



## ГЕНЕТИКА

УДК 616.12-007.2 – 053.1/2 – 07:575.113 (470.620)

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ Val432Leu ГЕНА CYP1B1, G590A ГЕНА NAT2 И C3435T ГЕНА ABCB1 У ДЕТЕЙ С ИЗОЛИРОВАННЫМ ДЕФЕКТОМ ПРЕДСЕРДНОЙ ПЕРЕГОРОДКИ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

**К.Ю. ЛАЗАРЕВ<sup>1</sup>**  
**О.П. БРАЙКО<sup>1</sup>**  
**В.И. ГОЛУБЦОВ<sup>1</sup>**  
**Я.Д. ШВЕЦОВ<sup>2</sup>**  
**А.В. ПОЛОНИКОВ<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> Кубанский государственный  
медицинский университет

<sup>2)</sup> Курский государственный  
медицинский университет

e-mail: polonikov@rambler.ru

В статье изучена ассоциация полиморфизмов Val432Leu гена CYP1B1, G590A гена NAT2 и C3435T гена ABCB1(MDR1) с предрасположенностью к дефекту предсердной перегородки у детей в Краснодарском крае. Установлены прогностически неблагоприятные сочетания генотипов CYP1B1432GG/NAT2590П, CYP1B1432GG/ABCB13435GG и NAT2590П/ABCB13435AA, для которых выявлены статистически значимые ассоциации с риском развития изолированного дефекта предсердной перегородки у детей.

Ключевые слова: врожденный дефект предсердной перегородки, ДНК-полиморфизм, наследственная предрасположенность, Краснодарский край, Val432Leu CYP1B1, G590A NAT2, C3435T ABCB1(MDR1).

Дефект предсердной перегородки (ДПП) – занимает одно из лидирующих мест в структуре врожденных пороков развития системы кровообращения (ВПР СК) в Краснодарском крае (16,7%) с частотой среди новорожденных 7,96‰ и имеет мультифакториальный генез [1]. Известны различные полиморфные гены, вовлеченные в формирование предрасположенности к мультифакториальной патологии, одними из которых являются гены ферментов детоксикации ксенобиотиков. Данная система генов биотрансформации ксенобиотиков представляют собой значительный интерес для исследований этиологии и патогенеза различных мультифакториальных заболеваний у человека [2].

В рамках настоящей работы нами изучены полиморфизмы трех генов системы детоксикации: CYP1B1 – фермент первой фазы, относящийся к группе семейства цитохромов P450 [3], NAT-2 – цитозольный фермент второй фазы, N-ацетилтрансфераза-2 и ABCB1 (MDR1) – фермент третьей фазы, участвующий в экскреции из клеток организма различных классов ксенобиотиков. Аллельные варианты указанных генов характеризуются различной активностью или экспрессией ферментов, от которых зависит эффективность детоксикации чужеродных химических веществ, что может играть важную роль в этиопатогенезе различных заболеваний.

Настоящее исследование было проведено с целью изучения ассоциаций полиморфизмов Val432Leu гена CYP1B1, G590A гена NAT2 и C3435T гена ABCB1 с с риском развития ДПП у детей Краснодарского края.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явились дети с ДПП (45 человек), родившиеся в 1998-2012гг., из 44 административных образований Краснодарского края. Средний возраст детей с ДПП составил  $3,10 \pm 0,14$  лет (13 мальчиков – 27% и 32 девочки – 73%). Группой контроля (232 человека) явились родители детей, не имеющие врожденных пороков развития, славянской национальности, уроженцев Краснодарского края.



У всех пробандов диагноз был верифицирован комплексом дополнительных методов обследования, включающих клинические методы с использованием физикального обследования, анкетирования, и специальные (ЭКГ, УЗИ, рентгенографии сердца и др.), а также клиничко-генеалогического, цитогенетического методов исследования.

Экстракция ДНК из замороженной крови проведена фенольно-хлороформным методом. Генотипирование полиморфизмов проводили методом полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с использованием TaqMan-зондов на приборе CFX96 Bio-Rad. По окончании денатурации (5 мин. при 95°C) выполняли 39 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 1 мин. при 48°C (для полиморфизма Val432Leu гена CYP1B1), 45 °C (для полиморфизма G590A гена NAT2) и 51,3°C (для полиморфизма C3435T гена ABCB1; денатурация – 15 сек при 95°C (последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 1).

