УДК 618.14-007.61:575.174.015.3

# ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА P53 ПРИ ГЕНИТАЛЬНОМ ЭНДОМЕТРИОЗЕ

**Наследникова И.О., Ильяди Е.Б., Уразова О.И., Ткачев В.Н., Евтушенко И.Д., Новицкий В.В., Кублинский К.С.**

*ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российский Федерации, Томск, e-mail: ira_naslednikova@mail.ru*

С привлечением современных молекулярно-генетических методов проведено исследование распределения аллелей и генотипов полиморфного варианта G72C гена p53 у 200 женщин, страдающих генитальным эндометриозом, и 100 женщин без эндометриоза, проживающих на территории Томской области и г. Томска. У больных генитальным эндометриозом выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости «патологического» аллеля Сполиморфизма G72C гена p53. Установлено, что риск развития генитального эндометриоза связан с наличием в генотипе женщины аллеля С и генотипа СС полиморфного варианта G72C гена p53. Подверженность тяжелому течению генитального эндометриоза (3–4 степень распространения процесса согласно классификации Американского общества фертильности RAF-S) ассоциирована с аллелем С и генотипом СС полиморфизма G72C гена p53.

**Ключевые слова: генитальный эндометриоз, полиморфизм гена p53**

# POLYMORPHISM OF THE P53-GENE IN GENITAL ENDOMETRIOSIS

**Naslednikova I.O., Ilyadi E.B., Urazova O.I., Tkachev V.N., Evtushenko I.D., Novitsky V.V., Kublinsky K.S.**

*Siberian State Medical University of the Russian Federation Ministry of Healthcare, Tomsk, e-mail: ira_naslednikova@mail.ru*

The research is conducted using up-to-date molecular-genetic methods of alleles and genotypes of polymorphous variant of G72C gene distribution at 200 females with genital endometriosis and 100 salutary females in Tomsk region. At patients with genital endometriosis statistically significant increase in frequency of «pathological» allele from polymorphism G72C of p53 gene is revealed. It is specified that the risk of genital endometriosis development is connected with allele C and a genotype CC polymorphic variant G72C of p53 gene in a genotype of female. Susceptibility to the severe course of genital endometriosis (3-4 extent distribution of process according to classification of the American Society of a Fertility RAF-S) is associated with allele C and a genotype CC polymorphism G72C of p53 gene.

**Keywords: genital endometriosis, polymorphism of p53-gene**

Эндометриоз в последние годы прочно занял лидирующие позиции в структуре гинекологических заболеваний, поражая от 5 до 50% женщин репродуктивного возраста и являясь наиболее частой причиной бесплодия [1, 2, 8]. Эндометриоз характеризуется разрастанием ткани, подобной эндометрию, за пределами полости матки в результате избыточной пролиферации на фоне гормонального дисбаланса. Этиология и патогенез данной патологии до конца не выяснены, однако показано, что в развитии эндометриоза существенную роль играют генетические факторы [1, 7, 8].

Современные исследователи склонны расценивать автономный рост очагов эндометриоза как результат отсутствия адекватного контроля за пролиферацией и дифференцировкой клеток гетеротопий со стороны организма женщины. Эндогенная и экзогенная регуляция апоптоза, уравновешивающего эффекты клеточной пролиферации, элиминации поврежденных и функционально неполноценных клеток, является актуальным аспектом исследований патогенеза эндометриоза [7, 8, 10].

Установлено, что эндометриоидные клетки не находятся в «пролиферативном хаосе», они переходят на интра-, ауто- и паракринный механизмы регуляции своего роста, что выражается в утрате контактного торможения и иммортализации [1, 10]. Очаги эндометриоза становятся непосредственными продуцентами факторов роста, цитокинов, онкобелков при отсутствии экспрессии гена-супрессора p53, инициируя нарушения равновесия органов и тканей брюшной полости, усугубляя имеющийся иммунодефицит. Формируется порочный круг, способствующий приживлению новых частиц эндометриоидной ткани, распространению уже имеющихся эктопий, формированию глубокоинвазивных и распространенных форм эндометриоза [1, 7].

