

Е.Ю. Брагина, М.Б. Фрейдин, И.А. Тен, Л.М. Огородова

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1* И *CYP2C19* У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, Томск
Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Представлены результаты исследования полиморфизмов по «нулевым» аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1*, а также генов *CYP2E1*, *CYP2C19* у больных атопической бронхиальной астмой и здоровых жителей г. Томска. Не установлено связи изученных полиморфизмов генов *CYP2C19* и *CYP2E1* со степенью тяжести астмы. Частота генотипа *GSTT1*+/*GSTM1*+ была значимо выше в контрольной группе ($p=0,0287$).

Ключевые слова: глутатион S-трансферазы, цитохром P-450, гены ферментов биотрансформации, полиморфизм

Введение

В развитие большинства патологий наряду с генетическими факторами существенный вклад вносит влияние окружающей среды. Постоянное воздействие на организм ксенобиотиков в экологически неблагоприятных регионах вызывает сбой в работе ферментативной системы метаболизма (ФМК), что приводит к росту многих социально значимых заболеваний. Поскольку негативное воздействие окружающей среды выступает фактором риска при бронхиальной астме (БА), то представляется перспективным изучение вклада генов, кодирующих ФМК и определяющих индивидуальную чувствительность к агентам окружающей среды, в возникновение и развитие данной патологии.

ФМК активно задействованы в метаболизме различных субстратов, в том числе и интермедиатов процессов воспаления. Одной из характерных особенностей этой группы ферментов является широкая межиндивидуальная вариабельность изозимного спектра, обусловленная генетическим полиморфизмом. Это позволяет определить среди индивидуумов группы «быстрых», «средних» и «медленных» метаболизаторов, различающихся в скорости деградации ксенобиотиков и эндогенных субстратов [1]. Возможно, эти различия играют определенную роль в формировании клинического фенотипа БА.

В представленной работе впервые изучены ассоциации полиморфизмов генов цитохромов P450 *2C19* и *2E1* со степенью тяжести у больных БА г. Томска, а также проведено сравнительное исследование в группе больных и контроле для генов *GSTT1* и *GSTM1*.

Материал и методы

Объектом исследования стала семейная выборка ($n=207$), из них 139 человек — больные атопической БА, проходящие курс лечения в областном Центре клинической иммунологии и аллергологии (областная детская больница, г. Томск). Выборку больных БА составили 68 индивидов женского пола и 71 — мужского пола (средний возраст $\pm S.D.$ 28,7 \pm 19,5). В качестве контроля использовали материал банка ДНК НИИ медицинской генетики 95 практически здоровых индивидов, не имеющих в анамнезе БА (среди них 5 женщин и 90 мужчин, средний возраст $\pm S.D.$ составил 41,2 \pm 7,9). Все участники исследования славянской национальности, проживающие на территории г. Томска. Исследование выполнено в соответствии с Правилами клинической практики в Российской Федерации, принятыми в 2003 г.

Проведено комплексное клиническое обследование, включающее оценку семейного анамнеза, мониторингирование клинических симптомов и функции легких. Подтверждение атопического статуса проведено с помощью кожных аллергопроб и исследования уровня IgE в сыворотке крови. Для диагноза БА и установления степени тяжести заболевания использованы критерии документа GINA 2002.

Для проведения молекулярно-генетического анализа были взяты образцы венозной крови в количестве 5-10 мл. Выделение ДНК проводили стандартным методом с фенол-хлороформной очисткой.

Генотипирование для генов *GSTT1* и *GSTM1* проводили с помощью мультиплексной ПЦР. Гомозиготность по «нулевым» аллелям генов

GSTT1 и *GSTM1* определяли по отсутствию соответствующих фрагментов размером 131 и 114 п.н. Наличие этих фрагментов свидетельствовало о гомо- либо гетерозиготности по одной нормальной копии гена. Нормальные аллели генов *GSTT1* и *GSTM1* обозначали «+/+», наличие делеции по одному гену «+/-», «-/+», соответственно, полная делеция по двум генам — «-/-». Для внутреннего контроля амплификации определяли фрагмент гена *ER* размером 181 п.н. [12].

Для гена *CYP2C19* определяли полиморфизм 681G>A в пятом экзоне, а также исследовали полиморфный вариант 7632T>A в шестом интроне гена *CYP2E1*, генотипирование осуществляли по опубликованным источникам [7, 11].

Для работы были использованы праймеры и рестриктазы, произведенные НПО «Сибэнзим» (г. Новосибирск). Продукты амплификации визуализировали в 3% агарозном геле в проходящем УФ-свете.

Для поиска ассоциаций изучаемой патологии с исследуемыми генетическими маркерами был применен тест на неравновесие по сцеплению Transmission/Disequilibrium Test (TDT) [5], а также определены величины отношения шансов (OR) с оценкой их значимости по точному тесту Фишера.