Таблица 1

**Использованные праймеры и зонды (Синтол, Россия)**

Ген	Полиморфизм	Структура праймеров и зондов	Литература
CYP1B1	Val432Leu	F: 5'- tgt caa cca gtg gtc tgt gaa tc -3' R: 5'- tca ctc tgc tgg tca ggt cct t -3' 5'-FAM-accca(g-LNA)tgaagtgg-RTQ1-3' 5'-ROX-atgaccca(c-LNA)tgaagtg-BHQ2-3'	[6]
NAT2	G590A	F: 5'- ctgccaagaagaacacacaaaa -3' R: 5'- tggagacgtctgcaggatgtatt -3' 5'-FAM- acctc(g-LNA)aacaattg-RTQ1-3' 5'-ROX-tgaacctc(a-LNA)aacaatt-BHQ2-3'	[5]
ABCB1 (MDR1)	C3435T	F: 5'- ctgtttgactgcagcattgct -3' R: 5'- atgtatgtggcctctttgct -3' 5'-FAM-ccctcac(a - LNA)atctctt-RTQ1-3' 5'-ROX-ccctcac(g-LNA)atctctt-BHQ2-3'	[4,7]

Соответствие распределения генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в выборках больных и здоровых лиц использовали критерий  $\chi^2$ . Уровень статистической значимости различий между группами принимали  $p \leq 0,05$ . Об ассоциации аллелей и генотипов с предрасположенностью к ДПП судили по величине отношения шансов (OR). Границы 95%-го доверительного интервала (CI) для OR вычисляли методом В. Woolf.

**Обсуждение результатов.** Анализ распределения генотипов изучаемых полиморфных генов Val432Leu CYP1B1, G590A NAT2 и C3435T ABCB1(MDR1) показал, что распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ). Уровень аллельного разнообразия по данным локусам составил  $H_o = 0,42$  (для локуса Val432Leu и CYP1B1),  $H_o = 0,42$  (для локуса G590A NAT2),  $H_o = 0,56$  (для локуса C3435T ABCB1(MDR1)) среди индивидуумов с ДПП и  $H_o = 0,49$  (для локуса Val432Leu CYP1B1),

$H_o = 0,43$  (для локуса G590A NAT2),  $H_o = 0,53$  (для локуса C3435T ABCB1(MDR1)) в популяционной выборке. Распределение генотипов Val432Leu CYP1B1, как у индивидов с ДПП ( $\chi^2 = 1,09$ ; d.f.=1;  $p > 0,05$ ), так и в контрольной группе ( $\chi^2 = 0,13$ ; d.f.=1;  $p > 0,05$ ) соответствовали ожидаемым частотам при равновесии Харди-Вайнберга, распределение генотипов G590A NAT2 ( $\chi^2 = 0,13$ ; d.f.=1;  $p < 0,05$ ) и C3435T ABCB1(MDR1) ( $\chi^2 = 1,28$ ; d.f.=1;  $p < 0,05$ ) у детей с ДПП соответствовало ожидаемым частотам по сравнению с родительским контролем ( $\chi^2 = 0,18$ ; d.f.=1;  $p > 0,05$ ) и ( $\chi^2 = 0,78$ ; d.f.=1;  $p > 0,05$ ) (табл. 2).

В табл. 3 представлены частоты аллелей полиморфизмов Val432Leu гена CYP1B1, G590A гена NAT2 и C3435T ABCB1(MDR1) в группах больных ДПП и их родителей. Установлено статистически значимое различие в частотах аллелей полиморфизма Val432Leu гена CYP1B1 между группой больных ДПП и контроля ( $\chi^2 = 3,77$ ;  $p = 0,05$ ; OR=1,56, 95%CI=0,99-2,46).



Таблица 2

**Распределение генотипов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекса фиксации айта для генов системы детоксикации ксенобиотиков в исследованных группах**

