

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Мусалаева И.О.¹, Тарасенко Е.В.¹, Азова М.М.¹, Галина Т.В.¹, Мяндина Г.И.¹, Оленев А.С.²

Роль полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* в инициации преждевременных родов

¹ Российский университет дружбы народов, медицинский институт, 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы, Перинатальный центр, 127287, г. Москва, Россия, 4-й Вятский переулок, д. 39

Причины спонтанных преждевременных родов до конца не изучены. К факторам риска спонтанных преждевременных родов относятся: акушерско-гинекологический анамнез, осложнения текущей беременности, наличие инфекционных осложнений, генетическая предрасположенность, социальные причины, сопутствующие заболевания. Одним из таких факторов риска может быть полиморфный вариант *G-105A* гена селенопротеина S (*SEPS1*), который может рассматриваться как претендент на роль нового маркера воспаления. **Цель исследования** — изучение ассоциации полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* с риском преждевременных родов у женщин европейской популяции в городе Москве. **Методы.** В исследование включены 33 женщины с преждевременными родами на сроках от 23,5 до 37 недель беременности и 29 женщин с доношенной беременностью (контрольная группа). Исследование проводилось после получения информированного согласия от пациентов. Генотипирование полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* осуществляли методом ПЦР-ПДРФ анализа. **Результаты.** В проведенном исследовании было показано, что частота встречаемости аллеля А полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* 2.0 раза выше у женщин с преждевременными родами чем в контрольной группе. Впервые выявлены статистически значимые различия в частотах генотипов полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* между контрольной и исследуемой группами ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.0477$ и по критерию Z ($t = 2.07$, $p = 0.0431$)). **Выводы.** В случае подтверждения полученных результатов полиморфный вариант гена *G-105A* *SEPS1* может быть использован для скрининга высокого риска преждевременных родов у женщин на ранних сроках беременности.

Ключевые слова: преждевременные роды, спонтанные преждевременные роды, воспаление, генетические маркеры.

Для цитирования: Мусалаева И.О., Тарасенко Е.В., Азова М.М., Галина Т.В., Мяндина Г.И., Оленев А.С. Роль полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* в инициации преждевременных родов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 77—81.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.77-81

Для корреспонденции: Мусалаева Индира Омаровна, e-mail: i700@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.01.18

Musalaeva I.O.¹, Tarasenko E.V.¹, Azova M.M.¹, Galina T.V.¹, Myandina G.I.¹, Olenev A.S.²

The role of polymorphous variant *G-105A* of *SEPS1* gene in the initiative of premature birth

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya St, 117198, Moscow, Russia

² City Clinical Hospital No. 24 DZM, Perinatal Center, 4th Vyatsky pereulok, 39, 127287 Moscow, Russia

Causes of spontaneous preterm birth are not fully understood. Risk factors for spontaneous preterm labor include obstetric and gynecological anamnesis, complications of current pregnancy, presence of infectious complications, genetic predisposition, social reasons, accompanying illnesses. One of these risk factors may be the polymorphic variant of the *G-105A* of the selenoprotein S (*SEPS1*) gene, which can be considered as a candidate for the role of a new marker of inflammation. **The aim** of the study was to study the association of the polymorphic variant *G-105A* of the *SEPS1* gene with the risk of premature birth in women of the European population in Moscow. **Methods.** The study included 33 women with preterm delivery at terms from 23.5 to 37 weeks of pregnancy and 29 women with full term pregnancy (control group). The study was conducted after obtaining informed consent from patients. Genotyping of polymorphic variant *G-105A* of *SEPS1* gene was carried out by PCR-RFLP analysis. **Results.** In the study, it was shown that the incidence of allele A of polymorphic variant *G-105A* of the *SEPS1* gene is 2.0 fold higher in women with premature birth than in the control group. For the first time, statistically significant differences in the genotype frequencies of the polymorphic variant *G-105A* of the *SEPS1* gene were

established between the control and the study groups ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.0477$ and according to the Z (t = 2.07, $p = 0.0431$) test). **Conclusions.** Such findings can assume that polymorphous variant G-105A of *SEPS1* gene may be a potential gene marker for preterm birth.

Key words: preterm birth; spontaneous preterm birth; inflammation; gene marker.