Результаты и обсуждение

Изучение полиморфизмов генов ФБК в последнее время привлекает особое внимание исследователей. Показано, что аллель *CYP1A1-Val*, мутация S2 гена *NAT2*, отсутствие мутации S1 в этом же гене и «нулевые аллели» генов *GSTT1* и *GSTM1* ассоциированы с предрасположенностью к БА у детей (Новосибирск) [2]. Найдены ассоциации полиморфизмов по «нулевым» аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* с БА (Санкт-Петербург) [3]. Многолетние исследования показали ассоциации между полиморфными вариантами *GSTT1* и *GSTM1* и процессами канцерогенеза, а также эндометриозом [11]. Пациенты, несущие делецию

генов обоих ферментов имеют более высокий риск развития раковых заболеваний [10].

Значение генов *CYP2C19* и *CYP2E1* в отношении атопической бронхиальной астмы у русских изучено впервые. Основным генетический дефект, найденный у «медленных» метаболизаторов (S)-мефенетоина — точечная замена G на A в пятом экзоне гена *CYP2C19* (*CYP2C19*2*) приводит к аберрантному сайту сплайсинга. Частота фенотипа «медленного» метаболизатора у европейцев встречается в 4-5 раз реже, чем у азиатов (2-5% и 13-20% соответственно) [13, 14].

Полиморфизм *CYP2E1* связан с наличием в шестом интроне гена аллелей C и D. В европеоидной популяции аллель C встречается с частотой до 90%, у монголоидов — до 50%. С аллелем D ассоциированы редкие мутации, влияющие на экспрессию гена и каталитическую активность соответствующего белка [9].

Распределение генотипов изучаемых полиморфизмов генов *CYP2C19* и *CYP2E1* соответствовало ожидаемому при распределении Харди-Вайнберга (Таблица 1), однако частота аллеля M гена *CYP2C19* в популяции русских жителей г. Томска составила 18,8%, что, по данным литературы, выше частоты, характерной для европеоидов [13, 14]. Этот факт позволяет предположить наличие специфики генофонда русских Томского региона, где присутствует в высокой степени примесь монголоидной компоненты.

Анализ семейного материала с помощью теста TDT показал отсутствие ассоциации изучаемых полиморфизмов генов *CYP2C19* (TDT=2,083, $p=0,139\pm0,003$) и *CYP2E1* (TDT=1,125, $p=0,324\pm0,004$) с атопической БА. Возможно, они не вовлечены в формирование данной патологии в исследованной выборке в г. Томске либо их роль очень мала, а также можно предположить, что данная система обладает в определенной степени универсальностью за счет широкой субстратной специфичности и индуцибельности, позволяю-

Таблица 1

Распределение генотипов *CYP2C19* и *CYP2E1* у больных бронхиальной астмой г. Томска

| Ген | Генотип | Абс. | % | Частота аллеля, % | χ^2 d.f.=1 |
|----------------|---------|------|------|-------------------|--------------------|
| <i>CYP2C19</i> | ww | 85 | 63,9 | W=81,2 M=18,8 | 2,32* $p>0,05$ |
| | wm | 46 | 34,6 | | |
| | mm | 2 | 1,5 | | |
| <i>CYP2E1</i> | cc | 65 | 79,3 | C=89,6 D=10,4 | 0,89* $p>0,05$ |
| | cd | 17 | 20,7 | | |
| | dd | 0 | 0,0 | | |

Примечание: * критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга.

Таблица 2

Распределение генотипов *CYP2C19* у больных бронхиальной астмой разной степени тяжести

| Генотип | Группы сравнения | | | | | |
|----------|------------------|------------|------------|--------|---------|----------|
| | I, n=28 | II, n=57 | III, n=48 | I→II** | I→III** | II→III** |
| ww, (%) | 18 (64,3) | 39 (68,4) | 28 (58,3) | 0,807 | 0,636 | 0,313 |
| wm, (%)* | 10 (35,7) | 17 (29,8) | 19 (39,6) | | | |
| mm, (%)* | 0 (0,0) | 1 (1,8) | 1 (2,1) | | | |
| p** | 0,535 | | | | | |

Примечание: * из-за малочисленности гомозигот «тт» объединили с гетерозиготами «wt». ** достигнутый уровень значимости по точному тесту Фишера.

Таблица 3

Распределение генотипов *CYP2E1* у больных бронхиальной астмой разной степени тяжести

| Генотип | Группы сравнения | | | | | |
|---------|------------------|-----------|-----------|--------|--------|--------|
| | I, n=25 | II, n=37 | III, n=20 | I→II | I→III | II→III |
| cc, (%) | 21 (84,0) | 26 (70,3) | 18 (90,0) | 0,245* | 0,678* | 0,111* |
| cd, (%) | 4 (16,0) | 11 (29,7) | 2 (10,0) | | | |
| dd, (%) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | | |
| p* | 0,191 | | | | | |

Примечание: * — достигнутый уровень значимости по точному тесту Фишера.

