

Статья поступила в редакцию 25.10.2017 г.

Кублинский К.С., Уразова О.И., Новицкий В.В., Куценко И.Г.
Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск, Россия

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЭСТРОГЕНОВ У ПАЦИЕНТОК С ЭНДОМЕТРИОЗОМ

Предмет исследования – полиморфизм генов ферментов метаболизма эстрогенов у пациенток с эндометриозом.

Цель – проанализировать связь полиморфизма генов ферментов метаболизма эстрогенов с развитием наружного генитального эндометриоза (НГЭ), его клиническим течением и эффективностью комбинированного лечения. Методы исследования. Лапароскопия выполнена 417 пациенткам с НГЭ (основная группа) и 112 женщинам без НГЭ (контрольная группа). После постановки лапароскопического диагноза у 358 женщин обеих групп (у 251 с НГЭ и 107 без НГЭ) определялись полиморфные варианты генов ферментов метаболизма эстрогенов А-4889G CYP1A1, С-734А CYP1A2, G-638А SULT1A1 и С-174Т SULT1E1 с помощью ПДРФ-анализа.

Основные результаты. Установлено, что носительство не только отдельных полиморфных генов ферментов метаболизма эстрогенов CYP1A1 А-4889G (аллеля G и генотипов GG, AG) и CYP1A2 С-734А (аллеля А и генотипов СА, АА), но и их комбинаций, предрасполагает к развитию НГЭ у женщин репродуктивного возраста. К развитию тазовых болей при НГЭ предрасполагает носительство генотипа СА полиморфизма С-734А гена CYP1A2. Наиболее значимым сочетанием полиморфных генотипов, предрасполагающим к развитию НГЭ, является комбинация CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC. При этом к формированию I-II стадии распространения НГЭ предрасполагает комбинация CYP1A1AA/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC, к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия – CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC, к эффективному лечению бесплодия при НГЭ – CYP1A1AG/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC.

Область их применения. Полученные результаты позволят сформировать группы риска развития НГЭ и прогноза ассоциированного с ним бесплодия с целью первичной профилактики и эффективного лечения.

Выводы. Полиморфные варианты генов ферментов метаболизма эстрогенов А-4889G CYP1A1, С-734А CYP1A2, G-638А SULT1A1 и С-174Т SULT1E1 (изолированно или в комбинации) предрасполагают к развитию НГЭ, ассоциированы с его клиническими проявлениями, стадией распространения и эффективностью лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наружный генитальный эндометриоз; ферменты метаболизма эстрогенов; аллельный полиморфизм генов; лапароскопия.

Kubliniy K.S., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Kutsenko I.G.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

POLYMORPHISM OF THE GENES OF ESTROGEN-METABOLISING ENZYMES IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS

Subject – polymorphism of genes of estrogen-metabolising enzymes in patients with endometriosis.

Objective – to perform analysis of relationship among allelic variants of genes of oestrogen-metabolising enzymes and development of external genital endometriosis (EGE), variants of its clinical progression and multiple-modality treatment efficacy.

Methods. Laparoscopy was performed for 417 women with EGE (treatment group) and 112 women without EGE (control group). After laparoscopically verified diagnosis for 358 women from both groups (251 with EGE and 107 without EGE) there were regions of polymorphic genes of estrogen-metabolising enzymes А-4889G CYP1A1, С-734А CYP1A2, G-638А SULT1A1 and С-174Т SULT1E1 identified in RFLP-analysis.

Main results. It has been established that carriage of not only separate polymorphic genes of estrogen-metabolising enzymes CYP1A1 А-4889G (Allele G and Genotypes GG, AG) and CYP1A2 С-734А (Allele A and Genotypes СА, АА), but also their combinations predisposes to EGE development in women of reproductive age. Carriage of Genotype СА of polymorphism С-734А of CYP1A2 gene predisposes to development of pelvic pains during EGE. The most potent combination of polymorphisms of genes of estrogen-metabolising enzymes which predisposes to EGE development is CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC combination, while CYP1A1AA/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC combination predisposes to formation of I-II stages of EGE distribution, as well as CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC combination predisposes to development of endometriosis-associated infertility, while CYP1A1AG/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC combination predisposes to efficient treatment of infertility during EGE.

Scope of application. The obtained results will allow to form risk groups of EGE development with the purpose of its primary prevention and efficient treatment of endometriosis-associated infertility.

Conclusions. Polymorphic variants of estrogen-metabolising enzymes А-4889G CYP1A1, С-734А CYP1A2, G-638А SULT1A1 and С-174Т SULT1E1 (separately or in combinations) predispose to EGE development, and are associated with its clinical evidence, distribution stage and treatment efficacy.

KEY WORDS: external genital endometriosis; estrogen-metabolising enzymes; allelic polymorphism of genes; laparoscopy.

Эндометриоз — хроническое воспалительное дисгормональное заболевание с локализацией подобной эндометрию ткани вне полости матки [1]. По разным оценкам, эндометриоз поражает 6–10 % женщин репродуктивного возраста и проявляется хронической тазовой болью, дисменореей и бесплодием. Для терапии этого заболевания применяется комбинированный подход, сочетающий хирургическое и медикаментозное лечение, однако частота рецидивов симптомов достигает 75 %, а доступный арсенал лекарственных средств имеет нежелательные побочные эффекты [2].

Этиология эндометриоза остается неопределенной, однако существует мнение о том, что в развитии заболевания основная роль принадлежит относительной или абсолютной гиперэстрогении, особенно на фоне измененной рецепторной активности эндометрия. Колебания уровня эстрогенов и нарушения их метаболизма создают в организме женщины определенные условия для возникновения и развития данной патологии. Образующиеся при этом метаболиты могут обладать даже большей по сравнению с эстрогенами активностью, стимулировать пролиферацию эндометрия [3, 4].