Поиск молекулярно-биологических маркеров может дать дополнительную информацию о биологическом поведении эндометриоидных гетеротопий: скорости роста, способности к инвазии и рецидивированию. Активно обсуждается прогностическое значение полиморфных вариантов и мутаций генов-маркеров апоптоза, ангиогенеза, пролиферации при эндометриозе. В связи с этим **целью** настоящего исследования явилось выявление ассоциации полиморфных вариантов гена p53 с риском возникновения и неблагоприятного течения генитального эндометриоза.

## Материал и методы исследования

В программу исследования вошли 300 женщин репродуктивного возраста, проживающих на территории Томской области и г. Томска, находившихся на стационарном лечении в гинекологической клинике ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. Основную группу составили 200 женщин с наружным генитальным эндометриозом. В группу контроля включено 100 женщин, которым проводилась диагностическая лапароскопия по поводу синдрома хронической тазовой боли, бесплодия и у которых не было выявлено органической патологии, а также женщины, которым проводилась добровольная хирургическая стерилизация. Всем женщинам была проведена лапароскопия по стандартной методике с использованием аппаратуры фирмы «KarlStorz» (Германия) и последующим гистологическим исследованием операционного материала. У всех женщин было получено добровольное информированное согласие на забор венозной крови и использование её для проведения исследований. Кровь для исследования получали из кубитальной вены в стандартных условиях утром в день операции. Выделение ДНК из периферической крови проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Определение вариантных генотипов гена p53 C72G осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных праймеров к участку гена (forward 5'-ATG-AAG-CTC-CCA-GAA-TGC-3 и reverse: 5'-GCC-GGT-GTA-GGA-GCT-3') и зондов, комплиментарных участку в амплифицируемой ДНК (5'-FAM-CTG-CTC-CCC-GCG-TGG-CCC-3' и 5'-ROX-CTG-CTC-CCC-CCG-TGG-CCC-3'). Смесь для амплификации (15 мкл) содержала 100–200 нг ДНК, 2,5 нМ каждого праймера, 2,0 нМ каждого зонда, 1 мМ смесь четырёх dNTP, 1мМ MgCl2, 0,8 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Лаборатория Медиген», Россия) и 10×буфер, поставляемый производителем в наборе с ферментом. Программа амплификации включала 1 мин предварительной денатурации при 94 °C и 42 цикла: 94 °C – 10 с, 58 °C – 15 с, 72 °C – 10 с. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировались с помощью программного обеспечения амплификатора ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных алгоритмов биометрии. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для анализа ассоциации маркеров исследуемых генов с эндометриозом сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых индивидов, используя критерий $\chi 2$ с поправкой Йетса на непрерывность. При численностях генотипов менее пяти использовали точный тест Фишера.

## Результаты исследования и их обсуждение

Сохранение целостности и первоначальной структуры ДНК невозможно без участия регуляторов клеточного цикла, обеспечивающих баланс в продвижении клетки по циклу и смены одной фазы на другую. Сбалансированное регулирование смены клеточного цикла обеспечивает нормальное функционирование всех систем клетки [3]. Одним из ключевых генов, обеспечивающих стабильность генома, является ген p53, кодирующий белок P53, вовлеченный в регуляцию путем остановки клеточного цикла в контрольных точках для осуществления репарации ДНК, либо индукции апоптоза в случае невозможности устранения повреждений [4, 5]. Наличие полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, обеспечивает индивидуальную особенность в восприимчивости клетки и организма в целом к факторам внешней и внутренней среды и другим особенностям реализации метаболических, репаративных и митотических событий [4, 5, 6, 9].

Результаты проведенного нами исследования по изучению распределения аллелей и генотипов полиморфизма G72C гена p53 у женщин без эндометриоза позволили зарегистрировать преобладание генотипа GG (70 %) над CG (30 %), при этом гомозиготный генотип по аллелюС выявлен не был (табл. 1).