Локусы, показатели		Больные ДПП	Контрольная группа	
Val432Leu CYP1B1	$\Sigma N$	45	232	
	N <sub>o</sub> (N <sub>e</sub> )	432AA	13 (11,25)	85(86,30)
		432AG	19 (22,50)	113 (110,39)
		432GG	13 (11,25)	34 (35,30)
	$\chi^2_{(HWE)}(p)$	1,09 (>0,05)	0,13 (>0,05)	
	H <sub>o</sub> (H <sub>e</sub> )	0,42 (0,50)	0,49 (0,48)	
D (t)	-0,16 (1,05)	+0,02 (0,33)		
G590A NAT2	$\Sigma N$	45	232	
	N <sub>o</sub> (N <sub>e</sub> )	590I I	19 (18,05)	105 (103,56)
		590IG	19 (20,90)	100 (102,89)
		590GG	7(6,05)	27 (25,56)
	$\chi^2_{(HWE)}(p)$	0,13 (>0,05)	0,18 (>0,05)	
	H <sub>o</sub> (H <sub>e</sub> )	0,42 (0,46)	0,43 (0,44)	
D (t)	-0,09 (0,54)	-0,03 (0,35)		
C3435T ABCB1	$\Sigma N$	45	232	
	N <sub>o</sub> (N <sub>e</sub> )	3435GG	15 (16,81)	64(67,35)
		3435GA	25 (21,39)	122(115,30)
		3435AA	5 (6,81)	46(49,35)
	$\chi^2_{(HWE)}(p)$	1,28 (>0,05)	0,78(>0,05)	
	H <sub>o</sub> (H <sub>e</sub> )	0,56 (0,48)	0,53 (0,50)	
D (t)	+0,17 (1,03)	+0,06(0,87)		

Примечание:  $\Sigma N$  – объем выборки; N<sub>o</sub> – наблюдаемое распределение фенотипов; N<sub>e</sub> – ожидаемое распределение фенотипов;  $\chi^2_{(HWE)}$  – показатель соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга; p – достигнутый уровень значимости для  $\chi^2_{(HWE)}$ ; H<sub>o</sub> – наблюдаемая гетерозиготность; H<sub>e</sub> – ожидаемая гетерозиготность; D – индекс фиксации Райта; t – критерий Стьюдента, характеризующий индекс фиксации

Таблица 3

**Распределение частот аллелей генов системы детоксикации ксенобиотиков в группах больных ДПП и их родителей (%)**

Исследуемая группа	Val432Leu CYP1B1		G590A гена NAT2		C3435T ABCB1	
	432A	432G	590 I	590 G	3435G	3435A
Больные ДПП (n=45)	50,0	50,0	63,3	36,7	61,1	38,9
Контрольная группа (n=232)	61,0	39,0	66,8	33,2	54,3	45,7
$\chi^2 (p) d.f.=1$	3,77 (0,05)		0,41 (0,52)		1,41 (0,23)	

Сравнительный анализ частот генотипов исследуемых полиморфизмов между группами больных ДПП и контроля установил статистически значимое различие в распределении генотипов полиморфизма Val432Leu гена CYP1B1 ( $\chi^2=5,42$ ; p=0,02; OR=2,37, 95%CI=1,13-4,96) (табл. 4).

Данные анализа парных сочетаний генотипов исследуемых полиморфизмов приведены в табл. 5. Установлено, что в качестве прогностически неблагоприятных комбинаций следует отметить варианты 432GG/590II, для которых выявлены статистически значимые различия NAT2 между группами больных ДПП и контроля в частотах генотипов полиморфизма Val432Leu CYP1B1 и полиморфизма G590A гена ( $\chi^2 =5,64$ , p=0,02; OR=2,92, 95%CI=1,17-7,31), а



также CYP1B1432GG/ABCB13435GG ( $\chi^2=4,83, p=0,03; OR=3,09, 95\%CI=1,08-8,84$ ), и NAT2590II/ABCB13435AA ( $\chi^2=5,16, p=0,02; OR=0,13, 95\%CI=0,02-1,01$ ).

Таблица 4

**Распределение частот генотипов полиморфизмов Val432Leu гена CYP1B1, G590A гена NAT2 и C3435T гена ABCB1 (MDR1) между группами больных ДПП и здоровых индивидов (абс., %)**

Исследуемая группа	Val432Leu CYP1B1			G590A NAT2			C3435T ABCB1 (MDR1)		
	432AA	432AG	432GG	590 II	590 IG	590 GG	3435GG	3435GA	3435AA
Больные ДПП (n=45)	13 (28,9)	19 (42,2)	13 (28,9)	19 (42,2)	19 (42,2)	7 (15,6)	15 (33,3)	25 (55,6)	5 (11,1)
Здоровые (n=232)	85 (36,6)	113 (48,7)	34 (14,7)	105 (45,3)	100 (43,1)	27 (11,6)	64 (27,6)	122 (52,6)	46 (19,8)
$\chi^2 (p)$ d.f. =1	0,99 (0,32)	0,64 (0,43)	5,42 (0,02)	0,14 (0,71)	0,01 (0,91)	0,54 (0,46)	0,61 (0,43)	0,13 (0,71)	1,91 (0,17)

