

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

Р.А. Часнойть

12 февраля 2010 г.

Регистрационный № 114-1109

**ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ
К РАЗВИТИЮ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
(путем тестирования полиморфизма генов системы
глутатион-S-трансфераз *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*)**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»¹, ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН
Беларуси»²

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Е.И. Барановская¹, канд. биол. наук
Н.Г. Даниленко², О.А. Будюхина¹, О.Д. Левданский², М.Г. Синявская², канд.
мед. наук Е.В. Воропаев¹

Гомель 2010

Инструкция предназначена для организации диспансерного наблюдения за беременными высокого риска развития фетоплацентарной недостаточности и более информативного прогнозирования возникновения данного осложнения беременности. Выполнение инструкции позволит предотвратить такие проявления фетоплацентарной недостаточности, как хроническая гипоксия плода, задержка роста и развития плода и, соответственно, снизить этиологически связанную с данным осложнением беременности заболеваемость новорожденных, мертворождаемость и раннюю неонатальную смертность.

Инструкция может использоваться акушерами-гинекологами в женских консультациях и стационарах на всех уровнях оказания медицинской помощи.

Глютатион-S-трансферазы (GST) — семейство ферментов, играющих ключевую роль во второй фазе детоксикации ксенобиотиков. Активность ферментов детоксикации детерминирована генетически.

Полиморфные (определенные) аллели генов, кодирующих глютатион-S-трансферазы, приводят к синтезу менее активных форм ферментов (*GSTP1*) либо полному отсутствию такового (*GSTM1* и *GSTT1*).

Мутации генов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, приводящие к снижению активности ферментов глютатионзависимой антиоксидантной системы, играют роль в развитии плацентарной недостаточности [Беспалова О.Н., 2006]. При наличии определенных полиморфизмов генов *GST* происходит истощение глютатионзависимой антиоксидантной защиты, угнетение детоксицирующей функции плаценты, усиливается токсическое действие продуктов ПОЛ на биомембраны клеток, что приводит к развитию плацентарной недостаточности и рождению детей с низкой оценкой по шкале Апгар [Теплюк Н.М., 2003].

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимого оборудования и реактивов представлен в табл. 1–4.

Таблица 1

Оборудование для проведения ПЦР

Наименование оборудования	Необходимое количество
Амплификатор	1
Миницентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл; 20–200 мкл; 200–1000 мкл)	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Хладоэлемент	1

Таблица 2

Оборудование для детекции результатов ПЦР путем электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов

Наименование оборудования	Необходимое количество
рН-метр	1
Водяная баня/СВЧ-печь	1
Источник питания с постоянным током	1
Камера для горизонтального электрофореза	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл; 20–200 мкл; 200–1000 мкл)	1
Набор пластиковых кювет для геля	1
Набор гребенок	1
Набор планшетов для смешивания образцов с краской	1
Набор посуды для приготовления агарозного геля	1
Трансиллюминатор	1

Таблица 3

Реактивы для проведения ПЦР

Наименование реактива	Назначение реактива	Количество на 1 исследование
10x буфер для taq-полимеразы	Смесь реактивов для создания оптимальных условий для taq-полимеразы	1,5 мкл
Taq-полимераза	Фермент, осуществляющий синтез ДНК	1,5 ед.
MgCl ₂ 25 mM	Донор ионов Mg ²⁺ , необходимых для работы taq-полимеразы	0,9 мкл
Смесь dNTP 25 mM (дезокси-рибонуклеотидтрифосфатов)	Мономер для синтеза ДНК	1,8 мкл
Олигонуклеотидные праймеры 10 pM	«Затравка» для начала синтеза новой нити ДНК	По 0,75 мкл каждого
Образец тотальной ДНК	Матрица для синтеза ДНК	1,2 мкл
ДМСО	Увеличивает вязкость	0,6 мкл

	смеси и денатурацию исходной ДНК-матрицы	
Стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода	Растворитель	4,2 мкл

Таблица 4

Реактивы для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации

Наименование реагента	Назначение реагента	Количество на 1 исследование
Агароза	Компонент агарозного геля	2 г
Трис-основание	Компонент ТАЕ-буфера	5,3 г
Ледяная уксусная кислота	Компонент ТАЕ-буфера	1,3 мл
ЭДТА	Компонент ТАЕ-буфера	2,2 мл
Водный раствор NaOH	Компонент ТАЕ-буфера	20 мкл
Бромфеноловый синий	Компонент загрузочного буфера	0,4 мг
Сахароза	Компонент загрузочного буфера	64 мг
Дистиллированная вода	Растворитель	20 мл
Маркер молекулярного веса	Набор фрагментов ДНК известного размера для определения размеров полученных ампликонов	0,075 мкл

