

УДК 575.174.015.3:616.12-007-053.1

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА R554K ГЕНА АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА (AHR) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ВРОЖДЕННЫХ ДЕФЕКТОВ МЕЖПРЕДСЕРДНОЙ И МЕЖЖЕЛУДОЧКОВОЙ ПЕРЕГОРОДОК СЕРДЦА

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

¹ Курский государственный медицинский университет, Курск;

² Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

E-mail: shvecov.miogu@rambler.ru

В рамках настоящего исследования была впервые изучена связь полиморфного варианта R554K гена *AHR* с развитием врожденных пороков межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца плода. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 151 неродственных детей славянского происхождения (жители Краснодарского края) с врожденными пороками межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца, рожденных в родильных домах Краснодарского края и 219 здоровых детей. Генотипирование полиморфизма R554K гена *AHR* проводили методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма R554K гена *AHR* не выявил ассоциации с развитием врожденных пороков межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца плода. Тем не менее нельзя исключить возможность участия гена *AHR* в формировании наследственной предрасположенности к врожденным порокам сердца.

Ключевые слова: врожденные пороки межпредсердной и межжелудочковой перегородок сердца плода, ДНК-полиморфизм, арил-гидрокарбонный рецептор.

RESEARCH OF ASSOCIATION OF ARYL-HYDROCARBON RECEPTOR GENE (*AHR*) R554K POLYMORPHISM WITH RISK OF DEVELOPING CONGENITAL ATRIAL AND VENTRICULAR SEPTAL DEFECTS

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

¹ Kursk State Medical University, Kursk; ² Kuban State Medical University, Krasnodar

The present research for the first time investigates the connection of polymorphic variant R554K of *AHR* gene with the development of congenital atrial and ventricular septal defects of fetus. The material for study was DNA samples of 151 unrelated children of Slavic origin (residents of the Krasnodar region) with congenital atrial and ventricular septal defects, born in maternity hospitals of Krasnodar region and 219 healthy children. Genetic typing of *AHR* gene R554K polymorphisms was performed by polymerase chain reaction in real time using TaqMan-probes. A comparative analysis of allele frequencies and genotypes of *AHR* gene R554K polymorphism showed no association with the development of congenital atrial and ventricular septal defects in fetus. However, we cannot exclude the possibility of *AHR* gene involvement in the development of inherited predisposition to congenital heart defects.

Keywords: congenital atrial and ventricular septal defects in fetus, DNA polymorphism, aryl-hydrocarbon receptor.

Врожденный порок сердца (ВПС) является наиболее частым врожденным дефектом, обуславливающим большее число смертей детей в первый год жизни в сравнении с другими патологическими состояниями [11]. Дефекты межпредсердной и межжелудочковой перегородок являются наиболее распространенным пороком сердечно-сосудистой системы, обнаруживаемым более чем у 1 из 1000 новорожденных [11, 12]. Так дефект межжелудочковой перегородки сердца составляет 50% детей с ВПС [9] и выявляется в качестве изолированного поражения у 20% пораженных детей [20].

Несмотря на значительные достижения в диагностике и хирургическом лечении ВПС, этиология пороков по-прежнему остается малоизученной стороной данной патологии. Крупные исследования среди новорожденных, такие как исследование «Балтимор-Вашингтон», обнаружили, что ВПС представляет собой мультифакториаль-

ную патологию, возникающую в результате совместного влияния генетической предрасположенности и факторов окружающей среды [7]. Секвенирование генома человека и достижения биотехнологий существенно расширили наши представления о роли генетических факторов в развитии ВПС. К настоящему времени установлено множество генов, ассоциированных с риском развития ВПС. В частности, предполагается, что транскрипционные факторы могут играть важную роль в процессе развития сердца и тем самым вносить вклад в формирование предрасположенности к ВПС [10]. Так, некоторые факторы транскрипции контролируют экспрессию различных классов генов и на молекулярном уровне, опосредуют ответную реакцию различных физиологических систем организма на воздействие вредных факторов окружающей среды.