For citation: Musalaeva I.O., Tarasenko E.V., Azova M.M., Galina T.V., Myandina G.I., Olenev A.S. The role of *SEPS1* G-105A gene polymorphism in the initiation of premature birth. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 77—81. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.77-81

For correspondence: Musalaeva Indira Omarovna, e-mail: i700@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Musalaeva I.O., <http://orcid.org/0000-0001-6588-5653>

Received 11.01.18

Введение

По данным ВОЗ (2014 г.), ежегодно рождается порядка 15 миллионов недоношенных детей. Преждевременными считаются роды, наступившие в сроки беременности от 22 до 37 недель. С преждевременными родами (ПР) связано порядка 75% случаев перинатальной смертности. Причины спонтанных преждевременных родов (СПР) до конца не изучены. К факторам риска СПР относятся: акушерско-гинекологический анамнез (гинекологические заболевания, исходы предыдущих беременностей и родов), осложнения текущей беременности, гестозы, многоплодие, многоводие, предлежание плаценты), социальные причины (возраст, вредные привычки, условия жизни), сопутствующие заболевания (пороки сердца, заболевания почек, острые инфекционные заболевания). Частота ПР в разных странах составляет 5—12% [1]. По данным разных авторов порядка 40% СПР обусловлено наличием инфекции [2]. У 80% детей, родившихся в срок до 30-й недели беременности, диагностируется гистологически верифицированный хориоамнионит [3].

Воспалительные процессы играют значимую роль в развитии многих заболеваний. К настоящему времени идентифицировано достаточно большое количество генов, продукты которых могут считаться маркерами воспаления, либо которые напрямую связаны с реализацией инфекционных процессов в организме [4]. Таким образом, известно более 200 цитокинов (интерлейкины (*IL*), факторы некроза опухолей (*TNF- α*), интерфероны, факторы роста), также маркерами воспаления являются С-реактивный белок, трансформирующий ростовой фактор (*TGF- β*) и многие другие. Активное изучение полиморфных вариантов генов интерлейкинов позволило установить взаимосвязь между различными аллельными вариантами этих генов с развитием ПР, развитием астмы, онкологиче-

ских заболеваний, вирусного гепатита, ревматоидного артрита и многих других заболеваний. В настоящее время накоплено большое количество данных о роли воспаления в развитии преждевременных родов [5, 6]. Так, например, выявлена корреляция полиморфизма генов *IL-1 β* , толл-подобных рецепторов (*TLR*) с невынашиванием беременности и преждевременными родами [5, 7, 8, 9, 10]. В человеческом организме существует особый класс белков — селенопротеины, один из которых, *SEPS1* может рассматриваться как претендент на роль нового маркера воспаления. Белки селенопротеины содержат один или несколько остатков селеносодержащей аминокислоты селеноцистеина и выполняют разнообразные функции. Так, селенопротеин Р входит в состав плазмы крови и отвечает за безопасный транспорт химически активного селена по организму, а глутатионпероксидазы защищают ткани организма от окислительного повреждения и представляют собой селеносодержащие гликопротеины.

В семействе селенопротеинов особым нестандартным протеином является селенопротеин S. Он оказывает влияние на иммунные и воспалительные сигнальные пути [10]. Селенопротеин S может быть классифицирован как новый мембранный протеин предотвращающий стрессовый ответ на активацию воспалительного каскада. В гене *SEPS1* обнаружено несколько полиморфизмов, на настоящий момент практически не изученных. Для полиморфного варианта G-105A (*rs28665122*) гена *SEPS1* показана корреляция с риском возникновения преждевременных родов у женщин в китайской популяции [11], риском развития рака желудка у японцев и китайцев [5, 10], риском развития рака легких у норвежцев [6]. В то же время есть данные, что в зависимости от этнической принадлежности и различного влияния экологии генетические проявления могут различаться [12].

Поскольку исследования полиморфного варианта G-105A (rs28665122) гена SEPS1 в Российской Федерации не проводились, представляется весьма актуальным изучение ассоциации данного полиморфного варианта гена с преждевременными родами в московской популяции.

Методика

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288).

В данное исследование были включены 33 женщины с преждевременными родами на сроках от 23,5 до 37 недель беременности. В качестве контрольной группы выступали 29 женщин с доношенной беременностью. Исследование проводилось при получении письменного информированного согласия пациентов.

Кровь для исследования забирали у пациенток родильных домов №29 и №8. Кровь собирали в пробирки с EDTA и хранили при температуре — 20°C. ДНК выделяли из лейкоцитов крови наборами «ДНК-экспресс-кровь» производства ООО «Синтол».

Для анализа полиморфного варианта G-105A (rs28665122) гена SEPS1 использовался метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ, RFLP-restriction fragment length polymorphism).