Расходные материалы: резиновые перчатки, наконечники для дозаторов (до 10, 200, 1000 мкл), пробирки Eppendorf (1,5 мл), ПЦР-пробирки (0,2 мл), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Беременные из группы высокого перинатального риска.
2. Наличие в анамнезе:
 - мертворожденный
 - рождение маловесных детей
 - рождение детей с асфиксией
 - младенческой смертности, обусловленной перинатальными факторами
3. Курение при постановке на учет по беременности.
4. Генетический скрининг наследственной предрасположенности к развитию фетоплацентарной недостаточности.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний для использования описываемых методов исследования не установлено.

Материал для исследования

Материалом для выделения ДНК и выявления мутаций генов *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* является цельная венозная кровь. Кровь для анализа объемом 1000 мкл помещается в центрифужную пробирку 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5М ЭДТА. ЭДТА используется с целью предотвращения свертывания крови. Хранение образцов крови производится в холодильной камере при 2–4 °С не более 1 недели. Выделение ДНК целесообразно проводить с использованием готовых коммерческих наборов.

Проведение полимеразной цепной реакции

Диагностика аллельных состояний генов глутатион-S-трансфераз M1 и T1 включает определение 2 делеций в генах *GSTM1* и *GSTT1*. Анализ аллельного состояния генов *GSTM1* и *GSTT1* осуществляется методом мультиплексной ПЦР со специфическими праймерами (табл. 5) совместно с геном *CYP1A1*, который служит в качестве внутреннего контроля. Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать 1,5 мкл 10х буфера для taq-ДНК-полимеразы (750 ммоль/л Tris-HCl (pH 8,8), 200 ммоль/л (NH₄)₂SO₄, 0,1% Тритон X-100, 10 моль/л Тартразин, 5% Фикол 400), по 7,5 пкмоль каждого из праймеров (табл. 5), 0,6 мкл DMSO, 25 нмоль MgCl₂, по 5 нмоль каждого из dNTP, 3 единицы taq-ДНК-полимеразы. Приготовление амплификационной смеси осуществляется в пробирке Eppendorf (1,5 мл).

В пробирки для ПЦР вносится по 1,2 мкл растворенной ДНК-матрицы и 13,8 мкл амплификационной смеси, после чего пробирки следует поместить в амплификатор. Программа амплификации должна включать следующие этапы: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, 33 цикла синтеза (денатурация при 95 °С в течение 30 с, 30 с на отжиг праймеров при 60 °С и 1 мин элонгации при 72 °С), финальная элонгация — 4 мин при 72 °С и охлаждение до 4 °С.

Таблица 5

Последовательности праймеров

Ген	Праймер
GSTM1	[F] - 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
	[R] - 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
GSTT1	[F] - 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
	[R] - 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
CYP1A1	[F] - 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3'
	[R] - 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'
GSTP1	[1F] - 5'-CTC TAT GGG AAG GAC CAG CAG GAG-3'

	[2R] - 5'-CAA GCC ACC TGA GGG GTA AGG-3'
	[3F] - 5'- GTT GTG GGG AGC AAG CAG AGG-3'
	[4R] - 5'- GCC TTC ACA TAG TCA TCC TTG CGC-3'

Генетический полиморфизм гена глутатион-S-трансферазы P1 обусловлен заменой нуклеотидов в 313 (A-G) и 341 (T-C) положениях кДНК последовательности и представлен тремя аллелями: А, В и С. *GSTP1A* содержит изолейцин в 105 положении и аланин в 114 положении (Phe105/Ala114); *GSTP1B* содержит валин в 105 положении и аланин в 114 положении (Val105/Ala114); *GSTP1C* имеет валин в 105 и 114 положениях (Val105/Val114).

Для амплификации двух фрагментов гена *GSTP1* используют следующие условия ПЦР: после денатурации при 94 ° — 7 мин проводят 32 цикла амплификации в режиме 94 ° — 1 мин, 64 ° — 1 мин, 72 ° — 1 мин 20 с и финальная выдержка — 72 ° — 7 мин. После амплификации продукты ПЦР подвергаются расщеплению с помощью специфических эндонуклеаз Alw 261 (праймеры GSTP 1F и GSTP 2R) и Bsh 1236 (праймеры GSTP 3F и GSTP 4R).

Проведение электрофоретического разделения продуктов амплификации

Для проведения детекции результатов амплификации фрагментов генов наиболее оптимальным является горизонтальное электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете.