Арил-гидрокарбонный рецептор человека (*AHR*) является представителем семейства тран-

скрипционных факторов [24]. Ген *AHR* преимущественно экспрессируется в плаценте, легких, сердце, поджелудочной железе и печени [6]. Ген *Ahr* является достаточно полиморфным: обнаружен 931 полиморфизм гена *AHR*. Наиболее распространенным и широко исследуемым однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) является аминокислотная замена R554K [13]. *AHR* активируется под действием полициклических ароматических углеводородов внешней среды, таких как 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксин (TCDD), 3-метилхлорантрен (ЗМС), и β -нафтофлаван (BNF) [14, 5]. Активация арил-гидрокарбонового рецептора в ответ на TCDD и других агонистов ксенобиотиков непосредственно затрагивает несколько метаболических путей, участвующих в регуляции сигнальных факторов роста, клеточного цикла пролиферации, дифференциации и апоптоза. В цитозоле *AHR* образует комплекс с белком теплового шока, ко-шапероном p23 и иммунофилин-подобным белком XAP2. После связывания с лигандами (примером которого может служить 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксин (2,3,7,8-TCDD)) и ассоциации со своим ядерным транслокатором - Arnt, *AHR* перемещается в ядро и связывается с ксенобиотик-чувствительными элементами (XRE), обнаруженными в регуляторных областях различных генов. *AHR*-лиганды способны активировать транскрипцию генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 и UGT1A6 посредством XRE-элементов, расположенных в участках энхансеров этих генов [22, 21, 27, 25, 26, 23].

Сигнальный путь арил-гидрокарбонового рецептора (*AHR*) играет важную роль в контроле над процессами пролиферации клеток во время внутриутробного развития плода, в связи с чем изменения молекулярной передачи сигналов могут нарушать регуляцию экспрессии генов и способствовать формированию морфогенетических отклонений [5].

В рамках настоящего исследования впервые проведен анализ ассоциации полиморфизма R554K гена *AHR* с развитием врожденных пороков межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК неродственных детей (151 ребенок) славянского происхождения (преимущественно русской национальности) с врожденными пороками межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца, рожденных в родильных домах Краснодарского края, и 219 здоровых детей, со-

ставивших группу контроля и не имеющих врожденных пороков развития. Сбор материала производился из 44 административных образований Краснодарского края за период 1998-2012 гг. Группа больных ВПС детей включала 55 мальчиков и 96 девочек (36% и 64%); в контрольной – 104 мальчика и 115 девочек (47,5% и 52,5%). Верификация диагноза ДМЖП и ДМПП проводилась квалифицированными врачами-педиатрами с использованием комплексного обследования, включающего клинические методы: объективное обследование; анкетирование и специальные (ЭКГ, УЗИ, рентгенография сердца и др.), а также клинико-генеалогическое и цитогенетическое исследования [1]. У всех обследуемых выделение ДНК проводилось из размороженной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [3]. Генотипирование полиморфизма R554K гена *AHR* проводили методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов для дискриминации аллелей (рисунок 1). ПЦР осуществляли на амплификаторе CFX96 фирмы Bio-Rad (США). Для амплификации интересующих участков гена *AHR* использовались праймеры и зонды, синтезированные в компании «Синтол» (Россия). Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга (PXB) и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в выборках больных ВПС и здоровых детей использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность [2]. Уровень статистической значимости различий между группами принимали $p \leq 0,05$. Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов Statistica 7.0 («StatSoft») и MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение частот генотипов изучаемого полиморфизма и его соответствие популяционному равновесию Харди-Вайнберга проводилось отдельно в группе детей с ДМПП и ДМЖП и в контрольной группе. Установлено, что статистически значимого отклонения в распределении частот генотипов *AHR* от равновесия Харди-Вайнберга ни в группе больных ВПС, ни в группе контроля не обнаружено ($p > 0,05$). Результаты межгруппового сравнительного анализа частот аллелей и генотипов *AHR* представлены в таблице 1. Как видно из таблицы 1, аллели и генотипы полиморфизма R554K гена *AHR* не были ассоциированы с риском развития ДМПП и ДМЖП.

