післяпологові септичні захворювання. Частота ПРПО до 37 тиж гестації сягає 20–22%, після досягнення цього терміну передчасне вилиття навколоплодових вод реєструють лише в 10% випадків [7]. Частота ПРПО також залежить від терміну – в 28–34 тиж до 20% пологів є індукованими ПРПО, в 22–27 тиж – близько 50%. ПРПО неминуче призводить до розвитку регулярної пологової діяльності протягом кількох діб. Саме за недоношеної вагітності вкрай важливим питанням є її пролонгування на час проведення повного курсу профілактики синдрому дихальних розладів, що збільшує ризик інфікування плодових оболонок та порожнини матки. Передчасні пологи (ПП) за умови ПРПО пов'язані із підвищеним ризиком інфікування як плода, так і матері, що зумовлює низку перинатальних та післяпологових ускладнень. За даними А. Wolfensberger (2006), саме ПРПО при недоношеній вагітності спричинює до 20% всіх випадків перинатальної смертності в США. Частота перинатальних ускладнень також залежить від терміну, в якому відбувся ПРПО, при недоношеній вагітності терміном до 28 тиж показник ранньої неонатальної смертності сягає 70%. Розвиток інтраамніотичної інфекції спостерігають в 15–30% випадків ПРПО, у 2–13% таких породілей діагностують післяпологовий ендометрит [4].

Ураховуючи походження та будову амніотичної оболонки, що пошарово складається з амніотичного епітелію, базальної мембрани, сполучнотканинного шару, хоріона та децидуальної оболонки, порушення будови та метаболізму її тканин можна пояснити як плодовими, так і материнськими причинами. Традиційно причиною зниження еластичності амніотичної оболонки вважають активацію процесів апоптозу, зниження вмісту колагенових волокон, підвищення його розчинності, зростання колагенолітичної активності тощо (В.М. Сидельникова, 2006).

Останнім часом багато уваги приділяють зв'язку передчасного розриву плодових оболонок із порушенням структури сполучної тканини генетичного походження. Серед генетичних причин ПРПО виділяють поліморфізм гена будови колагену 1 $\alpha$ 2, ендотеліну та інгібітору серин-пептидази. Дослідженнями М.Г. Ніколаєвої та співавторів (2013) встановлено, що частота різних форм, у тому числі недиференційованих, дисплазії сполучної тканини, при якій порушуються її еластичні властивості, у вагітних із ПРПО сягає 80%.

Ураховуючи неможливість скринінгового генетичного обстеження вагітних, автори пропонують звертати увагу на такі анамнестичні чинники ризику, як мимовільні викидні, загроза викидно в I триместрі, нейроциркуляторна дистонія тощо, які в структурі своїх етіологічних чинників також мають порушення нормальної будови сполучної тканини.

Останніми роками все більше уваги приділяють генетично асоційованим чинникам ризику ПРПО. Х. Wing та співавтори в своєму огляді 2001 року лише перелічили гени, які, за різними літературними джерелами, є асоційованими зі спонтанним передчасним розродженням. Серед них – поліморфізм генів ензимів детоксикації – глутатіон-S-трансфераз – родини ферментів. Ця група ензимів відіграє важливу роль в процесах зв'язування гідрофобних сполук із глутатіоном, що призводить до інактивації токсичних властивостей продуктів обміну. На підставі біохімічних, імунологічних та структурних властивостей, групу ферментів поділяють на класи, що позначають грецькими літерами. Серед найбільш поширених та клінічно значущих класів –  $\theta$ -глутатіон-S-трансфераза (GSTT),  $\mu$ -глутатіон-S-трансфераза (GSTM) та  $\pi$ -глутатіон-S-трансфераза (GSTP) [10]. Головна функція ферментів полягає у зв'язуванні з глутатіоном субстанцій – продуктів I фази антиоксидантного стресу, що регулюється родинною ензимів цитохром-450 [11]. Значне посилення кровотоку та активація обмінних процесів, що властиві вагітності, значно посилюють навантаження на родину глутатіон-трансфераз, проявляючи їхню часткову функціональну неспроможність внаслідок поліморфізму генів, що їх кодують. Серед найбільш вивчених мутацій – делеція генів GSTT та GSTM, що може бути в гомозиготному (ГМ) та в гетерозиготному (ГТ) стані, та мутація гена GSTP, що полягає в заміщенні аденозину гуаніном у положенні 313. Частота поліморфізму наведених мутацій в популяції сягає, за даними А. Sharma та співавторів (2013), сягає 15–16% разом в гомо- та гетерозиготній формі.