Таблица 6

Состав растворов для проведения горизонтального агарозного гель-электрофореза

Раствор/компонент	Количество
2% агароза	
Агароза	2 г
ТАЕ буфер 50x	2 мл
Дистиллированная вода	До 100 мл
Бромистый этидий	До конечной концентрации 0,0001%
Трис-ацетатный (ТАЕ) буфер 50x	
Трис-основание	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
ЭДТА-Na ₂ 0,5 моль/л (pH 8,0)	100 мл
Дистиллированная вода	До 1 л
ЭДТА-Na₂ 0,5 моль/л (pH 8,0)	
ЭДТА	186,1 г
Водный раствор NaOH	До pH 8,0

Дистиллированная вода	До 1 л
Загрузочный буфер	
Бромфеноловый синий	0,125 г
Сахароза	20 г
Дистиллированная вода	До 50 мл

Приготовление геля

Для приготовления агарозного геля следует смешать необходимые объемы ТАЕ буфера 50x и дистиллированной воды (табл. 6) в мерном цилиндре. Затем перелить полученный буфер в колбу с соответствующим количеством агарозы, после чего нужно нагреть смесь на водяной бане или в СВЧ-печи до полного растворения агарозы и добавить бромистый этидий. Расплавленную агарозу залить в кювету с установленной гребенкой и подождать 10–15 мин до полного застывания геля. Полученный гель следует поместить в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную ТАЕ 1x буфером.

ВНИМАНИЕ: бромистый этидий является сильным мутагеном, при работе с данным соединением следует использовать перчатки.

Внесение образцов в гель

Перед внесением следует смешать 5–7 мкл продукта амплификации с 2 мкл загрузочного буфера. Внесение образцов в лунки геля осуществлять с помощью пипеточного дозатора, используя индивидуальные наконечники для каждого образца. Для определения размеров полученных фрагментов следует внести в одну из лунок геля маркер молекулярного веса. Наиболее удобными будут маркеры, содержащие фрагменты ДНК от 100 до 500 пар оснований с интервалом в 100 пар нуклеотидов.

Оптимальным напряжением является 100 В. Электрофоретическое разделение продуктов осуществляется в течение 40–50 мин после чего гель следует извлечь из камеры и промыть дистиллированной водой. Промытый гель поместить в проходящий УФ-свет.

Интерпретация данных *GSTM1* и *GSTT1*

Наличие гомозигот по нормальному аллелю «+» или гетерозигот определяется по наличию на электрофореграмме фрагмента длиной 215 п.н. для гена *GSTM1* и 480 п.н. для гена *GSTT1*. Отсутствие фрагментов свидетельствует о делеции, гомозиготности по нулевому аллелю (генотип 0/0) (рис. 1). Успешность прохождения амплификации определяется по присутствию фрагмента гена *CYP1A1* размером 340 п.н. Таким образом, гетерозиготные по мутациям в генах *GSTM1* и *GSTT1* лица (генотип +/0) рассматривались в одной группе с носителями нормальных генов *GST* в гомозиготном состоянии (генотип +/+).

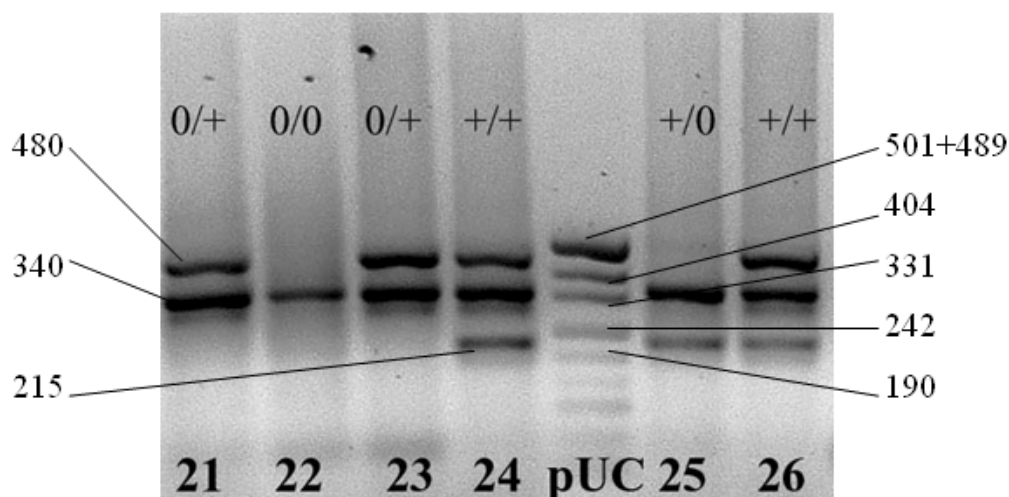


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации: 21–26 — номера проб; М — маркер длин ДНК *pUC/MspI*; сверху — аллельное состояние генов *GSTM1/GSTT1*; слева — размеры амплифицированных фрагментов (215 п.н. для *GSTM1* и 480 п.н. для *GSTT1*); справа — размеры фрагментов маркера длин ДНК *pUC19/MspI*