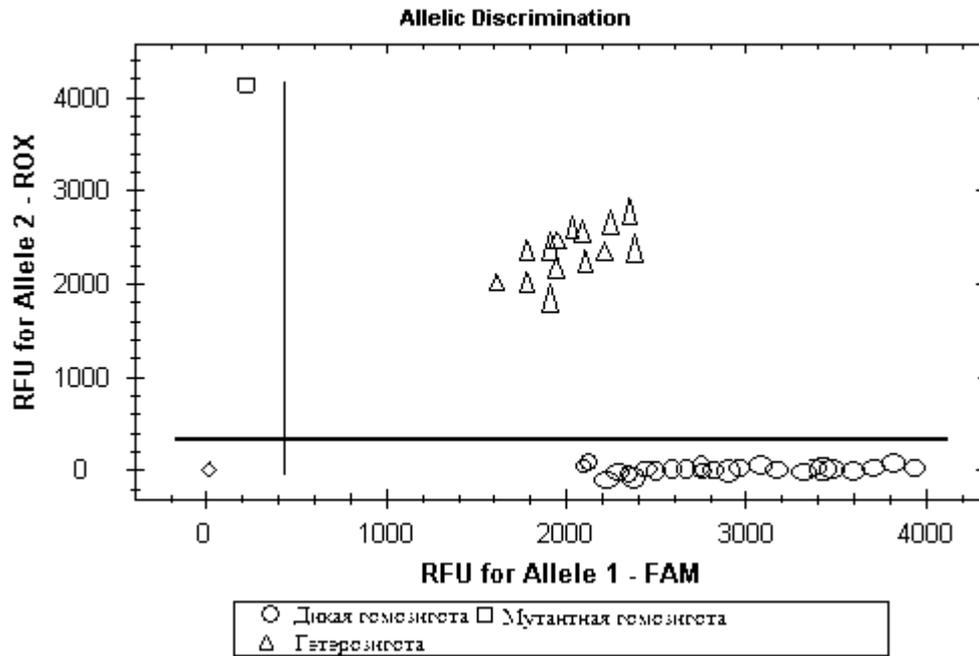


Рис. 1. Генотипирование полиморфизма R554K гена *AHR* методом ПЦР и аллельной дискриминации с помощью TaqMan-зондов.

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма R554K гена *AHR* у больных с ДМПП и ДМЖП и здоровых детей

Аллели	Частоты аллелей						Критерий различий (p)
	ДМПП (n=48)		ДМЖП (n=103)		Контроль (n=219)		
554R	0,896		0,927		0,922		0,18
554K	0,104		0,073		0,078		0,72
Генотипы	Частоты генотипов						
	n	%	n	%	n	%	
554RR	38	79,2	88	85,4	189	86,3	0,45
554RK	10	20,8	15	14,6	26	11,9	0,20
554KK	0	0	0	0	4	1,8	0,25

Таблица 2

Распределение частот генотипов полиморфизма гена *AHR* R554K в группах больных с врожденными пороками сердца и здоровых детей в зависимости от пола

Исследуемая группа	Мальчики/Девочки						
	АНR R554K			Исследуемая группа	АНR R554K		
	554RR	554RK	554KK		554RR	554RK	554KK
Больные мальчики с ДМПП (n=15)	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0 (0%)	Больные мальчики с ДМЖП (n=40)	36 (90,0%)	4 (10,0%)	0 (0%)
Здоровые мальчики (n=104)	89 (85,6%)	14 (13,5%)	1 (1,0%)	Здоровые мальчики (n=104)	89 (85,6%)	14 (13,5%)	1 (1%)
p	0,57	0,78	0,26	p	0,48	0,78	0,62
Больные девочки с ДМПП (n=33)	26 (78,8%)	7 (21,2%)	0 (0%)	Больные девочки с ДМЖП (n=63)	52 (82,5%)	11 (17,5%)	0 (0%)
Здоровые девочки (n=115)	100 (87,0%)	12 (10,4%)	3 (2,6%)	Здоровые девочки (n=115)	100 (87,0%)	12 (10,4%)	3 (2,6%)
p	0,24	0,18	0,81	p	0,40	0,18	0,49

Учитывая возможность полового диморфизма, представлялось важным провести стратифицированный анализ ассоциаций полиморфизма R554K гена *AHR* отдельно у девочек и мальчиков. Результаты сравнительного анализа частот аллелей и генотипов в зависимости от пола представлены в таблице 2.