Ураховуючи участь процесу відновлення глутатіону в більшості біохімічних реакцій організму, неважко пояснити вивчення поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази в різних галузях медицини. Так, Л.А. Сивак та співавтори (2013) вивчивши молекулярно-генетичні механізми хіміотерапії раку грудної залози, свідчать, що зростання токсичності протипухлинних препаратів у пацієнток із поліморфізмом гена GSTP. Показано роль неспроможності ферментів цієї родини у схильності до розвитку лімфолейкозу [5], токсичного ураження печінки при застосуванні нестероїдних протизапальних засобів, у тому числі – аспірину [8], тощо. Що стосується ролі поліморфізму генів наведеної родини в ґенезі передчасної пологової діяльності, то цьому питанню присвячено багато досліджень, втім жодне з них не надає конкретного механізму передчасної скоротливої активності матки або ПРПО та не вираховує можливості застосування цього чинника в якості прогностичного маркера. М. Quinzio та співавтори (2008) відзначають мутантну форму GSTP та делецію GSTM серед виявлених ними генетичних прогностичних чинників ПП. S. Liong та співавтори (2013) вирахували відносний ризик ПП за умови носійства виключно GSTP 313 A-G як 0,8,

Поліморфізм генів глутатіон-S-трансферази у обстежених роділей

Поліморфізм генів	Група I (n=86)		Група II (n=78)		Група III (n=56)	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Нормальний генотип GSTP	20	23,3*	58	74,4	47	83,9
ГТ GSTP 313 A-G	40	46,5*	12	15,4	6	10,7
ГМ GSTP 313 A-G	26	30,2*	8	10,3	3	5,4
Нормальний генотип GSTM	22	25,6*	50	64,1	46	82,1
ГТ GSTM del	37	43,0*	18	23,1	6	10,7
ГМ GSTM del	27	31,4*	10	12,8	4	7,1
Нормальний генотип GSTT	18	20,9*	57	73,1	39	69,6
ГТ GSTT del	40	46,5*	12	15,4	12	21,4
ГМ GSTT del	28	32,6*	9	11,5	5	8,9

Примітка: \*  $\alpha_{емпір} > \alpha_{крит}$  при порівнянні із групою III.

Таблиця 2

Кількість мутантних генів GSTP у обстежених вагітних

Кількість мутантних генів	Група I (n=86)		Група II (n=78)		Група III (n=56)	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
ГМ за одним геном <sup>§</sup>	15	17,4	5	6,4	3	5,3
ГМ за двома генами <sup>§</sup>	10	11,6	5	6,4	2	10,7
ГМ за трьома генами <sup>§</sup>	8	9,3	4	5,1	1	1,8
ГТ за одним геном	27	31,4	19	24,4	8	14,3
ГТ за двома генами	15	43,0	10	12,8	9	16,1
ГТ за трьома генами <sup>§</sup>	10	11,6	6	7,7	2	3,6

Примітка: <sup>§</sup> OR більше за 3,0.

проте не слід забувати про існування у кожної вагітної унікальної комбінації чинників генетичного походження, що можуть вплинути на несприятливий перебіг гестації.

**Мета дослідження:** вивчення поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази у вагітних із ПРПО при недоношеній вагітності, у роділей із спонтанною пологовою діяльністю та цілим плодовим міхуром та у здорових вагітних.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідження було включено 86 вагітних із ПРПО в терміні гестації 22–34 тиж (I група), 78 породілей із передчасною пологовою діяльністю на тлі цілого плодового міхура (II група) та 56 породілей із своєчасними пологами, що не ускладнились допологовим розривом плодових оболонок (III група).

У всіх вагітних було визначено поліморфізм мутації гена GSTP 313 A-G, а також делеції генів GSTM (GSTM del) та GSTT. Матеріал для проведення цієї ланки дослідження забирали у вагітних одразу під час госпіталізації (5 мл венозної крові), кров фіксували кефалініумісним транспортним розчином та заморожували до температури – 40°C.

