

Е.Е. Ступко, Т.Б. Цыренов, А.В. Лабыгина, Л.В. Сутурина, Л.И. Колесникова

ЧАСТОТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНОВ ВТОРОЙ ФАЗЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН РУССКОЙ И БУРЯТСКОЙ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Сибирского отделения РАМН (Иркутск)

В статье представлены результаты анализа распределения генотипов и аллелей полиморфных локусов генов *GSTP1* (*A, *B, *C, *D), *GSTT1* (del) и *GSTM1* (del) у 28 женщин русской и 30 женщин бурятской этнических групп. В результате работы было показано статистически значимое различие по носительству генотипа AC гена *GSTP1* среди исследуемых групп. По носительству других генотипов генов *GSTP1*, *GSTT1* и *GSTM1* достоверных различий не показано.

Ключевые слова: глутатион-S-трансферазы, полиморфные варианты генов детоксикации ксенобиотиков, этнические группы

FREQUENCY CHARACTERISTICS OF THE GENES OF THE SECOND PHASE OF DETOXIFICATION OF XENOBIOTICS IN WOMEN OF RUSSIAN AND BURYAT ETHNIC GROUPS

E.E. Stupko, T.B. Tsyrenov, A.V. Labygina, L.V. Suturina, L.I. Kolesnikova

Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk

The article presents the results of the analysis of the distribution of genotypes and alleles of polymorphic loci gene *GSTP1* (*A, *B, *C, *D), *GSTT1* (del) and *GSTM1* (del) in 28 women Russian and 30 women of Buryat ethnic groups. As a result, the work showed a statistically significant difference in genotype AC gene *GSTP1* among the study groups. As carriers of other genotypes of genes *GSTP1*, *GSTT1*, and *GSTM1* showed no significant difference.

Key words: glutathione-S-transferase, polymorphic variants of genes of detoxification of xenobiotics, ethnic groups

Глутатион опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и предотвращению поломок ДНК. Помимо этого, глутатионтрансферазам (GST) принадлежит важная роль внутриклеточных переносчиков различных форм билирубина, гормонов, а также в биосинтезе некоторых физиологически активных веществ — простагландинов. GST присутствуют в самых разных тканях, обнаруживая выраженные межтканевые различия в отношении их различных классов. Особенно высока их концентрация в печени, плаценте, легких, мозге, кишечнике, почках [3]. GST катализируют взаимодействие глутамата с электрофильными атомами азота, углерода, серы, кислорода и отвечают за конъюгацию сульфгидрильной группы с молекулами ксенобиотиков. Полиморфизм GST определяет индивидуальную чувствительность организма к воздействию факторов внешней среды [2]. Известно, что функционально неполноценные аллели генов, кодирующих ферменты второй фазы детоксикации ксенобиотиков, играют важную роль в патогенезе целого ряда заболеваний, таких как: эндометриоз, рак яичников, внутриэпителиальная неоплазия, лейомиома [1]. Показан существенный вклад полиморфизмов генов детоксикации ксенобиотиков в предрасположенность к развитию

бронхиальной астмы [4]. Это происходит за счет того, что индивидуумы, имеющие функционально неполноценные аллели генов биотрансформации ксенобиотиков могут оказаться более чувствительными к действию повреждающих факторов. Гены биотрансформации ксенобиотиков вовлечены в процессы канцерогенеза у человека из-за наличия мутантных вариантов, снижающих или блокирующих экспрессию генов. Работами некоторых авторов [10] было показано, что в результате снижения функциональной активности белковых продуктов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков исчезает способность гена p53 останавливать клеточный цикл для свершения репарационных процессов, что в дальнейшем приводит к повреждению клетки и канцерогенезу. Однако литературные данные по полиморфизму генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков при различных заболеваниях противоречивы в связи с популяционными особенностями и статусом других генов. Так, например, чрезвычайно широко распространен в человеческих популяциях именно «нулевой» аллель глутатион-S-трансферазы M1 (*GSTM1*). Установлено, что в большинстве групп мирового народонаселения частота данного аллеля может достигать 55 % и выше [3]. По данным В.С. Баранова, пропорция людей, гомозиготных по нулевому аллелю, то есть практически лишенных

одного из семейств GST, составляет 35 – 50 % [2]. Таким образом, проблема этнических различий в чувствительности к различным патологиям, особенно онкозаболеваниям, по-прежнему остается актуальной.