Известно, что метаболизм эстрогенов осуществляется в несколько фаз. В первую (I) фазу происходит реакция гидроксилирования при участии ферментов группы цитохрома P450 (CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1) с образованием субстратов (гидроксиэстрогенов) для второй фазы [5–7]. Во вторую (II) фазу биотрансформации эстрогенов происходит конъюгация их метаболитов с более гидрофильными молекулами и последующая экскреция. Так, их связывание с сульфатами в печени осуществляется ферментом II фазы биотрансформации — сульфотрансферазой (SULT). Образующиеся неактивные сульфметаболиты выводятся с желчью из организма. Таким образом, логично предположить, что нарушение этих процессов может существенно влиять на метаболизм эстрогенов и увеличивать риск заболевания эндометриозом. При этом полиморфные варианты генов, кодирующие ферменты метаболизма эстрогенов, также могут быть ассоциированы с риском развития эндометриоза [8, 9]. В свою очередь, поиск внутренних (организменных) факторов, предрасполагающих к развитию заболевания, позволит не только оценить их триггерную значимость, но и сформировать группы риска для диагностики, прогноза течения, исходов и эффективности лечения генитального эндометриоза.

Цель исследования — проанализировать связь аллельного полиморфизма генов ферментов метаболизма эстрогенов с развитием генитального эндометриоза, его клиническими проявлениями и эффективностью комбинированного лечения.

Корреспонденцию адресовать:

КУБЛИНСКИЙ Константин Сергеевич,
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: +7-913-825-15-59.
E-mail: kublinskiy@gmail.com

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 529 женщин репродуктивного возраста. В основную группу вошли 417 пациенток в возрасте 18–42 лет ($31,0 \pm 1,2$ года), у которых во время проведения диагностической либо оперативной лапароскопии на базе гинекологической клиники ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и гинекологического отделения «Центра женского здоровья» ООО МАДЕЗ был выявлен наружный генитальный эндометриоз (НГЭ).

Контрольную группу составили 112 клинически здоровых женщин с реализованной репродуктивной функцией (возраст $30,0 \pm 1,3$ лет), у которых при проведении хирургической стерилизации лапароскопическим доступом органическая патология не была диагностирована.

При изучении анамнеза у пациенток обеих групп особое внимание уделялось оценке репродуктивной функции и жалобам (дисменорея, диспареуния, тазовые боли).

После проведения лапароскопии 75 пациенток по тем или иным причинам отказались от гормонального лечения, 157 женщинам были назначены агонисты гонадотропин-рилизинг гормона, 48 — гестагены и 137 — комбинированные оральные контрацептивы. Отдаленные результаты изучали спустя 6–12 месяцев после окончания лечения. Его эффективность оценивали по купированию болевого синдрома, симптомов дисменореи и частоте наступления маточной беременности у пациенток с бесплодием.

Критерии исключения из исследования: возраст менее 18 и более 42 лет, воспалительные заболевания органов малого таза, миома матки, пороки развития половых органов, мужской фактор бесплодия, экстрагенитальные и онкологические заболевания, наследственные болезни и отказ от исследования.

Молекулярно-генетическое исследование было выполнено 358 женщинам европеоидного происхождения (251 основной группы и 107 группы контроля). Проведена сравнительная оценка частоты встречаемости генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов A-4889G CYP1A1, C-734A CYP1A2, G-638A SULT1A1 и C-174T SULT1E1, их связь с развитием НГЭ, его клиническими проявлениями (тазовые боли, дисменорея, диспареуния, бесплодие), стадией распространения (согласно классификации R-AFS, или Revised Classification of American Fertility Society, 1985) и эффективностью гормонального лечения.

Исследования проведены с разрешения локального этического комитета (протокол № 3148 от 26 декабря 2012 г.). У всех женщин было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента РФ для ведущих научных школ НШ-7906.2016.7.

Кровь для молекулярно-генетических методов исследования получали из кубитальной вены в стандартных условиях (у женщин с эндометриозом утром в

день операции). Образцы крови хранили при -70°C до момента исследования.

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом по инструкции к коммерческому набору «ДНК-сорб-В» ООО «ИнтерЛаб-Сервис».

Полиморфные участки генов ферментов метаболизма эстрогенов А-4889G CYP1A1, С-734А CYP1A2, G-638А SULT1A1 и С-174Т SULT1E1 определяли при помощи ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) в два этапа. На первом этапе проводили амплификацию фрагмента гена с использованием олигонуклеотидных праймеров к его специфическому участку (указаны в скобках): CYP1A1 (forward 5'-TAG-GAG-TCT-TGT-CTC-ATG-CC-3' и reverse 5'-GCA-CTT-AAG-CAG-TCT-GTT-TGA-G-3'); CYP1A2 (forward 5'-TGA-GGC-TCC-TTT-CCA-GCT-CTC-A-3' и reverse 5'-GAA-GCT-CTG-TGG-CCG-AGA-AGG-3'); SULT1A1 (forward 5'-TAG-GAG-TCT-TGT-CTC-ATG-CC-3' и reverse 5'-GCA-CTT-AAG-CAG-TCT-GTT-TGA-G-3'); SULT1E1 (forward 5'-GGT-AAG-CTG-TAC-CTG-TCA-CTC-3' и reverse: 5'-GAC-CCA-GGA-ATC-TGA-GCC-3'). Смесь для амплификации (20 мкл) содержала 100-200 нг ДНК, 2,5 нМ каждого праймера, 1 мМ смесь четырёх dNTP, 1мМ MgCl_2 , 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы и 10×буфер, поставляемый производителем с ферментом («Лаборатория Медиген»). Программа амплификации включала 5 мин. предварительной денатурации при 95°C и 35 циклов: 95°C – 40 сек, 55°C – 15 сек, 72°C – 40 сек. Программу завершала элонгация при 72°C в течение 5 минут.

На втором этапе исследования проводили инкубацию ампликона с добавлением рестриктазы MspI (для CYP1A1), рестриктазы ApaI (для CYP1A2), рестриктазы HhaI (для SULT1A1) и рестриктазы SfaNI (для SULT1E1) при 37°C в течение 5 часов.

