

ГЕНЕТИКА И ПРОТЕОМИКА

УДК 575.17(571.53)

Е.В. Беляева, О.А. Ершова

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ КЛАССА PI У ПОДРОСТКОВ ИЗ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ БУРЯТ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

В работе показана частота аллелей и генотипов полиморфных маркеров A313G и C341T гена GSP1 у подростков из этнической группы бурят. Проведено генотипирование образцов ДНК методом полимеразной цепной реакции. Выявлено, что для маркера A313G частота аллелей A и G составляет 0,809 и 0,191, соответственно. Для маркера C341T частота аллелей C и T составляет 0,973 и 0,027 соответственно. В изученной популяции по A313G маркеру частоты аллелей и генотипов находятся в соответствии с равновесием Харди – Вайнберга, по C341T маркеру наблюдается отклонение от данного равновесия.

Ключевые слова: полиморфизм генов, этнические группы, подростки

POLYMORPHISM OF GENE GLUTATHION-S-TRANSFERASE PI IN TEENAGERS FROM BURYAT ETHNIC GROUP LIVING IN THE IRKUTSK REGION

E.V. Belyaeva, O.A. Yershova

Scientific Centre for the Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

Background. Human glutathione-S-transferases play an important role in phase II detoxification process. But polymorphism in the GSP1 gene has not been studied in certain populations.

Aim: to determine the distribution of allele and genotype frequencies of GSP1 gene in teenagers from Buryat ethnic group.

Materials and methods. Blood samples were obtained from 55 teenagers from Buryat ethnic group. There were 28 males and 27 females with an age of 14.05 ± 0.99 years over the range of 13 to 16. DNA was isolated from blood samples. The polymerase chain reaction was used to amplify A313G and C341T markers of the GSP1 gene. Chi-square testing was used to evaluate the significant difference of the GSP1 genotype frequencies between observed and expected values.

Results. Allele and genotype frequencies of A313G and C341T markers GSP1 were determined in teenagers from Buryat ethnic group. The study showed that the frequencies of A and G alleles at the A313G marker were 0.809 and 0.191 while those of C and T alleles at the C341T marker were 0.973 and 0.027, respectively. The distribution of the genotype frequencies at the A313G marker were consistent with expected in a Hardy – Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.77$; d.f. = 1; $p > 0.05$). However, the distribution of the genotype frequencies at the C341T marker were not consistent with expected in a Hardy – Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.043$; d.f. = 1; $p < 0.05$). It was because the homozygous of T allele was not found in the ethnic group of Buryat.

Key words: gene polymorphism, ethnic groups, teenagers

Роль глутатион-S-трансфераз в жизнедеятельности организма связана с их участием в метаболических защитных реакциях, протекающих в клетке. Эти ферменты участвуют в процессах детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защите.

В клетке процессы детоксикации запускают метаболические реакции, направленные на снижение активности ксенобиотиков. Их детоксикация происходит в два этапа: на первом этапе освобождаются функциональные группы ксенобиотика с образованием водорастворимых соединений, а на втором этапе с помощью ферментов глутатион-S-трансфераз происходит присоединение к функциональным группам ксенобиотика других групп или молекул [6, 11]. В результате этих реакций большинство ксенобиотиков становятся более гидрофильными и менее токсичными, поступают в плазму крови и удаляются из организма благодаря работе почек.

Кроме этого, благодаря способности восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя глутатион в качестве косубстрата, глутатион-S-трансферазы участвуют в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и пероксидов ДНК, играя важную роль в работе антиоксидантной защиты (АОЗ) [13]. Сохранение оптимального для клетки соотношения восстановленного и окисленного глутатиона является существенным для её жизнеспособности [3]. Изменения в системе ПОЛ и АОЗ являются одними из ключевых патогенетических звеньев в развитии патологических процессов у человека [4, 5].

Таким образом, участвуя в процессах детоксикации ксенобиотиков и в антиоксидантной защите клеток, глутатион-S-трансферазы катализируют связывание глутатиона с функциональными группами эндогенных и экзогенных соединений (канцерогенов, липидов, продуктов ПОЛ), защищая клетку от их

токсического действия [16, 18]. У млекопитающих глутатион-S-трансферазы присутствуют практически во всех органах и тканях и начинают экспрессироваться еще в эмбриональном периоде развития [17].