Целью данного исследования явилось определение частотных характеристик генов второй фазы детоксикации ксенобиотиков (GSTP1, GSTT1 и GSTM1) у женщин русской и бурятской этнических групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН в 2011 – 2012 гг. Первую группу составили 28 женщин русской этнической группы в возрасте $37,2 \pm 4,8$ лет, вторую – 30 женщин бурятской этнической группы в возрасте $31,0 \pm 5,3$ лет без соматических и гинекологических заболеваний. Всем пациенткам было проведено стандартное клиническое обследование, включающее гинекологический осмотр и ультразвуковое исследование.

ДНК выделяли из венозной крови пациенток с помощью набора «ДНК экспресс-кровь» фирмы Литех (Москва), а также с помощью набора «ДНК-сорб-В», произведенного ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва). Для выявления полиморфизмов гена GSTP1 и делеционного полиморфизма в генах GSTT1 и GSTM1 использовался метод полимеразной цепной реакции рестрикции фрагментов с использованием наборов реактивов фирмы ФГУП «ГосНИИ генетика» (Москва) в амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили методом вертикального электрофореза в 7% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием.

В работе с больными соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000)).

В исследовании использовались вычислительные методы математической статистики, реализованные в лицензионном интегрированном статистическом пакете комплексной обработки данных STATISTICA 6.1 Stat-Soft Inc, США.

Статистическую оценку достоверности различия распределения полиморфных вариантов между выборками проводили с использованием критерия χ^2 . Все различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический полиморфизм глутатион-S-трансферазы P1 (GSTP1), обусловленный заменой нуклеотидов в 313 и 341 положениях TP1 приводит к появлению четырех функционально различных форм фермента. GSTP1*A содержит изолейцин в положении 105 и аланин в позиции 114; GSTP1*B – валин в положении 105 и аланин – в 114, GSTP1*C имеет также валин в положении 105, и, кроме того,

валин в положении 114; для GSTP1*D характерно наличие изолейцина в положении – Ile105/Val114 и валина в 114. Аллель *A считается нормальным. Мутантные *B, *C и *D кодируют функционально менее активные формы фермента (активность снижена в 3 – 4 раза) [6].

Данные по частотам встречаемости аллелей в исследованных группах приведены в таблице 1. Показано, что доля нормального аллеля *A в группе русских женщин несколько выше, чем в группе буряток (75 % и 65 % соответственно; $p = 0,62$). Частота встречаемости аллеля *B, наоборот, выше у женщин бурятской этнической группы по сравнению с русскими (18,33 % и 10,71 % соответственно; $p = 0,32$). Частота аллеля *C в первой группе составила 12,5 %, во второй – 8,33 % ($p = 0,51$).

Таблица 1
Распределение частоты аллелей GSTP1 в исследуемых группах

Аллели GSTP1	Русские, n = 28		Бурятки, n = 30	
	абс.	%	абс.	%
A	42	75	39	65
B	6	10,71	11	18,33
C	7	12,5	5	8,333
D	1	1,786	5	8,333

Исследования как отечественных, так и зарубежных авторов указывают на редкую встречаемость аллеля GSTP1*D [5, 11]. В нашем случае частота данного аллеля составила 1,79 % у русских и 8,33 % у буряток ($p = 0,13$).