**Таблица 1**

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма G72C гена p53 *(абс., %)* у женщин с генитальным эндометриозом

| Генотипы и аллели полиморфизма G72C гена p53 | Характеристика обследованных лиц | | $\chi^2$, p | OR (95 % CI) |
|---|---|---|---|---|
| | Женщины без эндометриоза *n* = 100 | Женщины с эндометриозом *n* = 200 | | |
| GG | 70 (70,00) | 110* (55,00) | 10,90 $p < 0,05$ | 0,52 (0,31–0,87) |
| GC | 30 (30,00) | 70 (35,00) | | 1,26 (0,75–2,11) |
| CC | 0 (0,00) | 20* (10,00) | | 22,83 (1,37–381,47) |
| G | 15 (15,00) | 55(27,50) | 11,65 $p < 0,05$ | 2,50 (1,38–3,36) |

Примечание: *n* – количество человек в группе. Анализ качественных независимых данных проводили с помощью критерия $\chi^2$ Пирсона. p – уровень статистической значимости различий между группами. * – статистически значимые различия относительно соответствующего показателя у здоровых женщин. Статистически значимые различия считали при $p < 0,05$. OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению с группой контроля с 95 % доверительным интервалом.

У женщин с генитальным эндометриозом распределение генотипов полиморфного сайта G72C гена p53 оказалось аналогичным: преобладал генотип GG (55 %), реже встречался генотип GC (35 %). Однако обращало на себя внимание, что редкий генотип CC был выявлен у 10 % женщин с генитальным эндометриозом (табл. 1).

При сравнительной оценке распределения генотипов и аллелей полиморфного участка G72C гена p53 у женщин с генитальным эндометриозом наблюдалось снижение частоты генотипа GG и появление генотипа CC ($\chi^2 = 10{,}90$, $p < 0{,}05$) и преобладание редкого аллеля C ($\chi^2 = 11{,}65$, $p < 0{,}05$). Кроме того, была показана положительная ассоциация генитального эндометриоза с аллелем C (OR = 2,50) и генотипом CC (OR = 22,83) полиморфизма G72C гена p53. ГенотипGG (OR = 0,52) обладал протективным эффектом в отношении генитального эндометриоза (см. табл. 1).

Для оценки распределения аллелей и генотипов изучаемого нами полиморфизма G72C гена p53у больных генитальным эндометриозом в зависимости от степени распространения процесса проводили исследование, предварительно разделив пациенток на две группы согласно классификации Американского общества фертильности R-AFS (1985г.). Результаты оценки распределения приведены в табл. 2.

**Таблица 2**

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма G72C гена p53 *(абс., %)* у женщин с генитальным эндометриозом различной степени распространения (R-AFS, 1985 г.)

| Генотипы и аллели полиморфизма G72C гена p53 | Характеристика обследованных лиц | | |
|---|---|---|---|
| | Женщины без эндометриоза $n = 100$ | Женщины с эндометриозом 1–2 ст. $n = 107$ | Женщины с эндометриозом 3–4 ст. $n = 93$ |
| GG | 70(70,00) | 67 (62,60) | 43*# (46,20) |
| OR (95 % CI) | | 0,72 (0,40–1,28) | 0,37 (0,20–0,67) |
| GC | 30 (30,00) | 35 (32,7) | 35 (37,60) |
| OR (95 % CI) | | 1,13 (0,63–2,04) | 1,41 (0,77–2,56) |
| CC | 0(0,00) | 5 (4,70) | 15*#(16,10) |
| OR (95 % CI) | | 10,79 (0,59–197,62) | 39,69 (2,34–673,64) |
| $\chi^2$, p | | 5,22 p > 0,05 | 21,61 $p < 0{,}05$ |
| G | 15 (15,00) | 22 (21,00) | 32 (34,90) |
| $\chi^2$, p | | 2,53 p > 0,05 | 20,67 $p < 0{,}001$ |
| OR (95 % CI) | | 1,51 (0,91–2,51) | 3,04 (1,86–4,98) |

Примечание: $n$ – количество человек в группе. Анализ качественных независимых данных проводили с помощью критерия $\chi^2$ Пирсона. p – уровень статистической значимости различий между группами. * – статистически значимые различия относительно соответствующего показателя у здоровых женщин. # – статистически значимые различия относительно соответствующего показателя у женщин с эндометриозом 1–2 степени распространения процесса. Статистически значимые различия считали при $p < 0{,}05$. OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению с группой контроля с 95 % доверительным интервалом.