Таблица 4

Частоты комбинаций генотипов генов *GSTT1* и *GSTM1* у европеоидов, проживающих на территории России (в %)

| Генотип <i>GSTT1/GSTM1</i> | +/+ | +/- | -/+ | -/- | Источник |
|----------------------------|-------|-------|------|------|----------|
| Холмогоры | 65,31 | 22,45 | 10,2 | 2,04 | [4] |
| Ошвенск | 64,06 | 23,44 | 7,81 | 4,69 | |
| Москва | 66,0 | 22,0 | 10,0 | 2,0 | [6] |
| Санкт-Петербург | 51,2 | 32,6 | 11,6 | 4,7 | [3] |
| Новосибирск | 50,96 | 37,50 | 6,73 | 4,81 | [2] |

щей компенсировать недостаток одного фермента другим.

Был проведен анализ связи генотипов со степенью тяжести БА. Все больные индивиды были разделены на три группы в зависимости от клинических характеристик: I – легкая, II – средне-тяжелая, III – тяжелая БА. Связи между степенью тяжести и исследуемыми полиморфизмами генов *CYP2C19* ($p=0,535$) и *CYP2E1* ($p=0,191$) не выявлено. При попарном сравнении групп различных степеней тяжести БА статистически значимых различий также не обнаружено (Таблица 2, 3).

Семейство ферментов глутатионовых S-трансфераз (GST) играет большую роль в биотрансформации и детоксикации многочисленных различных по составу ксенобиотиков и ряда эндогенных субстратов [1, 3]. Для генов *GSTT1* и *GSTM1* показан полиморфизм по «нулевым» аллелям, представляющий собой протяженные делеции, результатом которых являются укороченные бел-

ковые продукты без выраженной ферментативной активности. Частота «нулевого» аллеля гена *GSTM1* варьирует от 40 до 60% в различных популяциях и этнических группах [8]. Обширная делеция в структурной части гена *GSTT1* (нуль-аллель) встречается у европейцев с частотой до 30% [1, 12]. Из сравнительного анализа распределения частот комбинаций генотипов *GSTT1* и *GSTM1* среди европеоидов, проживающих на территории России (Таблица 4, 5), в контрольной выборке отмечена несколько повышенная частота (6,3%) именно по «нулевым» аллелям изучаемых генов. Результаты исследования (Таблица 6) в целом согласуются с опубликованными данными, однако в группе больных частота генотипа *GSTM1* «+» значительно ниже, чем в контроле ($p=0,0108$). При сравнении распределения генотипов с полной делецией по двум генам GST и остальных генотипов в группе больных и контроле (Таблица 7) наблюдалась некоторая тенденция к увеличению

Таблица 5

Частоты комбинаций генотипов *GSTM1* и *GSTT1* у больных atopической бронхиальной астмой и в контроле

| Генотип <i>GSTT1/GSTM1</i> | +/-, (%) | -/+, (%) | +/+, (%) | -/-, (%) |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Больные, (n=72) | 43 (59,72) | 5 (6,95) | 16 (22,22) | 8 (11,11) |
| Здоровые, (n=95) | 42 (44,2) | 10 (10,5) | 37 (39,0) | 6 (6,3) |
| OR* | 1,87 (0,96-3,36) | 0,63 (0,18-2,15) | 0,45 (0,21-0,94) | 1,86 (0,55-6,39) |
| p** | 0,0607 | 0,5864 | 0,0287 | 0,3985 |

Примечание: * отношение шансов (95%-ый доверительный интервал); ** достигнутый уровень значимости по точному тесту Фишера.

Таблица 6

Распределение «нулевых» и «ненулевых» генотипов у больных atopической бронхиальной астмой и здоровых жителей г. Томска

| Группы сравнения | <i>GSTT1</i> | | <i>GSTM1</i> | |
|------------------|--------------|-----------|--------------|-----------|
| | «+», (%) | «-», (%) | «+», (%) | «-», (%) |
| Больные | 59 (81,9) | 13 (18,1) | 21 (29,2) | 51 (70,8) |
| Здоровые | 79 (83,2) | 16 (16,8) | 47 (49,5) | 48 (50,5) |
| p* | 0,8397 | | 0,0108 | |

Примечание: * достигнутый уровень значимости по точному тесту Фишера.

Таблица 7

Распределение генотипов генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных atopической бронхиальной астмой и здоровых

| Группы сравнения | <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> «+»*, (%) | <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> «-»**, (%) |
|------------------|--|---|
| Больные | 64 (88,9) | 8 (11,1) |
| Здоровые | 89 (93,7) | 6 (6,3) |
| p*** | 0,3985 | |

Примечание: * наличие хотя бы одного «ненулевого» аллеля генов; ** полная делеция; *** достигнутый уровень значимости по точному тесту Фишера.