Продукты амплификации и рестрикции фракционировали в 3 % агарозном геле с бромистым этидием в течение 30 минут при напряжении 130 В и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Для анализа качественных независимых данных использовали критерий χ^2 Пирсона либо точный критерий Фишера. Проверку соответствия наблюдаемых частот генотипов исследуемых полиморфизмов генов ожидаемым их частотам при соответствии равновесию Харди-Вайнберга проводили с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей и генотипов в группах исследования использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность или (в случае, когда число наблюдений, по крайней ме-

ре, в одной из ячеек таблиц сопряженности было менее 5) точный тест Фишера. Об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с заболеванием, его основными симптомами и эффективностью лечения судили по величине отношения шансов (Odds Ratio (OR)) с расчетом 95% доверительного интервала. При $\text{OR} < 1$ судили об отрицательной связи между признаками, при $\text{OR} > 1$ – о положительной их связи. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализируя характер предъявляемых жалоб у пациенток с эндометриозом были получены статистически значимые различия по наличию болевого синдрома. Тазовые боли встречались у 229 женщин (54,9 %; $\chi^2 = 94,439$; $p < 0,001$), на наличие дисменореи указывали 203 (48,7 %; $\chi^2 = 78,578$; $p < 0,001$), диспареунии – 56 (13,4 %; $\chi^2 = 16,821$; $p < 0,001$). Необходимо отметить, что у пациенток с III-IV стадией распространения эндометриоза (RAFS, 1985 г.) описываемые симптомы встречались чаще, нежели в группе пациенток с I-II стадией НГЭ: тазовые боли – у 132 женщин (72,9 %; $\chi^2 = 41,909$; $p < 0,001$), дисменорея – у 110 (60,8 %; $\chi^2 = 18,719$; $p < 0,001$), диспареуния – у 36 (19,9 %; $\chi^2 = 11,481$; $p < 0,001$).

Проблемы с зачатием отмечались у 287 женщин (68,8 %) с НГЭ в среднем (Me (Q_1 ; Q_3)) в течение 3 лет (2;5). Первичное бесплодие отмечалось у 170 (40,7 %), вторичное – у 117 больных НГЭ (28,1 %).

При проведении анализа распределения аллелей и генотипов полиморфизма А-4889G гена CYP1A1 нами выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение частоты встречаемости аллеля G (24,7 %), гомозиготного генотипа GG (8 %), гетерозиготного генотипа AG (33,5 %) и снижение частоты гомозиготного генотипа AA (58,6 %) в основной группе по сравнению с группой контроля (соответственно 5,1 %, 0,9 %, 8,4 % и 90,7 %) (рис. 1). У больных женщин-носителей генотипа GG и AG риск развития НГЭ оказался соответственно в 9,18 и 5,48 раз выше, чем у женщин без НГЭ. Носительство аллеля G полиморфного участка А-4889G гена CYP1A1 также предрасполагало к НГЭ ($\text{OR} = 6,05$), в то время как генотип AA ($\text{OR} = 0,15$) оказывал протективный эффект в отношении развития заболевания.

При проведении молекулярно-генетического обследования в ходе анализа распространенности полиморфизма С-734А гена CYP1A2 у женщин с НГЭ выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение

Сведения об авторах:

КУБЛИНСКИЙ Константин Сергеевич, канд. мед. наук, докторант, кафедра акушерства и гинекологии, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия. E-mail: kublinskiy@gmail.com

УРАЗОВА Ольга Ивановна, член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия.

НОВИЦКИЙ Вячеслав Викторович, академик РАН, доктор мед. наук, профессор, засл. деятель науки России, зав. кафедрой патофизиологии, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия.

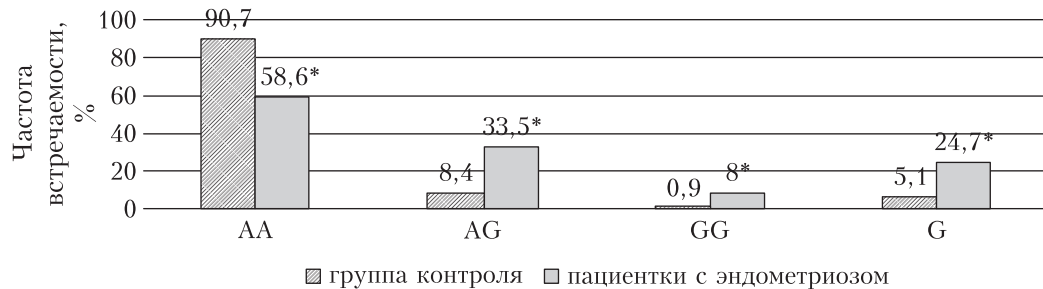
КУЦЕНКО Ирина Георгиевна, доктор мед. наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия.

Рисунок 1
Частота встречаемости (%) генотипов и аллелей полиморфизма А-4889G
гена CYP1A1 у пациенток основной и контрольной групп

Figure 1
Frequency (%) of genotypes and allelic polymorphism of A-4889G
of CYP1A1 gene in women of treatment and control groups

Примечание: Здесь и в рисунках 2, 3, 4, 5: * - уровень статистической значимости различий между группами. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Note: Here and applied to Figures 2, 3, 4, and 5: * - degree of statistically significant discrepancy between the groups. Statistically significant discrepancy is taken at $p < 0.05$.



частоты встречаемости генотипа CC (71,3 %), а также увеличение встречаемости генотипов CA (21,92 %) и AA (6,85 %) по сравнению с группой женщин без НГЭ (соответственно 89,7 %, 9,3 % и 0,9%) (рис. 2). Сравнение частоты встречаемости аллеля А также показало статистически достоверное ($p < 0,05$) ее повышение в основной группе (17,79 %) по сравнению с группой контроля (5,6 %). По результатам расчета OR выявлено, что носительство аллеля А ($OR = 3,63$), генотипов СА ($OR = 2,72$) и АА ($OR = 7,70$) предрасполагает к НГЭ, а гомозиготного генотипа СС полиморфизма С-734А гена CYP1A2 – напротив, обуславливает протективный эффект в отношении развития болезни ($OR = 0,28$).