Таким образом, при изучении полиморфного варианта 432GG полиморфизма Val432Leu гена CYP1B1 установлено статистически значимое различие в частотах аллелей и генотипов между группами больных ДПП и контроля ( $\chi^2=5,42; p=0,02; OR=2,37, 95\%CI=1,13-4,96$ ). В то же время полиморфные варианты G590A NAT2 и C3435T ABCB1 не показали статистически значимых различий между группами по частотам аллелей и генотипов трех исследованных локусов. Однако полученные данные по изучению сочетаний генотипов системы детоксикации ксенобиотиков показали, что варианты CYP1B1432GG/NAT2590II), CYP1B1432GG/ABCB13435GG и NAT2590II/ABCB13435AA являются вероятными прогностическими маркерами для выявления предрасположенности к врожденному изолированному ДПП. По всей видимости, указанные сочетания генов ферментов детоксикации вносят определенный вклад роль в нарушения процессов обезвреживания чужеродных химических веществ, метаболизируемых данными ферментами, что может иметь важное значение для развития данной формы порока сердца. Учитывая сложность патогенеза изучаемой нозологии необходимо продолжить поиск молекулярно-генетических маркеров и комбинаций генотипов предрасположенности к развитию врожденного изолированного ДПП.

Таблица 5

**Распределение частот комбинаций генотипов генов системы детоксикации ксенобиотиков в группах больных ДПП и здоровых индивидов абс, %**

Комбинации генотипов	Частоты комбинаций генотипов		Критерий различия $\chi^2 (p)$	OR (95% CI)
	Больные ДПП (n=45)	Контрольная группа (n=232)		
CYP1B1432AA/NAT2 590 II	4 (8,9)	37 (15,9)	1,49 (0,22)	0,51 (0,17-1,52)
CYP1B1432AA/NAT2 590 IG	6 (13,3)	36 (15,5)	0,14 (0,71)	0,84 (0,33-2,12)
CYP1B1432AA/NAT2 590 GG	3 (6,7)	13 (5,6)	0,08 (0,78)	1,20 (0,33-4,41)
CYP1B1432AG/NAT2 590 II	8 (17,8)	53 (22,8)	0,56 (0,45)	0,73 (0,32-1,66)
CYP1B1432AG/NAT2 590 IG	9 (20,0)	49 (21,1)	0,03 (0,87)	0,93 (0,42-2,07)
CYP1B1432AG/NAT2 590GG	2 (4,4)	11 (4,7)	0,01 (0,93)	0,93 (0,20-4,37)
CYP1B1432GG/NAT2 590 II	8 (17,8)	16 (6,9)	5,64 (0,02)	2,92 (1,17-7,31)
CYP1B1432GG/NAT2 590 IG	4 (8,9)	13 (5,6)	0,71 (0,40)	1,64 (0,51-5,29)
CYP1B1432GG/NAT2 590 GG	1 (2,2)	4 (1,7)	0,05 (0,82)	1,30 (0,14-11,87)
CYP1B1432AA/ABCB1 3435GG	3 (6,7)	27 (11,6)	0,96 (0,33)	0,54 (0,16-1,87)



CYP1B1432AA/ ABCB1 3435GA	7 (15,6)	38 (16,4)	0,02 (0,89)	0,94 (0,39-2,26)
CYP1B1432AA/ ABCB1 3435AA	2 (4,4)	19 (8,19)	0,75 (0,39)	0,52 (0,12-2,32)
CYP1B1432AG/ABCB1 3435GG	6 (13,3)	25 (10,8)	0,25 (0,62)	1,27 (0,49-3,31)
CYP1B1432AG/ABCB1 3435GA	12 (26,7)	66 (28,4)	0,06 (0,81)	0,91 (0,45-1,88)
CYP1B1432AG/ABCB1 3435AA	2 (4,4)	21 (9,1)	1,05 (0,31)	0,47 (0,11-2,07)
CYP1B1432GG/ABCB1 3435GG	6 (13,3)	11 (4,7)	4,83 (0,03)	3,09 (1,08-8,84)
CYP1B1432GG/ ABCB1 3435GA	6 (13,3)	21 (9,1)	0,79 (0,38)	1,55 (0,59-4,08)
CYP1B1432GG/ABCB1 3435AA	1 (2,2)	4 (1,7)	0,05 (0,82)	1,30 (0,14-11,87)
NAT2 590 II/ABCB1 3435GG	8 (17,8)	21 (9,1)	0,54 (0,46)	1,38 (0,58-3,26)
NAT2 590 II/ABCB1 3435GA	8 (17,8)	59 (25,4)	0,24 (0,62)	0,81 (0,35-1,87)
NAT2 590 II/ ABCB1 3435AA	1 (2,2)	26 (11,2)	5,16 (0,02)	0,13 (0,02-1,01)
NAT2 590 IG/ABCB1 3435GG	6 (13,3)	35 (15,1)	0,002 (0,96)	1,02 (0,40-2,63)
NAT2 590 IG/ ABCB1 3435GA	11 (24,4)	49 (21,1)	0,26 (0,61)	1,22 (0,57-2,59)
NAT2 590IG/ ABCB1 3435AA	3 (6,7)	16 (6,9)	0,04 (0,85)	0,88 (0,25-3,17)
NAT2 590 GG/ ABCB1 3435GG	1 (2,2)	7 (3,0)	0,02 (0,88)	1,19 (0,13-10,93)
NAT2 590 GG/ ABCB1 3435GA	6 (13,3)	16 (6,9)	2,41 (0,12)	2,20 (0,80-6,07)
NAT2 590 GG/ ABCB1 3435AA	1 (2,2)	3 (1,3)	0,54 (0,46)	2,41 (0,21-27,16)