Стратифицированный анализ по полу частот исследуемого полиморфизма R554K гена *AHR* не позволил выявить ассоциацию с риском развития ДМПП и ДМЖП в зависимости от пола.

Известно, что *AHR* играет важную роль в развитии сердечно-сосудистой системы и в токсичности TCDD. Кроме того, дефект гена *AHR* у животных моделей способствует нарушению сердечно-сосудистого гомеостаза, развитию гипертрофии сердца и формированию сердечного фиброза, повышению уровней экспрессии генов, регулирующих сосудистый гомеостаз и влияет на уровень артериального давления [17, 18, 19]. У млекопитающих *AHR* также участвует в морфогенезе челюстно-лицевой, мочевыделительной и сердечно-сосудистой систем [4, 8, 16].

В рамках настоящего исследования была впервые изучена связь полиморфного варианта R554K гена *AHR* с развитием врожденных пороков межпредсердной и межжелудочковой перегородки сердца плода.

Хотя нами не была выявлена взаимосвязь полиморфизма, тем не менее нельзя исключить возможность участия гена *AHR* в формировании наследственной предрасположенности к врожденным порокам сердца. Во-первых, ассоциация полиморфизма R554K гена *AHR* с ВПС может маскироваться эффектами других генов – как *AHR*-каскада, так и биотрансформации ксенобиотиков, вследствие эпистатических взаимодействий между этими генами. Во-вторых, нельзя исключить сочетанное влияние гена и токсигенных средовых факторов на риск формирования патологии – так называемых генно-средовых взаимодействий. Учитывая вышесказанное, а также преимущественно мультифакториальную природу несиндромальных форм ВПС, дальнейшие исследования должны быть нацелены на поиск вовлеченности других генов сигнального каскада арилгидрокарбонового рецептора совместно с оценкой химических факторов окружающей среды (в частности, полициклических ароматических углеводородов), которые могут иметь этиологическое значение на риск развития пороков развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Брайко О.П., Лазарев К.Ю., Швецов Я.Д., Голубцов В.И., Полоники А.В.* Анализ ассоциаций полиморфизмов g590a гена NAT2 и c3435t гена ABCB1 у детей с изолированным дефектом межжелудочковой перегородки в Краснодарском крае // Курск. научн.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2013. – № 4. – С. 15-20.
2. *Вейр Б.* Анализ генетических данных. Дискретные генетические признаки. – М.: Мир, 1995. – С. 85-104.
3. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д.* Методы генетической инженерии // В кн. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
4. *Birnbaum L.S., Harris M.W., Stocking L.M., Clark A.M., Morrissey R.E.* Retinoic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin selectively enhance teratogenesis in C57BL/6N mice // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1989. – Vol. 98. – P. 487-500.
5. *Denison M.S., Nagy S.R.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals // Pharmacol. Toxicol. – 2003. – Vol. 43. – P. 309-334.
6. *Dolwick K.M., Swanson H.I., Bradfield C.A.* In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1993. – Vol. 90. – P. 8566-8570.
7. *Ferencz C., Rubin J.D., Loffredo C.A., Magee C.M.* The epidemiology of congenital heart disease, The Baltimore-Washington Infant Study (1981-1989). Perspectives in Pediatric Cardiology. – Mount Kisco, NY, 1993. – Vol. 4.
8. *Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D.M., McPhail T., Lee S.S., Kimura S., Nebert D.W., Rudikoff S., Ward J.M., and Gonzalez F.J.* Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor // Science. – 1995. – Vol. 268. – P. 722-726.
9. *Fyler D.C.* Ventricular septal defect // Nadas' Pediatric Cardiology. – Philadelphia, Pa: Hanley & Delfus, Inc., 1992. – P. 435-457.
10. *Hinton R.B. Jr., Yutzey K.E., Benson D.W.* Congenital heart disease: Genetic causes and developmental insights // Progress in Pediatric Cardiology. – 2005. – Vol. 20. – P. 101-111.
11. *Hoffman J., Kaplan S.* The incidence of congenital heart disease // J. Am. Coll. Cardiol. – 2002. – Vol. 39. – P. 1890-1900.
12. *Hoffman J.I.* Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence // Pediatr. Cardiol. – 1995. – Vol. 16. – P. 103-113.
13. *Kaname K., Junko W., Hidetaka E., Kei N., Chikako K., Shin-ichi H.* Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer // Pharmacogen. and genom. – 1995 – Vol. 5 – P. 151-158.
14. *Kern P.A., Fishman R.B., Song W., Brown A.D., Fonsaca V.* The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver // Toxicology. – 2002. – Vol. 171. – P. 117-125.
15. *Koyano S., Saito Y., Fukushima-Uesaka H., Ishida S., Ozawa S., Kamatani N., Minami H., Ohtsu A., Hamaguchi T.* Functional analysis of six human aryl hydrocarbon receptor variants in a Japanese population // Am. Soc. for Pharm. and Exp. Therap. – 2005. – Vol. 33. – P. 1254-1260.