Наряду с этим, нами выявлено, что у женщин с НГЭ и без НГЭ частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного варианта G-638A гена SULT1A1 и C-174T гена SULT1E1 не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$) (рис. 3, 4).

Для комплексной оценки влияния полиморфных вариантов А-4889G гена CYP1A1, С-734А гена CYP1A2, G-638А гена SULT1A1 и С-174Т гена SULT1E1 на развитие НГЭ мы провели анализ распространенности их комбинаций. Результатом проведенного исследования явились следующие сочетания генотипов, предрасполагающие к развитию заболевания:

- CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC – у 31 женщины (12,35 %) с НГЭ и у 5 женщин (4,63 %) без эндометриоза; $\chi^2 = 4,170$; $p = 0,041$; $OR = 2,90$;

- CYP1A1AG/CYP1A2CC/SULT1A1GG/SULT1E1CC – у 40 женщин (15,94 %) с НГЭ и у 8 женщин (7,41 %) без эндометриоза; $\chi^2 = 4,034$; $p = 0,045$; $OR = 2,37$.

При сопоставлении распределения генотипов и аллелей полиморфизмов А-4889G гена CYP1A1, С-734А гена CYP1A2, G-638А гена SULT1A1 и С-174Т гена SULT1E1 у женщин с НГЭ в зависимости от проявлений заболевания статистически значимых его различий у пациенток с дисменореей, диспареунией и бесплодием и у пациенток без данных симптомов не установлено ($p > 0,05$).

Вместе с тем, при анализе данных, полученных в результате молекулярно-генетического тестирования, у пациенток без тазовых болей и с тазовыми болями было зарегистрировано значимое увеличение ($\chi^2 = 6,540$; $p = 0,038$) частоты генотипа СА (30,1 %) полиморфизма С-734А гена CYP1A2 (рис. 5). При этом носительство генотипа СА предрасполагало к наличию тазовых болей у пациенток с эндометриозом ($OR = 2,09$). Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов А-4889G гена CYP1A1, G-638А гена SULT1A1 и С-174Т гена SULT1E1 у пациенток основной группы с тазовыми болями и без них было сопоставимым ($p > 0,05$).

Анализ распределения генотипов и аллельных вариантов генов ферментов метаболизма эстрогенов у женщин с различной стадией распространения НГЭ (RAFS, 1985 г.) показал отсутствие статистически достоверных различий.

Information about authors:

KUBLINSKIY Konstantin Sergeevich, PhD in Medical Sciences, Doctoral student at the Department of Obstetrics and Gynecology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. E-mail: kublinskiy@gmail.com

URAZOVA Olga Ivanova, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Doctor of Medicine, Professor, Professor at the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.

NOVITSKY Vyacheslav Viktorovich, Member of Russian Academy of Sciences, Doctor of Medicine, Professor, Honoured Scientist of Russia, Head of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.

KUTSENKO Irina Georgievna, Doctor of Medicine, Professor, Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.

Рисунок 2
Частота встречаемости (%) генотипов и аллелей полиморфизма C-734A
гена CYP1A2 у пациенток основной и контрольной групп
Figure 2
Frequency (%) of genotypes and allelic polymorphism of C-734A
of CYP1A2 gene in women of treatment and control groups

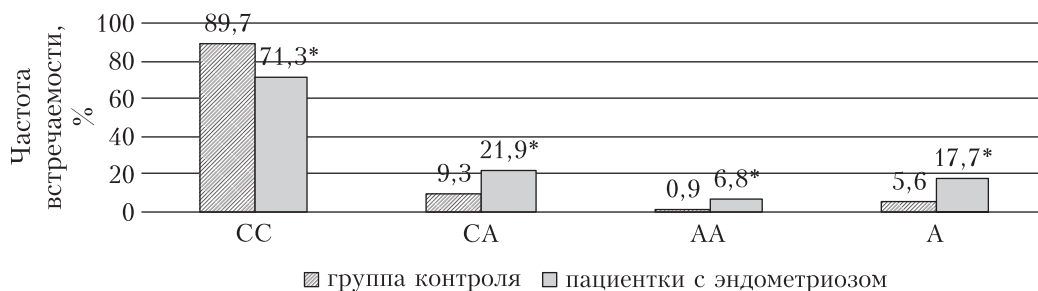
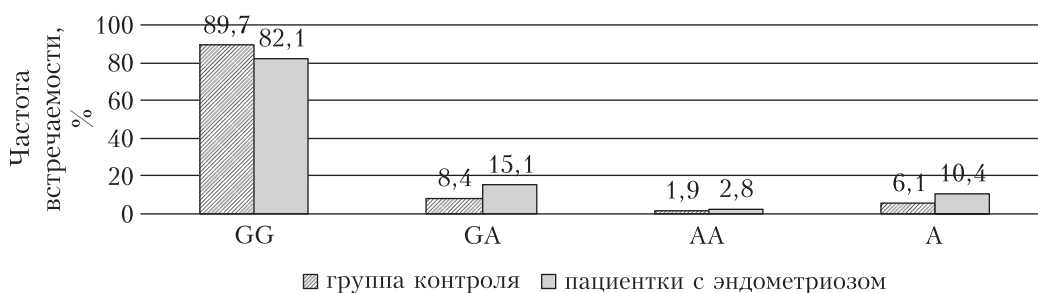


Рисунок 3
Частота встречаемости (%) генотипов и аллелей полиморфизма G-638A
гена SULT1A1 у пациенток основной и контрольной групп
Figure 3
Frequency (%) of genotypes and allelic polymorphism of G-638A
of SULT1A1 gene in women of treatment and control groups



В ходе комплексной оценки связи комбинаций полиморфных вариантов A-4889G гена CYP1A1, C-734A гена CYP1A2, G-638A гена SULT1A1 и C-174T гена SULT1E1 со стадией распространения НГЭ нами выявлено, что сочетание генотипов CYP1A1AA/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC предрасполагает к развитию I-II стадии НГЭ – 24 случая (17,52 %), а у больных с III-IV стадией – 4 случая (3,51 %) ($\phi = 3,8$; $p < 0,01$; OR = 5,84).