Классификация глутатион-S-трансфераз основана на сходстве их аминокислотной последовательности и включает шесть классов, названных буквами греческого алфавита: α – альфа, μ – мю, π – пи, θ – тета, σ – сигма, ω – омега [13]. К настоящему моменту наиболее изученными являются три класса глутатион-S-трансфераз: *GSTM* (класс мю), *GSTT* (класс тэта) и *GSTP* (класс пи). Семейства *GSTM* и *GSTT* состоят из кластера генов. В π -классе один фермент и соответственно один ген – *GSTP1* (глутатионтрансфераза класса пи-1).

Ген *GSTP1* локализован на длинном плече 11-й хромосомы (11q13) и характеризуется полиморфизмом. Под этим понятием подразумевают наличие нескольких вариантов одного гена, которые в отличие от мутаций широко распространены в популяции, с частотой более 1 %. Наличие изоформ ферментов эволюционно связано с адаптацией человека к различным климатическим, экологическим и другим факторам [10].

Один из полиморфных маркеров гена *GSTP1* связан с заменой аденина на гуанин (A/G) в 5 экзоне, в 313 положении гена, другой полиморфизм этого гена обусловлен заменой нуклеотидного основания цитозин на тимин (C/T) в 6 экзоне, в 341 положении гена [14]. Следствием первой нуклеотидной замены при синтезе фермента в 105 положении пептида аминокислота изолейцин меняется на валин (ile/val). Результатом второй нуклеотидной замены является замена аминокислоты аланин на валин (ala/val) в 114 положении пептида. Обе нуклеотидные замены находятся в активном центре фермента и приводят к значительному снижению его функциональной активности [1].

Полиморфные варианты генов определяют различную ферментативную активность соответствующих белковых продуктов. Поэтому в зависимости от особенностей генома различные индивидуумы могут обладать устойчивостью или повышенной чувствительностью к действию повреждающих факторов [8]. Наличие в организме человека функционально ослабленных вариантов ферментов повышает восприимчивость организма к вредным воздействиям и, как следствие, к увеличению риска развития некоторых заболеваний [1, 9, 12]. Клинические проявления мультифакториальных заболеваний имеют отличия у представителей разных этнических групп [2]. Это связано с различной частотой распространения аллелей и генотипов полиморфных генов, ассоциированных с риском возникновения мультифакториальных заболеваний, в различных популяциях человека. Полиморфизм генов семейства глутатион-S-трансфераз широко изучается в связи с предрасположенностью к различным заболеваниям, при этом недостаточно изучена их распространенность у представителей отдельных этносов. Изучение особенностей распространения полиморфных маркеров позволяет по-новому взглянуть на эволюцию и проблемы этногенеза [7]. Целью данного исследования стало оценить рас-

пространенность частоты аллелей и генотипов двух полиморфных маркеров *A313G* и *C341T* гена *GSTP1* у подростков из этнической группы бурят, проживающих в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа исследования была сформирована в Усть-Ордынском Бурятском округе, который является административно-территориальной единицей на юго-востоке Иркутской области. Участниками исследования стали 55 подростков из коренной бурятской этногруппы. Группа была однородной по гендерному составу и включала 27 девочек и 28 мальчиков, в возрасте от 13 до 16 лет ($\mu = 14,05$; $\sigma = 0,99$). Этническая принадлежность подростков определялась с учетом фенотипических особенностей и данных генеалогического анамнеза. Группа исследования была сформирована методом случайной сплошной выборки во время проведения профилактических осмотров в школах. В работе с подростками соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000 ред.)).

Всем участникам исследования было проведено молекулярно-генетическое тестирование для определения вариантов генотипа двух полиморфных маркеров гена *GSTP1*. Исследовали маркер, связанный с заменой нуклеотида аденин на гуанин (A/G) в 313 положении гена, и маркер, связанный с заменой цитозина на тимин (C/T) в 341 положении гена. Однонуклеотидная замена *A313G* в базе данных NCBI (национальный центр биотехнологической информации) обозначается rs1695, замена *C341T* – rs1138272.