Известно также, что GST принимают участие не только в детоксикации ксенобиотиков. Многие исследования показали значительную роль ферментов GSTP1 в реакции на экзо- или эндогенный оксидативный стресс, а также их влияние на контроль клеточного цикла. Некоторые авторы указывают на то, что наличие аллеля GSTP1*A способствует снижению пролиферации и защите клеток от апоптоза [5]. Таким образом, носительство мутантных аллелей может быть ассоциировано с развитием пролиферативных заболеваний эндометрия, а также бронхиальной астмы. Так как обе исследуемые группы включают в себя практически здоровых женщин, то становится очевидна протективная роль аллеля GSTP1*A в отношении развития указанных патологий, т.к. большинство женщин являются носительницами данного аллеля. Причем, практически половина исследуемых женщин несет этот аллель в гомозиготном состоянии – 53,57 % у русских и 46,67 % у буряток ($p = 0,76$). Генотип АВ в два раза чаще обнаруживался во второй группе (30 % и 14,29 % соответственно; $p = 0,25$), а генотип АС, наоборот, достоверно чаще встречался в первой (25 % и 3,33 % соответственно $p = 0,037$). Причем, различия по носительству данного генотипа статистически достоверны. По остальным генотипам достоверных

различий между исследуемыми группами обнаружено не было (табл. 2).

Таблица 2
Распределение генотипов GSTP1 в исследуемых группах

Генотипы GSTP1	Русские, n = 28		Бурятки, n = 30	
	абс.	%	абс.	%
AA	15	53,57	14	46,67
AB	4	14,29	9	30
AC	7*	25	1	3,333
AD	1	3,571	1	3,333
BB	1	3,571	1	3,333
BC	0	0	0	0
BD	0	0	0	0
CC	0	0	1	3,333
CD	0	0	2	6,667
DD	0	0	1	3,333

Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые различия между исследуемыми группами.

Ген глутатион-S-трансферазы T1 (GSTT1) располагается в области 22q11.2, занимает около 8 т.п.н. и состоит из 5 экзонов и 4 интронов. Выявлено, что 15–30 % европеоидов, 22–29 % негроидов и 38–58 % монголоидов являются гомозиготными по делетированному аллелю GSTT1 0. В популяции русского населения европейской части России частота этого генотипа в среднем составляет 18 % [3].

«Нулевой» вариант гена GSTM1 возникает в результате делеции вследствие неравного кроссинговера между гомологичными последовательностями, фланкирующими ген GSTM1. В результате соответствующий белковый продукт не синтезируется. В литературе существуют противоречивые данные о роли «нулевых» генотипов по генам GSTT1 и GSTM1 в развитии различных мультифакториальных заболеваний. Одни авторы указывают на связь наличия таких генотипов с высоким риском развития онкологических заболеваний, заболеваний репродуктивной сферы [2, 6]. Другие же, наоборот, отмечают протективную роль данных генотипов против развития подобных патологий. Так, при исследовании рака мочевого пузыря [8], рака простаты [7] и, такого не связанного с канцерогенезом заболевания, как хронический панкреатит [9], установлена протективная роль именно «нулевых» генотипов GSTT1 и отсутствие эффекта делетированного аллеля GSTM1.

Результаты исследования распределения частот аллелей генов GSTM1 и GSTT1 приведены в таблице 3. Доля «нулевого» гена GSTM1 в первой группе составила 50 %, во второй – 53,33 % ($p = 0,89$). В целом, такая распространенность характерна для европеоидных популяций, где частота такого аллеля в среднем составляет около 50 %

Таблица 3
Распределение частоты аллелей и генотипов генов GSTM1 и GSTT1 в исследуемых группах

Аллели и генотипы GSTT1, GSTM1	Русские, n = 28		Бурятки, n = 30	
	абс.	%	абс.	%
GSTT+	18	64,29	21	70,00
GSTT-	10	35,71	9	30,00
GSTM+	14	50,00	16	53,33
GSTM-	14	50,00	14	46,67
GSTT+/GSTM+	9	32,14	9	30,00
GSTT-/GSTM-	3	10,71	2	6,667