Результаты рассмотрения отдаленных результатов лечения в послеоперационном периоде свидетельствовали в пользу применения гормонотерапии по таким параметрам, как купирование болевого синдрома (у 39,7 %), симптомов дисменореи (у 63 %) и наступление маточной беременности у пациенток с бесплодием (у 51,4 %). Без применения гормонов эти показатели были существенно ниже – соответственно 9,7 % ($p = 0,0034$), 23,3 % ($\chi^2 = 14,85$; $p < 0,001$) и 20,3 % ($\chi^2 = 18,13$; $p < 0,001$).

Наряду с этим, нами не обнаружено статистически значимых различий распределения генотипов и аллелей отдельных полиморфизмов A-4889G гена CYP1A1,

C-734A гена CYP1A2, G-638A гена SULT1A1 и C-174T гена SULT1E1 ($p > 0,05$) у страдающих НГЭ женщин с эффективным и неэффективным лечением синдрома тазовых болей, дисменореи и эндометриоз-ассоциированного бесплодия.

Однако нами установлены сочетания генотипов исследуемых полиморфизмов, предрасполагающие к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия и наступлению беременности после его лечения:

- CYP1A1AA/CYP1A2AA/SULT1A1GG/SULT1E1CC – у больных НГЭ 12 случаев (6,94 %), а у женщин с эндометриозом, не имевших проблем с зачатием, не обнаруживалась; $\phi = 3,9$; $p < 0,01$;
- CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC – у женщин без бесплодия при эндометриозе 2 случая (2,56 %), а у больных НГЭ и бесплодием 26 случаев (15,03 %); $\phi = 3,5$; $p < 0,01$; OR = 6,72.
- CYP1A1AG/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC – частота наступления беременности после лечения у пациенток с бесплодием и НГЭ составила 14 случаев (18,7 %), при этом ни одного

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Соответствие принципам этики

Исследования проведены с разрешения локального этического комитета (протокол № 3148 от 26.12.2012 г.).

Рисунок 4
Частота встречаемости (%) генотипов и аллелей полиморфизма C-174T гена SULT1E1 у пациенток основной и контрольной групп

Figure 4
Frequency (%) of genotypes and allelic polymorphism of C-174T of SULT1E1 gene in women of treatment and control groups

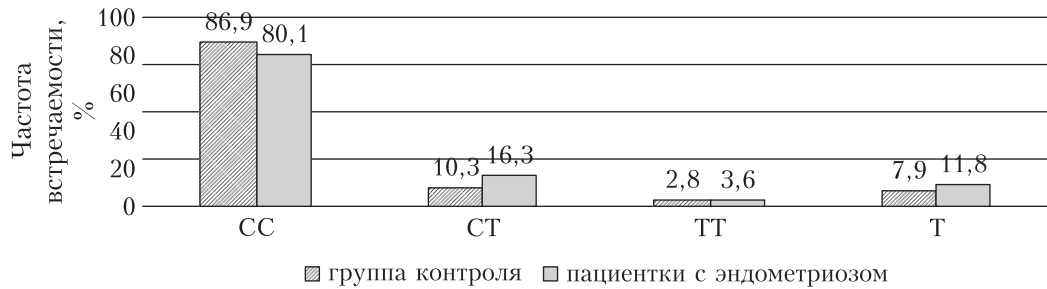
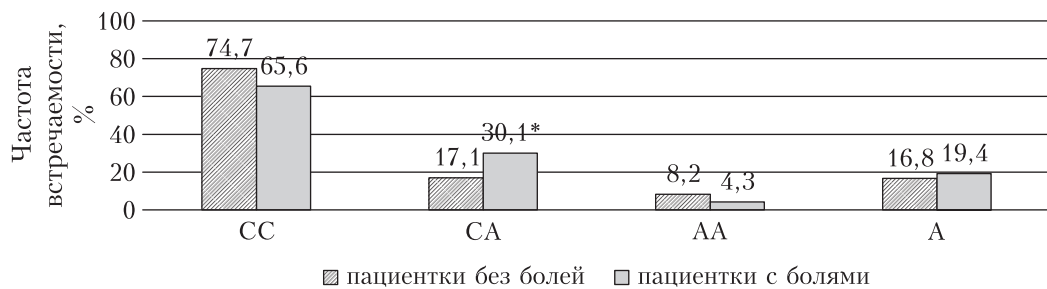


Рисунок 5
Частота встречаемости (%) генотипов и аллелей полиморфизма C-734A гена CYP1A2 у пациенток с тазовыми болями при эндометриозе

Figure 5
Frequency (%) of genotypes and allelic polymorphism of C-734A of CYP1A2 gene in women with pelvic pains during endometriosis



случая отсутствия наступления беременности у пациенток с этой комбинацией зафиксировано не было ($\chi^2 = 14,473$; $p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективным направлением в диагностике и лечении гинекологических заболеваний является поиск маркеров генетического риска и предрасположенности к развитию генитального эндометриоза среди аллельных вариантов генов ферментов метаболизма эстрогенов [10-12].

Взаимосвязь между особенностями метаболизма эстрогенов и развитием пролиферативных заболеваний женской половой сферы является доказанной [13]. Известно, что нарушения метаболизма эстрогенов, в том числе и генетически обусловленные, могут играть важную роль в стимуляции клеточной пролиферации [3, 4].