Реакцию ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси содержащей 20 нг ДНК, 0,2 мкм каждого праймера, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфата и 0,5 ед Таg-полимеразы в 1x буфере (ООО «Синтол»). Амплификацию проводили по программе: 95°C — 2 мин; 35 циклов (94°C — 30 с; 57°C — 30 с; 72°C — 30 с и 72°C — 7 мин). ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). В работе были использованы следующие праймеры: прямой 5'-TCSTTGGCTTCAGTGTCCAAT-3' и обратный 5'-CGCGGACAGAGACTCCTCTT-3' [5]. Обязательно ставили негативный контроль, содержащий вместо матрицы деионизованную воду. Далее амплифицированный фрагмент ДНК длиной 370 н.п. подвергали обработке эндонуклеазой Mox20 I (НПО «Сибэзним») [5]. Расщепление ДНК проводили в объеме 20 мкл в рекомендованном производителем буфере и соответствующей температуре в течение 1,5 часов. Проверка полноты расщепления ДНК рестриктазами осуществлялась путём расщепления 1 мкг фага лямбда за 1 час. Для продукта амплифика-

ции использовали трёхкратное количество фермента. Фрагменты ДНК после рестрикции разделяли в 3% агарозном геле с бромистым этидием. Электрофорез проводили в горизонтальной камере с использованием в качестве электродного буфера 1xTAE при напряженности поля 10 В/см. По окончании электрофореза гель просматривали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм.

У носителей аллеля G фрагмент ДНК гена SEPS1 имеет размер 370 н.п., в то время как у носителей аллеля A фрагмент ДНК имеет размер 233 и 137 н.п. У носителей гетерозиготного генотипа выявляются все три фрагмента.

Математическую обработку результатов проводили с использованием закона генетического равновесия Харди—Вайнберга для аутосомных признаков. При сравнении частот встречаемости генотипов применяли критерий Пирсона. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми генотипами и риском заболевания проводили с помощью логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI_{95%}), значение $p < 0,05$. Анализ с использованием Z-критерия (аналог критерия Стьюдента для долей) проводили в системе для статистического анализа данных Statistica 6.1 RUS.

Работа выполняется на базе межкафедральной лаборатории молекулярных методов исследования Медицинского института РУДН. Выделение ДНК проводится на базе ЦКП НОЦ РУДН.

Результаты и обсуждение

Популяционная частота аллелей гена SEPS1 в разных популяциях изучена недостаточно. По данным Yan Wang с соавт. среднепопуляционная частота аллеля A гена в китайской популяции составляет 6%. Частота гетерозигот GA полиморфного варианта G-105A гена SEPS1 в данной популяции составляет 11,1%, частота гомозигот AA — 0,2% [11]. Нами получены предварительные данные, согласно которым, популяционная частота аллеля A среди европейской популяции в городе Москве составляет 12%, что значительно превышает частоту встречаемости данного аллеля в китайской популяции, что согласуется с данными из базы 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>).

По предварительным данным, в группе женщин с преждевременными родами частота встречаемости аллеля A полиморфного варианта G-105A гена SEPS1 статистически значимо выше, чем в контрольной группе (24,2% против 12,1%, $p < 0,05$).

Распределение частот генотипов полиморфного варианта G-105A гена SEPS1 в контрольной группе и группе пациенток с недоношенной беременностью

Таблица

Частота генотипов гена *SEPS1* и показатели статистических различий между группами

Генотип <i>SEPS1</i>	Группа с невынашиванием (недоношенные)		Контрольная группа		Критерий Z / p	Критерий χ^2 / p
	N = 33	%	N = 29	%		
GG	17	51,5%	22	75,9%	t = 2,07/0,0431	3,921/0,0477
AG	16	48,5%	7	24,1%		
AA	0	0%	0	0%		
Итого	33	100%	29	100%		

(таблица) соответствует аддитивной модели наследования (тест Кохрана—Армитаджа для линейных трендов). Следует подчеркнуть, что наличие даже одного аллеля *A* полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* может провоцировать преждевременные роды (доминантная модель наследования: GG против (AG+AA), OR = 2,96, CI_{95%} = (0,99 — 8,8)).

Выводы

Таким образом, исследование полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* при угрозе возникновения преждевременных родов может быть использовано как один из скрининговых методов диагностики риска реализации ПР.