Материалом для исследования полиморфизма генов служили образцы цельной венозной крови, забор которой производился из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА в соотношении 1:100. В дальнейшем из образцов крови выделяли ДНК с использованием реагентов «ДНК-Сорб-В» (производитель – ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Исследование *A313G* и *C341T* полиморфизмов гена *GSTP1* проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в автоматическом термоциклере «Терцик» с использованием наборов реагентов для амплификации и рестрикции ДНК, производитель ФГУП «ГосНИИ генетика», Россия. Детекцию продуктов амплификации осуществляли в 7% акриламидном геле. Результаты электрофореза анализировали в проходящем УФ-свете с использованием трансиллюминатора ТСП-20.М (производитель – «Vilber Lourmat», Франция), кабинета для просмотра гелей и видеосистемы для регистрации «Gel Imager» (производитель – «Helicon», Россия).

Статистическая обработка полученных в ходе исследования данных проводилась на персональном компьютере с помощью программы Excel и пакетов прикладных программ Biostat и STATISTICA, версия 6.1 StatSoft Inc., США (правообладатель лицензии – ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН). Для описания количественных признаков использовали следующие показатели

описательной статистики: среднее (μ) и стандартное отклонение (σ). При анализе частотного распределения полиморфных маркеров *A313G* и *C341T* гена *GSTP1* фактическую частоту генотипов проверяли на соответствие частотам аллелей, исходя из закона генетического равновесия Харди – Вайнберга. Для сравнения наблюдаемой и ожидаемой частоты генотипов использовали критерий χ^2 . Нулевую гипотезу об отсутствии статистически значимых отличий отвергли при уровне значимости 5 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено молекулярно-генетическое исследование двух полиморфных маркеров гена *GSTP1* у подростков коренной бурятской этногруппы, проживающих в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области. Полиморфный маркер *A313G*, связанный с заменой аденина на гуанин, имеет два аллеля (*A*, *G*) и три варианта генотипа (*AA*, *AG*, *GG*). Полиморфный маркер *C341T*, связанный с заменой цитозина на тимин, имеет аллели *C* и *T*, и генотипы *CC*, *CT*, *TT*. Частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров *A313G* и *C341T* гена *GSTP1* представлены в таблице 1.

Выявлено, что в частотном распределении аллелей маркера *A313G* в изученной популяции наблюдается преобладание частоты аллеля *A* над частотой аллеля *G*. Для маркера *C341T* также наблюдается преобладание частоты аллеля *C* над частотой аллеля *T*, что характерно и для других мировых популяций [база данных ALFRED (The Allele Frequency Database)]. Тем не менее, частота более редких аллелей указанных маркеров имеет популяционные отличия. Так, частота аллеля *G* маркера *A313G* и частота аллеля *T* маркера *C341T* в европейских популяциях выше, чем в азиатских. В эстонской, немецкой и финской популяциях частота аллеля *G* маркера *A313G* составляет 0,35, 0,33 и 0,28 соответственно, что на 10–20 % выше, чем в китайской, корейской и тайской популяциях, в которых частота аллеля *G* составляет 0,19, 0,18 и 0,16 соответственно [15].

В то же время, частота аллеля *T* маркера *C341T* в европейских популяциях на порядок выше, чем в азиатских. Так, в эстонской, немецкой и финской популяциях частота аллеля *T* составляет 0,11, 0,12 и 0,09 соответственно, в китайской и тайской популяциях – 0,01 и 0,02 соответственно. В этнической группе

бурят, по результатам собственного исследования, частота аллеля *G* маркера *A313G* составила 0,191, а частота аллеля *T* маркера *C341T* составила 0,027, что соответствует частоте распространения этих аллелей в других азиатских популяциях.

Исходя из того, что структура генофонда популяции описывается основным законом популяционной генетики – законом Харди – Вайнберга, частотное распределение наблюдаемых генотипов полиморфных маркеров *A313G* и *C341T* проверяли на соответствие фактической частоте аллелей. Выявлено, что для полиморфного маркера *A313G* наблюдается равновесие между частотами аллелей и генотипов ($\chi^2 = 0,77$; d.f. = 1; $p > 0,05$), а для полиморфного маркера *C341T* наблюдается незначительное отклонение от равновесия Харди – Вайнберга ($\chi^2 = 0,043$; d.f. = 1; $p < 0,05$), которое вызвано отсутствием гомозигот по аллелю *T*.