Интерпретация данных GSTP1

На электрофореграмме после расщепления эндонуклеазой Alw 261 (105 положение) наличие продукта ПЦР с молекулярным весом 192 п.н. оценивали как ile/ile, продуктов амплификации 80 и 120 п.н. — val/val, продуктов амплификации 192, 80 и 120 п.н. — как ile/val. Образец представлен на рис. 2.

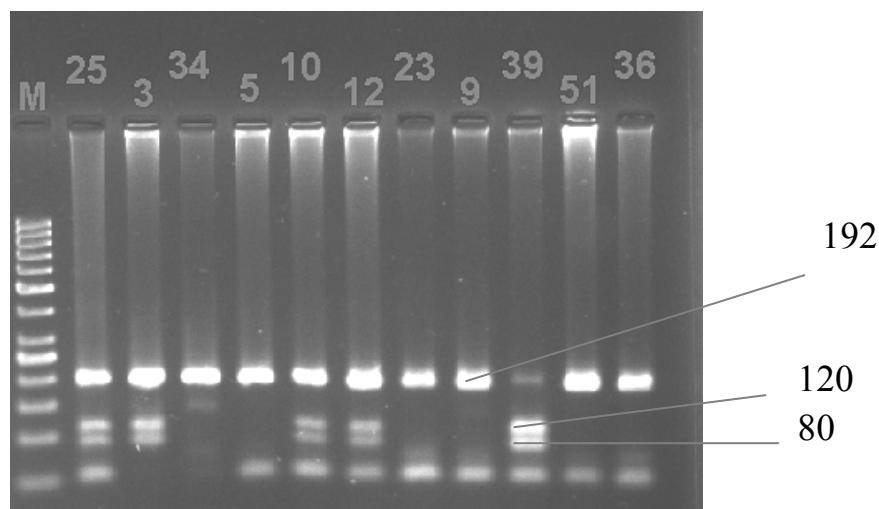


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации в 105 положении (рестриктаза Alw 261): сверху — номера проб; М — маркер длин ДНК *pUC/MspI*; слева — размеры амплифицированных фрагментов

На электрофореграмме после расщепления эндонуклеазой Bsh 1236 (114 положение) наличие продукта ПЦР с молекулярным весом 142 п.н. оценивали как val/val, продуктов амплификации 25 и 121 п.н. — ala/ala,

продуктов амплификации 142, 121 и 25 п.н. — как ala/val. Образец представлен на рис. 3.

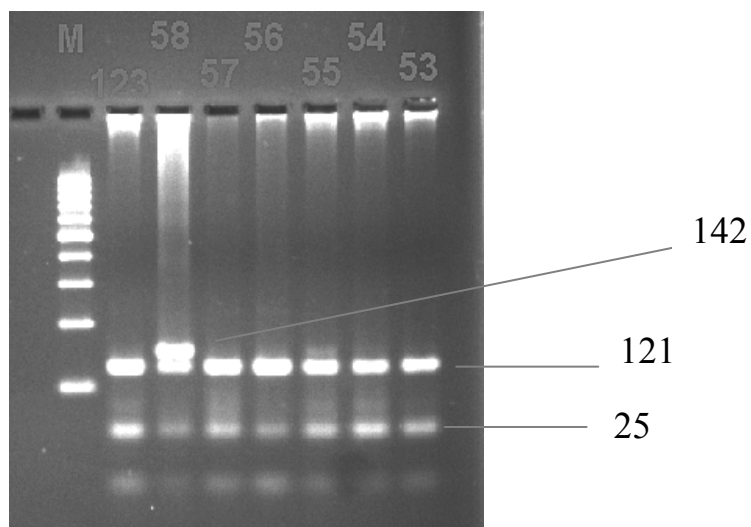


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации в 114 положении (рестриктаза Bsh 1236): вверху — номера проб; М — маркер длин ДНК *pUC/MspI*; слева — размеры амплифицированных фрагментов

Генетический полиморфизм гена глутатион-S-трансферазы P1 обусловлен заменой нуклеотидов в 313 (A-G) и 341 (T-C) положениях кДНК последовательности и представлен тремя аллелями: А, В и С. *GSTP1A* содержит изолейцин в 105 положении и аланин в 114 положении (Ple105/Ala114); *GSTP1B* содержит валин в 105 положении и аланин в 114 положении (Val105/Ala114); *GSTP1C* имеет валин в 105 и 114 положениях (Val105/ Val114). Функционально ослабленные аллели В и С условно объединили в аллель D. Таким образом, аллель D — это функционально ослабленный аллель В или С и генотип *GSTP1 D* включает в себя А/В, А/С, В/В, В/С, С/С.

