

УДК 575.174.015.3:577.152.2];[616.233-002-036.12+616.12-005.4

Т.В. Тилик¹, В.А. Невзорова¹, С.Е. Вахрушева¹, Е.А. Панченко¹, М.П. Исаева²

¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛЮТАТИОНТРАНСФЕРАЗ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Ключевые слова: *глутатионтрансферазы, генотип, хроническая обструктивная болезнь легких, ишемическая болезнь сердца.*

С помощью полимеразной цепной реакции изучено распределение полиморфных вариантов генов, кодирующих глутатионтрансферазы (GSTM1 и GSTT1), у 60 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, ассоциированной со стабильной стенокардией, и у 30 здоровых лиц. Установлена высокая частота гомозиготной делеции этих генов у больных, причем нулевой генотип GSTT1 был достоверно связан с тяжестью патологии легких. При ассоциированном делеционном генотипе GSTM1 и GSTT1 зарегистрировано повышение относительного риска возникновения сочетанной патологии легких и сердца. Выявление молекулярно-генетических маркеров позволит использовать их для выделения групп риска и проведения адекватной профилактики хронической обструктивной болезни легких и ишемической болезни сердца.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности взрослого населения во всем мире и наносит значительный экономический и социальный ущерб [2]. По данным крупных популяционных исследований риск смерти от сердечно-сосудистой патологии у больных ХОБЛ повышается в 2–3 раза и обуславливает у них примерно 50% смертельных исходов. Учитывая общность факторов риска, наличие коморбидной патологии в виде ХОБЛ и ишемической болезни сердца (ИБС) чаще является правилом, чем исключением [3].

Одним из ведущих модифицируемых факторов риска ХОБЛ и ИБС является курение. Индивидуализация ответной реакции организма на продукты сгорания табака может определяться полиморфизмом генов, кодирующих ферменты, ответственные за их детоксикацию. Глутатионопосредованная детоксикация имеет ключевое значение в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и предотвращении поломок ДНК [4, 7–9]. Гены, кодирующие глутатионтрансферазы (GSTM1, GSTT1), играют важную роль в биотрансформации химических веществ, входящих в состав табачного дыма [8, 9], поэтому исследование взаимоотношений генетического контроля и соединительно-тканного метаболизма при ХОБЛ, ассоциированной с ИБС, представляет несомненный научный интерес.

Материал и методы. Обследовано 60 пациентов европеоидной расы обоего пола в возрасте 43–74

лет с ХОБЛ, ассоциированной со стабильной стенокардией напряжения I–II функционального класса, проживавшие на территории Приморского края более 20 лет. Диагноз ХОБЛ установлен в соответствии с международной классификацией GOLD (2008) [2], диагноз стабильной стенокардии напряжения – в соответствии с национальными рекомендациями (2008). Согласно постбронходилатационным значениям объема форсированного выдоха (ОФВ) пациенты были разделены на две группы: 1-я – 30 человек с ХОБЛ II стадии (ОФВ₁ – 59–69% от должного); 2-я – 30 человек с ХОБЛ III стадии (ОФВ₁ – 30–49% от должного). Критерии исключения: инфаркт миокарда, инсульт и другие тяжелые заболевания, злоупотребление алкоголем и старческий возраст. Контрольная группа была сформирована из 30 условно здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту, полу и этнической принадлежности, не являющихся родственниками пациентов основных групп и не имевших в анамнезе хронических заболеваний бронхолегочной системы, аллергической и другой хронической патологии.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфных локусов генов проводили методом полимеразной цепной реакции. Амплификацию ДНК выполняли на амплификаторе GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов реагентов для детекции полиморфных маркеров I/D гена GSTM1 и I/D гена GSTT1 производства «ГосНИИгенетика» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и методы идентификации полиморфных аллелей уже изученных полиморфизмов приведены ранее S. Pemble et al [8] и J. Seidegard et al. [9]. Продукты амплификации и гидролиза анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле и визуализировали при помощи трансиллюминирующей гельдокументирующей системы Bio-Print 1500/20M Vilber Lourmat (Франция). Достоверность различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов оценивали по тесту χ^2 с помощью программы Biostat. Относительный риск заболевания по конкретному признаку вычисляли как:

$$ОШ = (a \times d) / (b \times c),$$

где *ОШ* – отношение шансов, *a* – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, *b* – частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке, *c* – сумма частот