### Литература

1. Лазарев К.Ю., Голубцов В.И., Полоников А.В., Брайко О.П., Панкова Е.Е., Матулевич С.А. Анализ структуры и распространенности изолированных врожденных пороков развития системы кровообращения среди новорожденных Краснодарского края (по результатам мониторинга 1998-2009гг). // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – №2(125). – С.95-100.
2. Полоников А.В., Иванов В.П., Солодилова М.А. Эколого-токсикогенетическая концепция мультифакториальных заболеваний: от понимания этиологии до клинического применения. // Медицинская генетика – 2008. №11. – С.3-19.
3. Пономаренко Т.С., Сычев Д.А., Чикало А.О., Бердникова Н.Г., Кукес В.Г. Система цитохрома P450 в легких: роль в патогенезе заболеваний и фармакокинетики лекарственных средств // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – №1. С. 25-28.
4. Alessio Provenzani, Monica Notarbartolo, Manuela Labbozzetta, Paola Poma, Fillipo Biondi, Rosario Sanguedolce, Giovanni Vizzini, Ugo Palazzo, Piera Polidori, Fabio Triolo, Bruno Gridelli, Natale D`Alessanoro The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients. // Ann transplant. – 2009. – Vol. 14(1). – P. 23-31.
5. David W. Hein, Mark A.Doll. Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. // Pharmacogenomics. – 2012. – Vol. – 13(1). – P. 31-41.
6. Gehan A., El-Shennawy, Abd-Alla A. Elbially, Anwar E. Isamil, Manal M. Elbehery. Is Genetic Polymorphism of ESR1, CyP1A1 and CYP1B1 Risk Factor for Development of Uterine Leiomyoma? // Egyptian Journal of Medical Microbiology. – 2010. – Vol. – 19 (1). – P. 19-26.
7. Robert A.M. Op den Buijsch, Maarten H.L. Christiaans, Leo M.L. Stolk, Johan E. De Vries, Chi Yuen Cheung, Nas A. Undre, Johannes P. Van Hooff, Marja P. Van Diejen-Visser, Otto Bekers. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms // Fundamental & Clinical Pharmacology. – 2007. – Vol. 21(4) – P. 427-435.



**THE MOLECULAR GENETIC ANALYSIS  
OF POLYMORPHISMS Val432Leu GENE CYP1B1, G590A GENE NAT2 AND C3435T GENE  
ABCB1(MDR1) IN CHILDREN WITH THE ISOLATED ATRIAL DEFECT IN KRASNODAR REGION**

**K.U. LAZAREV<sup>1</sup>**  
**O.P. BRAYKO<sup>1</sup>**  
**V.I. GOLUBCOV<sup>1</sup>**  
**Y.D. SHVETSOV<sup>2</sup>**  
**A.V. POLONIKOV<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> *Kuban States Medical University*

<sup>2)</sup> *Kursk States Medical University*

*e-mail: polonikov@rambler.ru*

The associations of polymorphisms Val432Leu of the CYP1B1 gene, G590A of the NAT2 gene and C3435T of the ABCB1 gene with atrial defect in children from Krasnodar region were studied. It is established that as the genotype combinations CYP1B1432GG/NAT2590II, CYP1B1432GG/ABCB13435GG and NAT2590II/ABCB13435AA were found to be associated with the risk of the disease.

Keywords: congenital atrial septal defect, DNA polymorphism, Krasnodar region, children, Val432Leu CYP1B1, G590A NAT2, C3435T ABCB1(MDR1).