16. *Lahvis G.P., Pyzalski R.W., Glover E., Pitot H.C., McElwee M.K., and Bradfield C.* The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 67. – P. 714-720.
17. *Lund A.K., Peterson S.L., Timmins G.S., and Walker M.K.* Endothelin-1-mediated increase in reactive oxygen species and NADPH Oxidase activity in hearts of aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice // *Toxicol. Sci.* – 2005. – Vol. 88. – P. 265-273.
18. *Lund A.K., Goens M.B., Kanagy N.L., and Walker M.K.* Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 193. – P. 177-187.
19. *Lund A.K., Goens M.B., Nunez B.A., and Walker M.K.* Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 212. – P. 127-135.
20. *Moller J.H., Moodie D.S., Bles M., Norton J.B., Nouri S.* Symptomatic heart disease in infants: comparison of three studies performed during 1969–1987 // *Pediatr. Cardiol.* – 1995. – Vol. 16. – P. 216-222.
21. *Munzel P.A., Schmohl S., Heel H., Kälberer K., Bock-Hennig B.S., Bock K.W.* Induction of Human UDP Glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-Butylhydroquinone and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in Caco-2 Cells // *Drug Metab. Dispos.* – 1999. – Vol. 27. – P. 569-573.
22. *Quattrochi L.C., Vu T., Tukey R.H.* The human CYP1A2 gene and induction by 3-ethylcholanthrene // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 6949-6954.
23. *Sugatani J., Nishitani S., Yamakawa K., Yoshinari K., Sueyoshi T., Negishi M.* Transcriptional Regulation of Human UGT1A1 Gene Expression: Activated Glucocorticoid Receptor Enhances constitutive Androstane Receptor/Pregnane X Receptor-Mediated UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Regulation with Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1 // *Mol. Pharm.* – 2005. – Vol. 67. – P. 845-855.
24. *Takahata S., Sogawa K., Kobayashi A., Ema M., Mimura J., Ozaki N.* Transcriptionally Active Heterodimer Formation of an Arnt-like PAS Protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and Clock // *Bioch. bioph. res. Commun.* – 1998. – Vol. 248. – P. 789-794.
25. *Whitlock J.P.* Induction of cytochrome P4501A1 // *Annu. Rev. Toxicol.* – 1999. – Vol. 39. – P. 103-125.
26. *Yueh M., Huang Y., Chen S., Nguyen N., Tukey R.* Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 15001-15006.
27. *Zhang R., Zuckerman J.H., Giller C.A., Levine B.D.* Transfer function analysis of dynamic cerebral autoregulation in humans // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274. – P. 233-241.