[2]. Распространенность делетированных аллелей гена GSTT1 в нашей выборке также не отличается от значений, характерных для европейцев и составляет 35,71 % и 30 % соответственно ($p = 0,74$). По распределению «нулевых» генотипов внутри исследуемых групп мы получили следующие данные: доля «нулевого» генотипа GSTT1/GSTM1 была несколько выше в группе русских женщин, в отличие женщин бурятской этнической группы (10,71 и 6,67 % соответственно; $p = 0,61$). Доля функционально нормального генотипа GSTT1/GSTM1 в обеих группах отличались незначительно (32,14 и 30 % соответственно; $p = 1$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения полиморфизмов генов GST у женщин русской и бурятской этнических групп выявлено статистически достоверное увеличение доли гетерозиготного генотипа AC гена GSTP1 у русских женщин по сравнению с бурятками. По другим полиморфизмам генов GSTP1, GSTT1, GSTM1 достоверных различий между двумя этническими группами обнаружено не было. Изучение частотных характеристик генов детоксикации ксенобиотиков при различных патологических состояниях у женщин русской и бурятской этнических групп представляет научный интерес и будет продолжено в дальнейшем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамян Л.В., Спицын В.А., Андреева Е.Н. Генетические аспекты гинекологических заболеваний. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 192 с.
2. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В.С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н-Л., 2009. – 528 с.
3. Спицын В.А. Экологическая генетика человека. – М.: Наука, 2008. – 503 с.
4. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Кучер А.Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека. – Томск: Печатная мануфактура, 2007. – 320 с.
5. Ballerini S. et al. Analysis of GSTP1-1 polymorphism using real-time polymerase chain reaction // Clinica Chimica Acta. – 2003. – Vol. 329. – P. 127–132.

6. Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis Carcinogenesis / S.L. Holley [et al.] // Arcinogenesis. — 2007. — Vol. 28, № 11. — P. 2268–2273.

7. Glutathione S-transferase-μ (GSTM1) and -θ (GSTT1) genotypes in the etiology of prostate cancer / T.R. Rebbeck [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. — 1999. — Vol. 8. — P. 283–297.

8. GSTT1-null genotype is a protective factor against bladder cancer / W-J. Kim [et al.] // Urology. — 2002. — Vol. 60. — P. 913–918.

9. Larvin Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, GSTP1, MnSOD, and catalase in nonhe-

reditary chronic pancreatitis: evidence of xenobiotic stress and impaired antioxidant capacity / S.H. Rahman [et al.] // Dig. Dis. Sci. — 2005. — Vol. 50. — P. 1376–1383.

10. Lloyd D.R., Hanawalt P.C. p53-dependent global genomic repair of benzo(a)pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide adducts in human cells // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60. — P. 517–521.

11. Simultaneous identification of GSTP1 Ile105→Val105 and Ala114→Val114 substitution using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma / A. Hemmingsen [et al.] // Respiratory research. — 2001. — Vol. 2, № 4. — P. 255–260.

Сведения об авторах

Ступко Екатерина Евгеньевна – м.н.с. лаборатории клинической генетики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Сибирского отделения РАМН (e-mail: zee14@mail.ru)

Цыренов Тумэн Будажапович – врач акушер-гинеколог Республиканской клинической больницы г. Улан-Удэ (e-mail: cyrenov.tumen.72@mail.ru)

Лабыгина Альбина Владимировна – зав. лабораторией гинекологической эндокринологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Сибирского отделения РАМН, д.м.н. (e-mail: albinalab2212@mail.ru)

Сутурина Лариса Викторовна – руководитель отдела охраны репродуктивного здоровья ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Сибирского отделения РАМН, профессор, д.м.н. (e-mail: lsuturina@yahoo.com)

Колесникова Любовь Ильинична – член-корр. РАМН, профессор, д.м.н., директор ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» Сибирского отделения РАМН