Метаболизм эстрогенов осуществляется в два этапа. Небольшая часть эстрадиола сразу подвергается реакции 16-гидроксилирования с образованием эстриола, который, после конъюгации с глюкуроновой кислотой, выводится из организма. Основная же часть эндогенных эстрогенов под действием ферментов группы цитохрома P450 (CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1) утилизируется с помощью реакций гидроксилирова-

ния эстрона – продукта превращения эстрадиола. Они подвергаются трансформации с образованием 2-, 16- и 4-гидроксиэстронов (2-, 16- и 4-OHE1). Это наиболее важные метаболиты с точки зрения их рост-стимулирующей активности. При этом осуществляемые ими функции в организме являются противоположными. 2-OHE1 обладает слабым эстрогенным действием (48 % активности эстрадиола), стимулирует апоптоз и подавляет пролиферацию чувствительных к нему клеток. Он образуется в результате действия CYP1A2 на эстрадиол и эстрон. В меньшей степени CYP1A2 участвует в 4-гидроксилировании эстрогенов. Если на эстрогены действует CYP1B1, то образуются 4-OHE1. Несмотря на низкую активность 4-OHE1 (79 % активности эстрадиола), он является сильнейшим активатором транскрипции эстроген-зависимых генов, выполняет функцию митогена. CYP1A1 активируется при 2-, 4-, 15 α -, 6 α -, 7 α - и 16 α -гидроксилировании. Важно отметить, что образующийся 16-OHE1, в отличие от 2-OHE1, более активен (его активность в 8 раз выше, чем у эстрадиола). Высокая скорость образования этого метаболита в организме женщины вызывает состояние гиперэстрогемии, несмотря на нормальную концентрацию эстрадиола в крови. Снижение соотношения 2-OHE1 к 16-OHE1 является свидетельством высокого риска развития пролиферативных процессов [5-7, 9].

Известно, что CYP1A1 окисляет эстрогены преимущественно с образованием 4-ОН-метаболитов [8, 14]. Полиморфизм rs1048943 (A-4889G) в 7 экзоне гена CYP1A1 представляет собой однонуклеотидную замену аденина на гуанин в положении 4889, что приводит к повышению экспрессии гена и активности фермента цитохрома P450 1A1, а, следовательно, опосредует увеличение образования продуктов окисления эстрогенов — 4-гидроксиэстрогенов. Также возможно образование 16 α -гидроксистероидов, которые обладают свойствами эстрогенов, высокой биодоступностью и являются сильнейшими агонистами эстрогеновых рецепторов (ER) [15].

В литературе приводятся указания на то, что однонуклеотидная замена цитозина на аденин в позиции -734 гена CYP1A2 вызывает снижение активности данного фермента. Это может приводить к замедлению скорости окисления эстрогенов до неактивных метаболитов и вызывать состояние гиперэстрогемии. Увеличение концентрации эстрогенов в организме, в свою очередь, является фактором риска гормонозависимых заболеваний [5, 8, 16].

На возможную роль полиморфизма генов ферментов метаболизма эстрогенов в развитии эндометриоза указывают ряд авторов. Однако исследования, которые они провели среди женщин в Австрии, Индии, Японии и Тайване, не обнаружили ассоциаций между известными полиморфизмами гена CYP1A1 и эндометриозом [17-21]. В то же время было выявлено, что полиморфизм A-4889G гена CYP1A1 связан с развитием эндометриоза у китайских женщин [12, 17].

Во вторую фазу биотрансформации эстрогенов, как уже указывалось выше, происходит конъюгация их метаболитов с последующим выведением из организма. При этом гидроксиметаболиты женских половых гормонов могут превращаться в семиквиноны — соединения с генотоксическим действием, или (посредством реакции метилирования) в метоксистероиды — безвредные для организма соединения. Метоксистероиды связываются с сульфатами в печени и с желчью выводятся из организма. Эти реакции осуществляются ферментом II фазы биотрансформации — сульфотрансферазой (SULT). SULT — это фермент, который катализирует сульфонирование эстрогенов до неактивных сульфометаболитов, подлежащих детоксикации.

Несмотря на то, что полиморфизм G-638A гена SULT1A1 приводит к повышению концентрации эстрогенов и катехолэстрогенов, оказывая неблагоприятное действие на гормоночувствительные клетки женских половых органов [5, 8, 16], в настоящей работе при анализе распределения генотипов и аллелей полиморфизма G-638A гена SULT1A1 и C-174T промоторного участка гена SULT1E1 у пациенток с эндометриозом и женщин контрольной группы статистически значимых различий не выявлено.

Данные об экспрессии SULT-генов на уровне мРНК, белков и ферментативной активности при эндометриозе достаточно противоречивы. Ряд авторов в своих работах не нашли существенных отличий в экспрессии SULT1E1 в эктопическом эндометрии при

перитонеальном и глубоком инфильтративном эндометриозе [22-24]. Тем не менее, признается, что профиль экспрессии генов факторов метаболизма эстрогенов в эктопическом эндометрии может быть использован в качестве биомаркеров эндометриоза [25, 26]. Так, например, H. Dassen и соавт. (2007) был обнаружен более высокий уровень мРНК сульфотрансферазы в эктопическом эндометрии при глубоких инфильтративных формах эндометриоза [27].

Таким образом, развитие эндометриозной болезни может быть связано с молекулярно-генетическими особенностями, обуславливающими гормональные нарушения. Так, показано, что при эндометриозе наблюдается повышение частоты генотипов AG и AA полиморфизма A-4889G гена CYP1A1 и генотипов CA и AA полиморфизма C-734A гена CYP1A2. По данным литературы, эти полиморфизмы могут приводить к нарушению метаболизма эстрогенов, поскольку ассоциированы с повышением образования 4-OHE1 и 16-OHE1 и уменьшением продукции 2-OHE1 [5-9, 15, 16]. Итогом подобных изменений является развитие в организме женщины состояния абсолютной и относительной гиперэстрогемии, что создает условия для развития эндометриозных имплантов и поддержания их активного состояния [28, 29]. Небезынтересно отметить также то, что избыток эстрогенов увеличивает локальный синтез провоспалительных цитокинов и факторов роста [30-32]. Выявленные изменения могут лежать в основе развития синдрома тазовых болей (генотип CA полиморфизма C-734A гена CYP1A2) и бесплодия при НГЭ, влиять на эффективность его гормонального лечения. Для формирования групп риска развития НГЭ и стадии его распространения с целью проведения первичной профилактики и эффективного лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия целесообразно определение как отдельных полиморфных генов ферментов метаболизма эстрогенов, так и их комбинаций.