Тилик Татьяна Валерьевна – аспирант кафедры терапии факультета повышения квалификации ВГМУ; e-mail: yersinia@inbox.ru (победитель конкурса молодых ученых VI Дальневосточного конгресса «Человек и лекарство»).

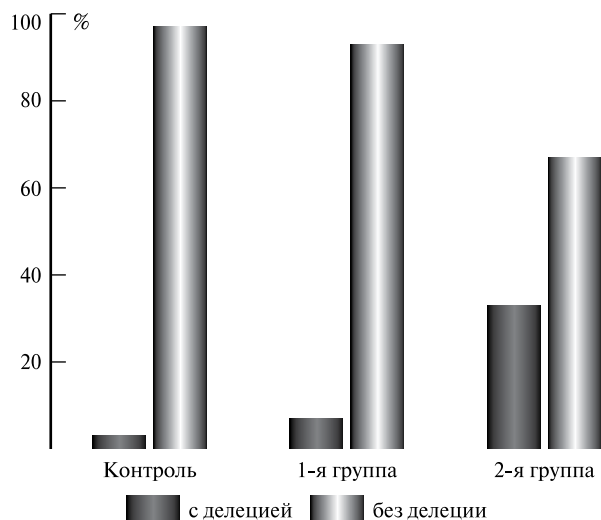


Рис. 1. Распределение генотипа по наличию/отсутствию делеции GSTT1 при ХОБЛ в сочетании с ИБС.

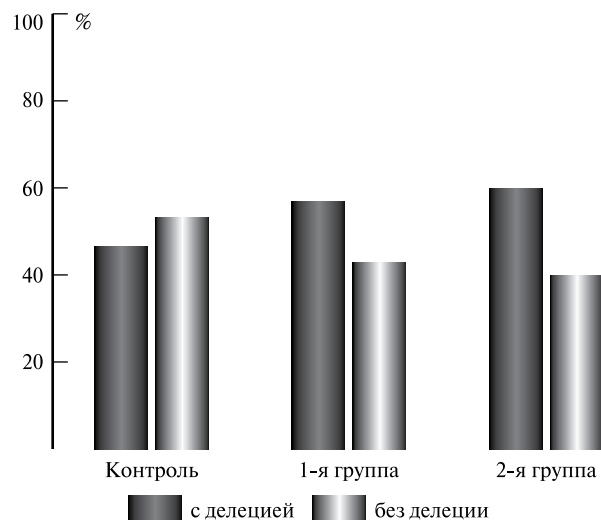


Рис. 2. Распределение генотипа по наличию/отсутствию делеции GSTM1 при ХОБЛ в сочетании с ИБС.

остальных аллелей (генотипов) в выборке больных и d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке.

Результаты исследования. Средний анамнез длительности курения, а также индекс курения и число пачко-лет в 1-й и 2-й группах достоверно прямо коррелировали с тяжестью заболевания и снижением ОФВ₁. Это соответствует данным литературы о прямой зависимости интенсивности курения и ухудшением показателей функции легких у курильщиков [4, 7]. Индекс курящего человека был в среднем 153 (более 140), число пачко-лет – 26,2 (более 20), что говорило в пользу высокой степени никотинассоциированного риска.

Гомозиготная делеция GSTT1 в контрольной группе выявлена у 1 человека. В 1-й группе наличие подобной делеции зарегистрировано в 2 случаях, во 2-й – у каждого третьего (рис. 1). Различие по частоте этого генотипа группами больных было статистически значимо ($\chi^2=10$). Анализ отношения шансов показал, что нулевой генотип GSTT1 существенно увеличивал относительный риск тяжелого течения ХОБЛ: 1,93, 0,90 и 0,55 во 2-й, 1-й группах и в контроле соответственно.