Таблица 7

Анализ результатов амплификации с последующей рестрикцией *GSTP1* по регистрируемым на электрофореграмме полосам

	А/А	А/В	А/С	В/В	В/С	С/С
105 положение (Alw 261)	192 п.н.	192 п.н.	192 п.н.			
		120 п.н.	120 п.н.	120 п.н.	120 п.н.	120 п.н.
		80 п.н.	80 п.н.	80 п.н.	80 п.н.	80 п.н.
114 положение (Bsh 1236)			142 п.н.		142 п.н.	142 п.н.
	121 п.н.	121 п.н.	121 п.н.	121 п.н.	121 п.н.	
	25 п.н.	25 п.н.	25 п.н.	25 п.н.	25 п.н.	

Алгоритм ведения беременных

При постановке на учет по беременности:

1. Беременные из группы высокого перинатального риска
2. Наличие в анамнезе: мертворожденных, маловесных детей, рождение детей в асфиксии, младенческой смертности, обусловленной перинатальными причинами
3. Курение

Определение аллельного полиморфизма GSTT1, GSTM1, GSTP1

GSTM1 00/GSTT1+ или GSTM1+/GSTT1 00
или GSTM1 00/GSTT1 00
+GSTP1 D

Фермент GST отсутствует или ослаблен

Есть наследственная предрасположенность к ПН

GSTM1 00/GSTT1+ или GSTM1+/GSTT1 00
или GSTM1 00/GSTT1 00
+
GSTP1 A/A или GSTP1 A/C

Нарушение дыхательной функции плаценты
Развитие хронической гипоксии плода

1. Наблюдение в группе риска по формированию ПН
2. Для профилактики ПН использовать препараты, улучшающие маточно-плацентарный кровоток и микроциркуляцию, антигипоксанты
3. Ранняя профилактика ПН (14–16, 21–22, 27–28, 31–32 недели беременности)
4. УЗИ с доплерометрией в сроках 27–28, 31–32, 36–37 недель беременности
5. КТГ с 27 недель при каждой явке

GSTM1+/GSTT1+
+
GSTP1 A/A

Нормально
функционирующие GST

Отсутствует наследственная
предрасположенность к ПН

GSTM1+/GSTT1+
+
GSTP1 D

Нарушение трофической функции
плаценты
Развитие СЗРП

1. Наблюдение в группе риска по формированию ПН
2. Профилактика ПН препаратами, улучшающими метаболизм в плаценте
3. Ранняя профилактика ПН (14–16, 21–22, 27–28, 31–32 недели беременности)
4. УЗИ с доплерометрией в сроках 27–28, 31–32, 36–37 недель беременности
5. КТГ с 27 недель при каждой явке

При генотипах *GSTM1 00/GSTT1+* или *GSTM1+/GSTT1 00* или *GSTM1 00/GSTT1 00* или функционально ослабленном аллеле *C* гена *GSTP1* (генотип *GSTP1 A/C*) возникает риск нарушения дыхательной функции плаценты.

Профилактику плацентарной недостаточности следует проводить препаратами, улучшающими маточно-плацентарный кровоток и микроциркуляцию (спазмолитики, β_2 -адреномиметики, сосудорасширяющие, антиагреганты), антигипоксантами.

При функционально ослабленных аллелях гена *GSTP1 D* возникает риск нарушения трофической функции плаценты. Профилактику плацентарной недостаточности следует проводить препаратами, корригирующими обменные нарушения и улучшающими метаболизм (аминокислоты, витамины и их производные, активаторы клеточного метаболизма).

При генотипах *GSTM1 00/GSTT1+* или *GSTM1+/GSTT1 00* или *GSTM1 00/GSTT1 00* и генотипе *GSTP1 D* возникает риск нарушения дыхательной и трофической функций плаценты.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проведение метода ПЦР требует строгого соблюдения правил при организации и проведении всех этапов анализа ПЦР-лаборатории. При нарушении выполнения ПЦР могут быть неверные — ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Во избежание диагностических ошибок рекомендуется соблюдать правила работы в молекулярно-генетической лаборатории.