ВЫВОДЫ:

1. К развитию НГЭ у женщин репродуктивного возраста предрасполагает носительство отдельных полиморфных генов ферментов метаболизма эстрогенов CYP1A1 A-4889G (аллеля G и генотипов GG, AG) и CYP1A2 C-734A (аллеля A и генотипов CA, AA).
2. Наиболее значимым сочетанием полиморфизмов генов ферментов метаболизма эстрогенов, предрасполагающим к развитию НГЭ, является комбинация CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC, которая выявляется в 12,4 % случаев при наличии заболевания и у 4,6 % женщин без НГЭ.
3. У пациенток с НГЭ тазовые боли, дисменорея, диспареуния и бесплодие встречаются чаще, чем у женщин без эндометриоза.
4. Дисменорея, диспареуния и бесплодие при НГЭ, а также эффективность гормонального лечения дисменореей и бесплодия не ассоциированы с носительством отдельных полиморфизмов генов

- ферментов метаболизма эстрогенов А-4889G гена CYP1A1, С-734А гена CYP1A2, G-638А гена SULT1A1 и С-174Т гена SULT1E1.
- К развитию тазовых болей при НГЭ предрасполагает носительство генотипа СА полиморфизма С-734А гена CYP1A2.
 - К формированию I-II стадии распространения НГЭ предрасполагает носительство комбинации CYP1A1AA/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1 СС, которая выявляется в 17,5 % случаев (у больных с III-IV стадией только в 3,5 % случаев).
 - К развитию бесплодия при НГЭ предрасполагает носительство комбинации CYP1A1AA/CYP1A2CA/SULT1A1GG/SULT1E1CC, а к эффективному лечению бесплодия при НГЭ – комбинации CYP1A1AG/CYP1A2CC/SULT1A1GA/SULT1E1CC (частота наступления беременности после лечения 18,7 %).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

- Buggio L, Somigliana E, Barbara G, Frattaruolo MP, Vercellini P. Oral and depot progestin therapy for endometriosis: towards a personalized medicine. *Expert Opin. Pharmacother.* 2017; (24): 1-13. doi: 10.1080/14656566.2017.1381086.
- Young VJ, Ahmad SF, Duncan WC, Horne AW. The role of TGF- β in the pathophysiology of peritoneal endometriosis. *Hum. Reprod. Update.* 2017; 23(5): 548-559. doi: 10.1093/humupd/dmx016.
- Kolgushkina TN. *Prakticheskaja ginekologija.* Minsk, 2004. 173 p. Russian (Колгушкина Т.Н. Практическая гинекология. Минск, 2004. 173 с.)
- Ishhenko AI, Kudrina EA, Stanoevich IV, Bahvalova AA, Romadanova JuA. Modern problems of external genital endometriosis. *Obstetrics and Gynecology.* 2007; (5): 67-73. Russian (Ищенко А.И., Кудрина Е.А., Станоевич И.В., Бахвалова А.А., Ромаданова Ю.А. Современные проблемы наружного генитального эндометриоза // Акушерство и гинекология. 2007. № 5. С. 67-73.)
- Artyukov NV, Guljaeva LF, Zotova OA, Hvosstova EP. The role of polymorphisms genes of detoxification of xenobiotics in the development of endometriosis. *Journal of obstetrics and womens diseases.* 2012; (6): 18-24. Russian (Артыук Н.В., Гуляева Л.Ф., Зотова О.А., Хвостова Е.П. Полиморфизм генов метаболизма эстрогенов у женщин с аденомиозом // Журнал акушерства и женских болезней. 2012. № 6. С. 18-24.)
- Suturina LV, Skljär NV, Labygina AV, Sholohov LF, Kovalenko II. The estrogen metabolism disorders in woman with uterine myoma and infertility. *Mother and Baby in Kuzbass.* 2009; 1(36): 27-30. Russian (Сутурина Л.В., Скляр Н.В., Лобыгина А.В., Шолохов Л.Ф., Коваленко И.И. Нарушения метаболизма эстрогенов у женщин с миомой матки и бесплодием // Мать и Дитя в Кузбассе. 2009. № 1(36). С. 27-30.)
- Harenkova EL, Artyukov NV, Guljaeva LF. The influence of the polymorphism of enzymes in women with endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS.* 2010; 6(2): 84-87. Russian (Харенкова Е.Л., Артыук Н.В., Гуляева Л.Ф. Влияние полиморфизма генов ферментов метаболизма эстрогенов на развитие гиперпластических процессов и рака эндометрия // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2010. № 6(2). С. 84-87.)
- Afanasyeva NA, Hvosstova EP, Pustyl'nikov VO, Chasovnikova OB, Krasil'nikov SJe, Guljaeva LF. Analysis of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in ovarian cancer patients in the Siberia region. *Molecular medicine.* 2013; (1): 16-19. Russian (Афанасьева Н.А., Хвостова Е.П., Пустыльник В.О., Часовникова О.Б., Красильников С.Э., Гуляева Л.Ф. Анализ генетического полиморфизма ферментов метаболизма эстрогенов у больных раком яичников в Сибирском регионе // Молекулярная медицина. 2013. № 1. С. 16-19.)
- Primak AV. *Metabolizm jestrogenov u zhenshhin. Obshhie predstavlenija i klinicheskaja praktika. Jesteticheskaja medicina.* 2006; (2): 208-214. Russian (Примаков А.В. Метаболизм эстрогенов у женщин. Общие представления и клиническая практика // Эстетическая медицина. 2006. № 2. С. 208-214.)
- Adamyan LV, Kulakov VI, Andreeva EN. *Endometriozy. M.: Meditsina,* 2006: 416 p. Russian (Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. М.: Медицина, 2006: 416 с.)
- Stefansson H, Geirsson RT, Steinhorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum. Reprod.* 2002; 17(3): 555-559.
- Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders. *Hum. Reprod.* 2009; (15): 97-118. doi: 10.1093/humupd/dmn024.
- Prudnikov AV, Pochos EV, Mihajlova ON, Guljaeva LF, Ljahovich VV. Genetic polymorphism of estrogen metabolizing enzymes in female with hysteroomyoma. *Vestnik NGU. Serija: Biologija, klinicheskaja medicina.* 2005; 3(1): 47-55. Russian (Прудников А.В., Почос Е.В., Михайлова О.Н., Гуляева Л.Ф., Ляхович В.В. Генетический полиморфизм ферментов метаболизма эстрогенов у больных с миомой матки // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2005. Т. 3, Вып. 1. С. 47-55.)
- Low YL, Li Y, Humphreys K, Thalamuthu A, Li Y, Darabi H et al. Multi-variant pathway association analysis reveals the importance of genetic determinants of estrogen metabolism in breast and endometrial cancer susceptibility. *PLoS Genet.* 2010; 6(7): E. 1001012. doi.org/10.1371/journal.pgen.1001012.
- Pechkovskij EV, Shadrina AS, Bojarskih UA, Selezneva IA, Sinkina TV, Lazarev AF et al. The polymorphism of genes of synthesis and metabolism of estrogens and the risk of breast cancer. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2014; (2): 19-23. Russian (Печковский Е.В., Шадрина А.С., Боярских У.А., Селезнева И.А., Синкина Т.В., Лазарев А.Ф. и др. Полиморфизм генов синтеза и метаболизма эстрогенов и риск рака молочной железы // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 2. С. 19-23.)
- Stupko EE, Shenin VA, Kolesnikova LI, Labygina AV, Suturina LV. The role of polymorphisms genes of detoxification of xenobiotics in the development of endometriosis and hysteroomyoma in woman. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk).* 2011; (5): 5-8. Russian (Ступко Е.Е., Шенин В.А., Колесникова Л.И., Лобыгина А.В., Сутурина Л.В. Роль полиморфизмов генов детоксикации ксенобиотиков в развитии миомы матки и эндометриоза // Сибирский медицинский журнал. 2011. № 5. С. 5-8.)
- Peng DX, He YL, Qiu LW, Yang F, Lin JM. Susceptibility to endometriosis in women of Han Nationality in Guangdong Province associated with Msp I polymorphisms of cytochrome P450 1A1 gene. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2002; 22(9): 814-816.
- Iizuka S, Kosugi Y, Isaka K, Takayama M. Could polymorphisms of N-acetyltransferase 2 (NAT2), glutathione S-transferase M1 (GSTM1), and cytochrome P450 (CYP1A1) be responsible for genetic predisposition to endometriosis among Japanese? *J. Tokyo Med. Univ.* 2003; (61): 59-66.
- Babu KA, Reddy NG, Deendayal M, Kennedy S, Shivaji S. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and their relationship with advanced stages of endometriosis in South Indian women. *Pharmacogenet. Genomics.* 2005; 15(3): 167-172.
- Huber A, Keck CC, Hefler LA, Schneeberger C, Huber JC, Bentz EK et al. Ten estrogen-related polymorphisms and endometriosis: a study of multiple gene-gene interactions. *Obstet. Gynecol.* 2005; 106(5): 1025-1031. doi:10.1097/01.AOG.0000185259.01648.41.
- Juo SH, Wang TN, Lee JN, Wu MT, Long CY, Tsai EM. CYP17, CYP1A1 and COMT polymorphisms and the risk of adenomyosis and endometriosis in Taiwanese women. *Hum. Reprod.* 2006; 21(6): 1498-1502. doi:10.1093/humrep/del033.
- Smuc T, Pucelj MR, Sinkovec J, Husen B, Thole H, Lanisnik Rizner T. Expression analysis of the genes involved in estradiol and progesterone action in human ovarian endometriosis. *Gynecol. Endocrinol.* 2007; 23(2): 105-111. doi:10.1080/09513590601152219.
- Smuc T, Hevir N, Ribic-Pucelj M, Husen B, Thole H, Rizner TL. Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian. *Mol. Cell Endocrinol.* 2009; 301(1-2): 59-64. doi: 10.1016/j.mce.2008.07.020.
- Colette S, Defrère S, Van Kerk O, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Differential expression of steroidogenic enzymes according to endometriosis type. *Fertil. Steril.* 2013; 100(6): 1642-1649. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.003.

25. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*. 2007; 148(8): 3814-3826. doi:10.1210/en.2006-1692.
26. Rizner TL. The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases. *Front. Pharmacol.* 2016; 18(7): 30. doi: 10.3389/fphar.2016.00030.
27. Dassen H, Punyadeera C, Kamps R, Delvoux B, Van Langendonck A, Donnez J et al. Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. *Hum. Reprod.* 2007; 22(12): 3148-3158. doi:10.1093/humrep/dem310
28. Seli E, Arici A. Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems. *Semin. Reprod. Med.* 2003; 21(2): 135-144. doi:10.1055/s-2003-41320.
29. Andreeva EN, Gavrilova EF. Endometriosis: ways of the decision of a problem to the XXI century. *Bulletin of Reproductive Health*. 2011; 2: 3-10. Russian (Андреева Е.Н., Гаврилова Е.Ф. Генитальный эндометриоз: пути решения проблемы в XXI веке //Вестник репродуктивного здоровья. 2011. № 2. С. 3-10.)
30. Marzhevskaya AM, Rishchuk SV, Gusev SN, Tatarova NA, Mirsky VE, Norekyan SI. Correction of Reproductive disorders in patients with endometriosis(areview). *Preventive and clinical medicine*. 2014; 4(53): 59-71. Russian (Маржевская А.М., Рищук С.В., Гусев С.Н., Татарова Н.А., Мирский В.Е., Норемян С.И. Репродуктивные нарушения у больных эндометриозом и их коррекция //Профилактическая и клиническая медицина. 2014. № 4(53). С. 59-71.)
31. Cheng YH, Imir A, Fenkci V, Yilmaz MB, Bulun SE. Stromal cells of endometriosis fail to produce paracrine factors that induce epithelial 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and its transcriptional regulator Sp1: a mechanism for defective estradiol metabolism. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2007; 196(4): 391-398. doi:10.1016/j.ajog.2006.12.014.
32. Ito K, Utsunomiya H, Suzuki T, Saitou S, Akahira J, Okamura K et al. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium and its disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006; 248(1-2): 136-140. doi:10.1016/j.mce.2005.11.038.

* * *