Многочисленные популяции человека группируются в три основные расы: европеоидную, монголоидную и негроидную. Упомянувшиеся в статье популяции – эстонская, немецкая и финская – составляют европеоидную расу человека, к которой относится коренное население Европы, Южной Азии и Северной Африки. Азиатские популяции – китайская, корейская, тайская и бурятская – составляют монголоидную расу, к которой относится коренное население Центральной и Восточной Азии, Индонезии, Сибири. В целом, черты, характеризующие разные расы, являются результатом адаптации человека к различным климатическим, географическим и другим условиям среды. Поэтому, полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз, определяющий наличие нескольких форм белка, которые в свою очередь обладают различной ферментативной активностью, можно рассматривать как одну из расовых характеристик.

Результаты проведенного исследования показали, что частоты аллелей полиморфных маркеров *A313G* и *C341T* гена *GSTP1* в этнической группе бурят, проживающих в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области, соответствуют частоте этих аллелей в других азиатских популяциях. Особенности в частоте распределения аллелей гена *GSTP1*, которые наблюдаются в различных мировых популяциях, могут определять различный уровень метаболических реакций, связанных с процессами детоксикации и антиоксидантной защиты клеток. В свою очередь, это может вносить вклад в индивидуальную воспри-

Таблица 1
Распределение частот генотипов и аллелей гена *GSTP1* в группе подростков бурят

Полиморфные маркеры гена <i>GSTP1</i>	Аллели	Частота	Вариант генотипа	Частота	χ^2 , d.f. = 1	p
Маркер <i>A313G</i>			<i>AA</i>	0,636	0,77	> 0,05
	<i>A</i>	0,809	<i>AG</i>	0,346		
	<i>G</i>	0,191	<i>GG</i>	0,018		
Маркер <i>C341T</i>			<i>CC</i>	0,945	0,043	< 0,05
	<i>C</i>	0,973	<i>CT</i>	0,055		
	<i>T</i>	0,027	<i>TT</i>	0		

Примечание: χ^2 использовали для оценки разницы между наблюдаемой и ожидаемой частотой генотипов.

имчивость к заболеваниям, ассоциированным с данными генетическими маркерами, у представителей различных популяций.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. – СПб.: Н-Л, 2009. – 527 с.

Baranov VS (2009). The genetic passport – the basis of individual and predictive medicine [Geneticheskiy pasport – osnova individual'noy i prediktivnoy meditsiny], 527.

2. Даренская М.А. Этнические и региональные аспекты патологических процессов у человека // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 2, Ч. 2. – С. 145–151.

Darenskaya MA (2012). Ethnic and regional aspects of human pathological processes [Etnicheskie i regional'nye aspekty patologicheskikh protsessov u cheloveka]. *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra*, (2), 145–151.

3. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.

Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD (2014). The role of glutathione, glutathione and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes [Rol' glutathiona, glutationtransferazy i glutaredoksina v regulatsii redoks-zavisimyykh protsessov]. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, (54), 299–348.

4. Колесникова Л.И., Курашова Н.А., Гребенкина Л.А., Долгих М.И., Лабыгина А.В., Сутурина Л.В., Дашиев Б.Г., Даржаев З.Ю. Особенности окислительного стресса у мужчин разных этнических групп с ожирением и бесплодием // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2011. – Т. 44, № 1. – С. 38–41.

Kolesnikova LI, Kurashova NA, Grebenkina LA, Dolgih MI, Labygina AV, Suturina LV, Dashiev BG, Darzhaev ZJ (2011). Features of oxidative stress in men of different ethnic groups, obesity and infertility [Osobennosti oksiditel'nogo stressa u muzhchin raznykh etnicheskikh grupp s ozhireni-em i besplodiem]. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*, 44 (1), 38–41.

5. Колесникова Л.И., Гребенкина Л.А., Даренская М.А., Власов Б.Я. Окислительный стресс как неспецифическое патогенетическое звено репродуктивных нарушений (обзор) // Сибирский научный медицинский журнал. – 2012. – Т. 32, № 1. – С. 58–66.

Kolesnikova LI, Grebenkina LA, Darenskaja MA, Vlasov BJ (2012). Oxidative stress as a nonspecific pathogenetic link of reproductive disorders (review) [Oksiditel'nyy stress kak nespetsificheskoe patogeneticheskoe zveno reproduktivnykh narusheniy (obzor)]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 32 (1), 58–66.

6. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 8–12.

Kulinskiy VI (1999). Neutralization of xenobiotics [Obezvrezhivanie ksenobiotikov]. *Sorostovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*, (1), 8–12.

7. Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы. – М.: Наука, 2012. – 261 с.

Limborska SA, Khusnutdinova EK, Balanovskaya EV (2012). Ethnogenomics and genogeography of peoples of Eastern Europe [Etnogenomika i genogeografiya narodov Vostochnoy Evropy], 261.

8. Мусин А.Г., Хазиева А.В., Нигматуллина А.Э. Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков, его роль в биотрансформации лекарственных препаратов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 211–216.

Musin AG, Khaziyev AV, Nigmatullina AE (2014). Polymorphism of genes of xenobiotic detoxification system, its role in the biotransformation of drugs [Polimorfizm genov sistemy detoksikatsii ksenobiotikov, ego rol' v biotransformatsii lekarstvennykh preparatov]. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*, 9 (2), 211–216.

9. Полтанова А.А., Агаркова Л.А., Бухарина И.Ю. Функциональные различия генетически детерминированных вариантов системы детоксикации ксенобиотиков в формировании осложнений гестационного процесса // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – 9 с.

Poltanova AA, Agarkova LA, Bukharin IY (2013). Functional differences are genetically determined variants of xenobiotic detoxification system in the formation process of gestational complications [Funktsional'nye razlichiya geneticheski determinirovannykh variantov sistemy detoksikatsii ksenobiotikov v formirovanii oslozhneniy gestatsionnogo protsesssa]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, (6), 9.

10. Спицин В.А. Экологическая генетика человека. – М.: Наука, 2008. – 503 с.

Spitsin VA (2008). Environmental human genetics [Ekologicheskaya genetika cheloveka], 503.

11. Черняк Ю.И., Грассман Д.А., Колесников С.И. Влияние стойких органических загрязнителей на биотрансформацию ксенобиотиков. – Новосибирск: Наука, 2007. – 134 с.

Chernyak YI, Grassman DA, Kolesnikov SI (2007). The impact of persistent organic pollutants exposure on xenobiotics biotransformation [Vliyanie stoykikh organicheskikh zagryazniteley na biotrasformatsiyu ksenobiotikov], 134.

12. Шенин В.А., Лабыгина А.В., Урыбин И.Ю., Сутурина Л.В., Лазарева Л.М., Ермолова Е.В., Беляева Е.В. Полиморфизм генов системы детоксикации у женщин с генитальным эндометриозом и бесплодием // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – № 2. – С. 74–75.

Chenin VA, Labygina AV, Urybin IY, Suturina LV, Lazarev LM, Yermolov EV, Belyaeva EV (2009). Polymorphism of genes of detoxification system in women with endometriosis and infertility [Polimorfizm genov sistemy detoksikatsii u zhenshchin s genital'nyim endometriozyom i besplodiem]. *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra*, (2), 74–75.

13. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005). Glutathione transferases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, (45), 51–88.

14. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S (1999). Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, (54), 693–696.

15. Kangsadalampai S, Gamnarai P, Rojpiibulstit P (2008). Gene frequencies of the polymorphic human glutathione S-transferase class Pi: are they race-dependent? *Thammasat Int. J. Sci. Tech.*, 1 (1), 17-21.
16. Tew KD, Townsend DM (2012). Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxidants & Redox Signaling*, (17), 1728-1737.
17. Van Lieshout E, Knapen M, Lange W (1998). Localization of glutathione-S-transferase α and π in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age. *Human Reproduction*, (13), 1380-1386.
18. Wu B, Dong D (2012). Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, (33), 656-668.

Сведения об авторах
Information about the authors

Беляева Елена Владимировна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664000, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 20-76-36; e-mail: belyeva_irk@mail.ru)

Belyaeva Elena Vladimirovna – Candidate of Biological Sciences, Junior Research Officer at Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (664000, Irkutsk, Timiryazev Str., 16; tel.: +7 (3952) 20-76-36; e-mail: belyeva_irk@mail.ru)

Ершова Оксана Александровна – кандидат биологических наук, и.о. научного сотрудника ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: oksana111088@mail.ru)

Ershova Oksana Alexandrovna – Candidate of Biological Sciences, acting Research Officer at Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: oksana111088@mail.ru)