Было выявлено, что среди пациенток, страдающих генитальным эндометриозом 3–4 степени распространения процесса, имелись значимые различия в распределении аллелей ($\chi^2 = 20{,}67$, $p < 0{,}001$) и генотипов ($\chi^2 = 21{,}61$, $p < 0{,}05$) данного полиморфного сайта относительно группы контроля (табл. 2). Отмечалось значимое снижение частоты встречаемости генотипаGG и увеличение генотипа CC полиморфного сайта G72C гена p53 как по сравнению с женщинами без эндометриоза, так и с женщинами с генитальным эндометриозом 1–2 степени распространения ($p < 0{,}05$) (см. табл. 2).

Выявлена также положительная ассоциация тяжёлого течения эндометриоза с аллелем C (OR = 3,04) и генотипом CC (OR = 39,69) полиморфизма G72C гена p53. Генотип GG имел протективное значение в отношении 3–4 степени распространения генитального эндометриоза (OR = 0,37) (см. табл. 2).

Таким образом полученные нами результаты свидетельствуют о том, что риск развития генитального эндометриоза ассоциирован с наличием в генотипе женщины аллеля C и генотипа CC полиморфного варианта G72C гена p53. Подверженность тяжелому течению генитального эндометриоза (3–4 степень распространения процесса) статистически связана с аллелем C и генотипом CC полиморфизма G72C гена p53.

Согласно полученным данным относительно распределения полиморфных вариантов гена клеточного цикла у больных генитальным эндометриозом было выявлено значимое увеличение частоты встречаемости «патологического» аллеля C гена p53, выполняющего центральную регуляторную функцию в клеточном цикле, зачастую именуемого в литературе «хранителем генома» [10]. Аналогичные результаты были получены в популяции бразильских и мексиканских женщин, больных генитальным эндометриозом [5, 9], однако у индийских пациенток с данной патологией ассоциации эндометриоза с «патологическим» аллелем гена p53 обнаружено не было [6].

Основная функция p53 состоит в остановке клеточного цикла и увеличении продолжительности премитотической фазы для осуществления репарационного синтеза. Активированный белок P53 способен через несколько механизмов влиять на регуляцию клеточного цикла [3, 4, 5, 10]. Опосредованно с белком P21 он участвует в остановке клеточного цикла в точке перехода фазы G1 в S и запуске репарационных событий, взаимодействуя с белками DDB2 и GADD45A, тормозит прохождение клетки по клеточному циклу; регулирует гибель клетки как через рецепторы, непосредственно запускающие вешний путь апоптоза, (Fas/Apo-1, DR5, DR10, DR11), так и через проапоптотические регуляторные механизмы внутреннего пути (Bcl-2, Bax, PUMA, Noxa, Bid, каспазы-6, Apaf-1, PIDD) [3, 10].

Важной функцией p53 является также регуляция взаимодействия с окружающими клетками и воспринимаемыми клеткой эндокринных и паракринных сигналов. Показано, что увеличение содержания белка p53 или отдельных продуктов генов, экспрессия которых находится под контролем p53, приводит к блоку сигнального пути, ответственного за восприятие транскрипционных факторов [5, 9, 10].

Влияние минорного варианта гена p53 заключается в ослаблении контроля за продвижением по клеточному циклу и предопределяет тем самым снижение качества репарации ДНК аппарата клетки [4, 9]. Зачастую у пациенток с эндометриозом мутации гена p53 на фоне повышения экспрессии онкогенов – C-myc, C-fos – приводят к усилению пролиферации эндометриоидных клеток с возможной злокачественной трансформацией.