Список литературы

1. Скрипниченко Ю.П., Баранов И.И., Токова З.З. Статистика преждевременных родов. *Проблемы репродукции*. 2014 (4): 11-14.
2. Allen-Daniels M. J., Serrano M. G., Pflugner L. P., Fettweis J.M., Prestosa M.A., Koparde V. N. et al. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015; 212 (6): 779.e1-779.e13.
3. Радзинский В. Е. Акушерство. ГЭОТАР-Медиа. 2015. P. 728.
4. York T.P., Eaves L.J., Neale M.C. Strauss J.F. The contribution of genetic and environmental factors to the duration of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2014; 210(5): P. 398 — 405.
5. Huajie Mao, Ruifang Cui, Xiaochun Wang. Association analysis of selenoprotein S polymorphisms in Chinese Han with susceptibility to gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(7): 10993-10999.
6. Hart K., Landvik N.E., Lind H. Skaug V, Haugen A and Zienolddiny S. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011; 71(2): 123-129.
7. Noguchi T., Sado T., Naruse K. Evidence for Activation of Toll-Like Receptor and Receptor for Advanced Glycation End Products in Preterm Birth. *Mediators of Inflammation*. 2010; 2010: e490406.
8. Langmia I.M., Apalasy Y.D., Omar S.Z, Mohamed Z. et al. Impact of IL1B gene polymorphisms and interleukin 1B levels on susceptibility to spontaneous preterm birth. *Pharmacogenet Genomics*. 2016; 26(11): 505-509.

References

1. Skripnichenco U.P., Baranov I.I., Tokova Z.Z. Statistics of the preterm births. *Problemy reproduktivnoy. 2014; 4: 11-14. (in Russian)*
2. Allen-Daniels M.J., Serrano M.G., Pflugner L.P., Fettweis J.M., Prestosa M.A., Koparde V.N. et al. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015; 212 (6): 779.e1-779.e13.
3. Radsinski V.E. *Obstetrics. [Akusherstvo]*. GEO-TAR-Media. 2015. (in Russian)
4. York T.P., Eaves L.J., Neale M.C. Strauss J.F. The contribution of genetic and environmental factors to the duration of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2014; 210(5): P. 398 — 405.
5. Huajie Mao, Ruifang Cui, Xiaochun Wang. Association analysis of selenoprotein S polymorphisms in Chinese Han with susceptibility to gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(7): 10993-10999.
6. Hart K., Landvik N.E., Lind H. Skaug V, Haugen A and Zienolddiny S. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011; 71(2): 123-129.
7. Noguchi T., Sado T., Naruse K. Evidence for Activation of Toll-Like Receptor and Receptor for Advanced Glycation End Products in Preterm Birth. *Mediators of Inflammation*. 2010; 2010: e490406.
8. Langmia I.M., Apalasy Y.D., Omar S.Z, Mohamed Z. et al. Impact of IL1B gene polymorphisms and interleukin 1B levels on susceptibility to spontaneous preterm birth. *Pharmacogenet Genomics*. 2016; 26(11): 505-509.

9. Yang X., Peng W., Zhu L.N, Zhang X., Wang Y. Association between interleukin-1 β C+3953T and genetic susceptibility to spontaneous preterm birth: a case-control study. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2016; 18(11): 1123-1129.

10. Shibata T., Arisawa T., Tahara T., Ohkubo M., Yoshioka D., Maruyama N. et al. Selenoprotein S (SEPS1) gene -105G>A promoter polymorphism influences the susceptibility to gastric cancer in the Japanese population. *BMC Gastroenterol*. 2009; 9:2.

11. Wang Y., Yang X., Zheng Y., Wu Z.H., Zhang X.A., Li Q.P., He X.Y., Wang C.Z., Feng Z.C. The SEPS1 G-105A Polymorphism Is Associated with Risk of Spontaneous Preterm Birth in a Chinese Population. *PLoS One*. 2013; 8(6): e65657.

12. Sun H.Y., Liu T.B., Wang Q.C., Wu W.Q., He Y.J. Single nucleotide polymorphism in the SEPS1 gene may contribute to the risk of various human diseases: a meta-analysis. 2016; 43(5): 469-479.

Сведения об авторах:

Мусалаева Индира Омаровна, аспирант каф. акушерства и гинекологии РУДН, e-mail: i700@mail.ru

Галина Татьяна Владимировна, проф. каф. акушерства и гинекологии РУДН, e-mail: tatiana.galina1@mail.ru

Оленев Антон Сергеевич, зам. гл. врача, зав. филиалом 2 ГКБ 24 ДЗМ, e-mail: felidis@mail.ru

Тарасенко Екатерина Владимировна, доцент каф. биологии и общей генетики Медицинского института РУДН, e-mail: tarasenko_ev@inbox.ru

Мяндина Галина Ивановна, проф. каф. биологии и общей генетики Медицинского института РУДН, e-mail: gmyand@mail.ru

Азова Мадина Мухамедовна, зав. каф. биологии и общей генетики Медицинского института РУДН, e-mail: azovam@mail.ru