в группе здоровых, имеющих хотя бы одну нормальную копию гена, однако эти различия статистически незначимы (p=0,3985).

Для генов семейства *GST* анализ семейного материала методом TDT невозможен по причине трудности в определении наследования гетерозиготного (+/-) и гомозиготного (++) генотипа по нормальному аллелю. Поэтому для данных генов были определены величины отношения шансов (OR), характеризующие степень риска развития БА (Таблица 5). В группе контроля комбинация генотипов «++» встречается значимо чаще, чем среди больных (OR=0,45, 95% CI=0,21–0,94, p=0,0287). Возможно, в данном случае такое сочетание генотипов *GSTT1/GSTM1* «++» может выступать как фактор устойчивости для развития БА. Для остальных сочетаний генотипов генов *GST* значимых отличий не показано.

Таким образом, можно предположить, что изучаемые полиморфизмы генов *CYP2C19* и *CYP2E1* не вовлечены в развитие atopической БА в выбор-

ке г. Томска. Однако нормальная работа ферментов фазы детоксикации ксенобиотиков (глутатион S-трансфераз), обеспечивающая утилизацию и выведение токсических продуктов метаболизма из организма, уменьшает риск возникновения заболевания. Учитывая то, что БА — мультифакторальная патология, для изучения вклада генов системы биотрансформации необходим дальнейший поиск ассоциаций их полиморфизмов с количественными и качественными признаками, играющими существенную роль в патогенезе заболевания.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (01-04-48213) и гранта поддержки ведущих научных школ (ВНШ-840.2003.4) и молодых ученых-кандидатов наук РФ (МК-742.2003.04).

Polymorphism of xenobiotic metabolism genes of the glutathione S-transferase (*GSTT1*, *GSTM1*) and cytochrome P450 (*CYP2E1* AND *CYP2C19*) in patients with atopical bronchial asthma

E.Yu. Bragina, M.B. Freidin, I.A. Ten, L.M. Ogorodova

Polymorphic variants of the *GSTT1*, *GSTM1* null alleles *CYP2E1*, *CYP2C19* were analyzed in patients with atopical bronchial asthma (BA) and healthy individuals from Tomsk. No association was observed for *CYP2C19*, *CYP2E1* and BA severity. The frequencies *GSTT1*+/*GSTM1*+ genotypes was significantly higher in control group ($p=0,0287$).

Литература

1. Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В., Гавалов С.М. // Генетика. — 2002. — Т. 38. — № 4. — С. 539-545.
2. Геном человека и гены «предрасположенности» / В.С. Баранов, В.Е. Баранова, Т.Э. Иващенко, М.В. Асеев // Введение в предиктивную медицину. — С-Пб., 2000. — 272 с.
3. Иващенко Т.Э., Седелева О.Г., Петрова М.А. и др. // Генетика. — 2001. — Т. 37. — № 1. — С. 107-111.
4. Попова С.Н., Сломинский П.А., Галушкин С.Н. и др. // Генетика. — 2002. — Т. 38. — № 2. — С. 281-284.
5. Фрейдин М.Б., Кобякова О.С., Огородова Л.М. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Приложение 1. — 2000. — Т. 129. — С. 50-52.
6. Шадрина М.И., Кондратьева Е.А., Сломинский П.А. и др. // Генетика. — 2002. — Т. 38. — № 11. — С. 1566-1568.
7. De Morais Sonia M. F., Wilkinson Grant R., Blaisdell Joyce et al. // The Journal of Biological Chemistry. — 1994. — Vol. 269. — № 22. — P. 15419-15422.
8. Hatagima A., Klautau-Guimaraes M.A., da Silva F.P., Cabello P.H. // Genetics and Molecular Biology. — 2000. — Vol. 23. — № 4. — P. 709-713.
9. Hu Yin, Oscarson Mikael, Johansson Inger et al. // Mol. Pharm. — 1997. — Vol. 51. — P. 370-376.
10. Kim W.-J., Lee H.-L., Lee S.-C. et al. // The Journal of Urology. — 2000. — Vol. 164. — P. 209-213.
11. Lin D.-X., Tang Y.-M., Peng Q. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 1998. — Vol. 7. — P. 1013-1018.
12. Spurdle A.B., Webb P.M., Purdie D.M. et al. // Carcinogenesis. — 2001. — Vol. 22. — P. 67-72.
13. Wilson J.F., Weale M.E., Smith A.C. et al. // Nature Genet. — 2001. — Vol. 29. — P. 265-269.
14. Xie H.G., Kim R.B., Stein C.M. et al. // British Journal of Clinical Pharmacology. — 1999 — Vol. 48. — Is. 3. — P. 402-408.