Дослідження генетичного поліморфізму проводили з використанням методу алейл-специфічної полімеразної ланцюгової реакції з наступним гідролізом амплікантів відповідною рестрикувальною ендонуклеазою. Геномну ДНК зі зразків крові виділяли за стандартною методикою з використанням протеїнази К, фенол-гідроформної екстракції та осадження етанолом. Ідентифікацію алейльних домінант проводили за наявності сайту розпізнавання для відповідної рестрикувальної ендонуклеази за допомогою електрофорезу в агарному гелі. За наявності мутації виявляють утворення двох низькомолекулярних смуг, що утворюються під дією ферменту. При цьому повне розщеплення продукту полімеразної ланцюгової реакції свідчило про наявність в ДНК гомозиготної форми мутації (ГМ), часткове – гетерозиготної (ГТ).

Статистичне оцінювання отриманих результатів проводили із застосуванням критерію Колмогорова–Смирнова, що полягає в обчисленні  $\alpha_{емпір}$  та у порівнянні його з критичним значенням коефіцієнта. Коли  $\alpha_{емпір}$  є більшим за критичне значення, відмінності в розподілі показника по групах є статистично вірогідними. Крім того, для підтвердження ролі поліморфізму вивчених генів в якості фактора ризику ПРПО обчислено показник відносного ризику (OR).

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вагітність та пологи є результатом взаємодії материнського та плодового організмів на всіх рівнях – від особливостей регуляції тромбоутворення до тонких механізмів регуляції внутрішньоклітинного метаболізму. Розлади дезінтоксикації продуктів обміну речовин саме на клітинному рівні лежать в основі патологічних проявів поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази. Загальна поширеність поліморфізму 3 вивчених генів серед роділей із передчасними пологами не має статистичних відмінностей від групи здорових вагітних. Проте розглянувши групу роділей, у яких передчасні пологи було індуковано допологовим розривом плодових оболонок, чітко видно більшу частоту носійства генів, що визначають неповноцінну продукцію ферментів детоксикації (табл. 1).

Понад 70% вагітних, у яких відбувся допологовий розрив плодових оболонок при недоношеній вагітності, були носіями одного або більше генів, що визначають неповноцінне функціонування генів другої фази детоксикації, в той час як у групі роділей із своєчасними неускладненими пологами така частота не перевищувала 30%.

Отримані дані було проаналізовано з обчисленням відносного ризику (OR), що дозволяє зробити висновок про суттєвість впливу зазначеного чинника (в даному випадку поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази) на розвиток того чи іншого ускладнення (в даному випадку – ПРПО). Значення

OR більше за 3,0 свідчить про істотний вплив поліморфізму генів другої фази детоксикації на частоту ПРПО. Такі великі значення показника OR виявлено для носійства мутантних генів в гомозиготному стані – для гомозигот за одним геном – 3,3 та 5,2 для гомозигот за 3 генами. Що стосується генів, які визначають недостатню активність в гетерозиготному стані, то зростання відносного ризику за наявності одного або двох генів не призводить до вірогідного зростання ризику ПРПО. Лише виявлення в генотипі трьох мутантних генів в гетерозиготному стані призводить до збільшення OR ПРПО до 3,04.

Спосіб реалізації генетичного потенціалу у формі неповного домінування передбачає такі зміни в клітинних реакціях, коли гомозиготний стан мутантного гена повністю виключає функцію відповідного білка (в даному випадку – ферменту), а гетерозиготний – призводить до часткового

зменшення його активності. Саме такий механізм спостерігається в даному випадку, що дозволяє визначити гомозиготний стан мутантних генів як потужний незалежний чинник ризику ПРПО, а гетерозиготний – як менш виражений, проте його комбінація із іншими факторами, до яких традиційно належить інфікування нижнього полюсу плодового яйця, особливості будови сполучної тканини амніотичних оболонок тощо, може супроводжуватись зростанням такого ризику. Подальше вивчення поліморфізму генів другої фази детоксикації, асоційованих із ними змін тканинного метаболізму, насамперед – перикисного окислення ліпідів, особливостей імунної відповіді, дозволить більш глибоко описати механізми передчасного розриву плодкових оболонок при недоношеній вагітності, розробити алгоритми прогнозування та профілактики цього ускладнення.

**Полиморфизм генів второй фазы детоксикации в генезе преждевременного разрыва плодных оболочек**

**А.С. Загородняя, С.Ст. Леуш, В.А. Ткалич, И.В. Страшко**

**Second detoxication phase genes polymorphism in preterm amniotic membranes rupture genesis**

**O. Zagorodnya, S. Leush, V. Tkalych, I. Strashko**

В статье предоставлены результаты исследования полиморфизма генів глутатион-S-трансферазы у беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек. Установлено, что гомозиготная форма мутаций генів второй фазы детоксикации является независимым фактором риска преждевременного разрыва плодных оболочек. Изложены возможные патогенетические механизмы такого влияния и перспективы их изучения.