## Список литературы


1. Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. – М.: Медицина. 2006. – 416 с.
2. Ищенко А.И., Кудрина Е.А. Эндометриоз: современные аспекты. – М., 2008.
3. Agic A., Djalali S., Diedrich K., Hornung D. Apoptosis in endometriosis // Gynecol. Obstet. Invest. – 2009. – Vol. 68 (4). – P. 217–223.
4. Ammendola M., Gloria-Bottini F., Sesti F. et al. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90(2). – P. 406–408.
5. Gallegos-Arreola M.P., Figuera-Villanueva L.E., Puebla-Pérez A.M. et al. Association of TP53 gene codon 72 polymorphism with endometriosis in Mexican women // Genet. Mol. Res. – 2012. – Vol. 11(2). – P. 1401–1408.
6. Govatati S., Chakravarty B., Deenadayal M. et al. P53 and risk of endometriosis in Indian women // Genet. Test.Mol. Biomarkers. – 2012. Vol. 16(8) – P. 865–873.
7. Nasu K., Yuge A., Tsuno A., Nishida M., Narahara H. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis // Histol. Histopathol. – 2009. – Vol. 24 (9) – P. 1181–1192.
8. Nisolle M., Alvarez M.L., Colombo M., Foidart J.M. Pathogenesis of endometriosis // Gynecol. Obstet. Fertil. – 2007. – Vol. 35 (9) – P. 898–903.
9. RibeiroJúnior C.L., Arruda J.T., Silva C.T., Moura K.K. Analysis of p53 codon 72 gene polymorphism in Brazilian patients with endometriosis // Genet. Mol. Res. – 2009. – Vol. 8(2) – P. 494–499.
10. Zubor P., Hatok J., Galo S. et al. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls // Eur. J. Obstet. Gynecol.Reprod. Biol.– 2009. – Vol. 145(2) – P. 172–176.


## References


1. Adamjan L.V., Kulakov V.I., Andreeva E.N. Jendometriozy. M.: Medicina. 2006. 416 p.
2. Ishhenko A.I., Kudrina E.A. Jendometrioz: sovremennye aspekty. M., 2008.
3. Agic A., Djalali S., Diedrich K., Hornung D. Apoptosis in endometriosis // Gynecol. Obstet. Invest. 2009. Vol. 68 (4). pp. 217–223.
4. Ammendola M., Gloria-Bottini F., Sesti F. et al. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis // Fertil. Steril. 2008. Vol. 90(2). pp. 406–408.
5. Gallegos-Arreola M.P., Figuera-Villanueva L.E., Puebla-Pérez A.M. et al. Association of TP53 gene codon 72 polymorphism with endometriosis in Mexican women // Genet. Mol. Res. 2012. Vol. 11(2). pp. 1401–1408.
6. Govatati S., Chakravarty B., Deenadayal M. et al. R53 and risk of endometriosis in Indian women // Genet. Test.Mol. Biomarkers. 2012. Vol. 16(8). pp. 865–873.
7. Nasu K., Yuge A., Tsuno A., Nishida M., Narahara H. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis // Histol. Histopathol. 2009. Vol. 24 (9). pp. 1181–1192.
8. Nisolle M., Alvarez M.L., Colombo M., Foidart J.M. Pathogenesis of endometriosis // Gynecol. Obstet. Fertil. 2007. Vol. 35 (9). pp. 898–903.
9. RibeiroJúnior C.L., Arruda J.T., Silva C.T., Moura K.K. Analysis of p53 codon 72 gene polymorphism in Brazilian patients with endometriosis // Genet. Mol. Res. 2009. Vol. 8(2). pp. 494–499.
10. Zubor P., Hatok J., Galo S. et al. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls // Eur. J. Obstet. Gynecol.Reprod. Biol. 2009. Vol. 145(2). pp. 172–176.



**Рецензенты:**

Воронкова О.В., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск;

Куценко И.Г., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 14.02.2013.