**Ключевые слова:** преждевременный разрыв плодовых оболочек, глутатион-S-трансфераза.

The results of glutathione-S-transferase polymorphism study of pregnant with preterm membrane rupture is considered in the article. The role of homozygote mutations of second detoxication stage enzymes as a independent factor of preterm membrane rupture is proved. Possible pathogenic ways of this influence and following study perspectives are discussed.

**Key words:** preterm membrane rupture, glutathione-S-transferase.

**Сведения об авторах**

**Загородняя Александра Сергеевна** – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9. E-mail: gyner2007@gmail.com

**Леуш Сергей Станиславович** – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9

**Ткалич Василий Алексеевич** – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9

**Страшко Ирина Владимировна** – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, 03150, г. Киев, ул. Предславинская, 9

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Николаева М.Г. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани как фактор риска преждевременного разрыва околоплодных оболочек при сроке гестации 22–36 недель /М.Г. Николаева, Н.В. Сердюк//XXII международная заочная научно-практическая конференция «Современная медицина: актуальные вопросы» (26 августа 2013 г.). – Новосибирск: «СибАК», 2013. – 122 с.
2. Сивак Л.А. Роль молекулярно-генетических показателей у прогнозуванні токсичності хіміотерапії у хворих із злоякісними пухлинами грудної залози /Л.А. Сивак, С.А. Лялькін, М.М. Свергун, Г.О. Губарева, М.Ю. Кліманов та ін. //Клінічна онкологія. – 2013. – № 2 (10). – С. 126–129.
3. Сидельникова В.М., Антонов А.Г. Преждевременные роды. Недоношенный ребенок. – ГЭОТАР-медиа. 2006. – 448 с.
4. ACOG Committee of Practice Bulletens-Obstetrics, authors. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologist. (ACOG practice Bulletin No80: premature rupture of membranes)//Obstet Gynecol. – 2007. – N 109. – P. 1007–1019.
5. Allan J. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia /J. Alllan, C. Wild, S. Rollinson, E. Willett, A. Moorman et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. – 20001. – N 98. – P. 11592–11597.
6. Di Quinzio M. Proteomic Analysis of Human Cervico-Vaginal Fluid Displays Differential Protein Expression in Association with Labor Onset at Term /M. Di Quinzio, M. Harry, S. Holdsworth-Carson, M. Ayhan, Y. Heng // J. Proteome Res. – 2008. – N7 (5). – P. 1916–1921.
7. Garite T.J. Management of premature rupture of membranes /T.J. Garite // J.Clinical Perinatology. – 2001. – Vol. 28. – P. 837–847.
8. Henderson C. Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase /C. Henderson, C. Wolf, N. Kitteringham, H. Powell, D. Otto et al. //Pi. Proc. Nat. Acad. Sci. – 2000. – Vol. 97. – P. 12741–12745.
9. Liang S. Prediction of spontaneous preterm labour in at-risk pregnant women /S. Liang, M. Di Quinzio, G. Fleming, M. Permezel, G. Rice, H. Georgiou// Reproduction. – 2013. – N 146. – P. 335–345.
10. Mustafa M. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor /M. Mustafa, R. Pathak, T. Ahmed et al.//Clinical Biochemistry. – 2010. – V. 43, I. 13–14. – P. 1124–1128.
11. Parveen F. Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women/ F. Parveen, R. Faridi1, V. Das, G. Tripathi, S. Agrawa//Molecular Human Reproduction. – 2010. – Vol. 16, No 3. – P. 207–214.
12. Sharma A. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations /A. Sharma, A. Pandey, S. Sharma, I. Chatterjee et al. /Meta Gene. – 2014. – Vol. 2. – P. 134–142 doi:10.1016/j.mgene.2013.12.003
13. Wang X. Molecular epidemiology of preterm delivery: methodology and challenges /X. Wang, B. Zuckermann, G. Kaufman et al. //Paediatr Pennal Epidemiol. – 2001. – Suppl. 2 – P. 63–77.
14. Wolfensberger A. Neonatal mortality and morbidity after aggressive long-term tocolysis for preterm premature rupture of membranes: a methodologic review /Wolfensberger A., Zimmermann R., Mandach U. //Fetal Diagn. Ther. – 2006. – N 21. – P. 366–373.

Статья поступила в редакцию 29.05.2015