Исследование полиморфизма GSTM1 показало, что гомозиготная делеция наблюдалась почти у половины (46,7%) здоровых лиц. Нулевой генотип GSTM1 выявлялся в достоверно большем числе случаев в 1-й и 2-й группах: 56,7 и 60% соответственно (рис. 2). Максимальное количество гомозиготных делеций GSTM1 установлено во 2-й группе, что достоверно на 13% превышало частоту встречаемости этого генотипа у здоровых и на 3% у пациентов со II стадией ХОБЛ ($\chi^2=6$). Относительный риск заболевания (отношение шансов) у пациентов с ХОБЛ был практически одинаков: 0,99 и 0,96 в 1-й и 2-й группах соответственно. Это указывает на существование равного риска заболеть ХОБЛ и ИБС при наличии гомозиготной делеции GSTM1. При этом наличие нулевого генотипа GSTM1, в отличие от нулевого генотипа GSTT1, не коррелировало с тяжестью ХОБЛ.

Обсуждение полученных данных. Наибольший интерес при изучении механизмов развития ХОБЛ и ИБС представляют гены, кодирующие выработку глутатионтрансфераз (GSTM1, GSTT1), которые играют важную роль в биотрансформации химических веществ, входящих в состав табачного дыма [1, 6, 12]. На нашем материале GSTT1 с гомозиготной делецией достоверно реже встречался у здоровых лиц. Более того, при ХОБЛ в сочетании с ИБС достоверно уменьшалась доля нормального и увеличивалась доля патологического генотипа с делецией GSTT1. Это было особенно заметно во 2-й группе пациентов и могло быть связано с более тяжелым течением ХОБЛ. Ранее было высказано предположение, что нулевой генотип GSTT1 не является специфическим предрасполагающим фактором, но может иметь отношение к неонкологическим легочным заболеваниям [12].

При исследовании полиморфизма GSTM1 гомозиготная делеция также достоверно реже встречалась в группе контроля. Кроме того, при ХОБЛ, ассоциированной с ИБС, наблюдалось достоверное уменьшение частоты регистрации нормального генотипа в обеих группах обследованных ($\chi^2=7$). Частота гомозиготной делеции на собственном материале оказалась незначительно ниже у здоровых лиц, тогда как в работе Jian-Qing He et al. [6] была показана практически одинаковая частота нулевого генотипа GSTM1 у больных ХОБЛ и здоровых. Носительство гомозиготной делеции, обнаруженное в обеих группах больных, достоверно чаще регистрировалось при ХОБЛ тяжелого течения. Это говорит о неполноценности процессов детоксикации продуктов сгорания табака. Частота нулевого генотипа GSTM1 в контроле, установленная в нашем исследовании (46,7%), сопоставима с данными аналогичных исследований в русскоязычных популяциях (42–46%) [10].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу большей подверженности ХОБЛ в сочетании с ИБС лиц-носителей гомозиготной делеции

GSTM1, хотя ранее M. Chan-Yeung et al. [1] не выявили существенной разницы в распределении различных генотипов GSTT1 и GSTM1 между больными ХОБЛ и здоровыми. Носительство гомозиготных делеций наиболее частое при ХБЛ III ст. может объяснить неблагоприятное течение болезни, связанное с нарушением второй стадии обезвреживания ксенобиотиков. Ряд исследователей, изучив взаимодействие GSTM1 с другими генами, заключили, что гомозиготная делеция GSTM1 не всегда имеет самостоятельное значение, но в совокупности с делециями других генов существенно увеличивает риск развития патологического состояния и отягощает его течение [4, 7].

При когортном исследовании SAPALDIA у пациентов с ХОБЛ была выявлена статистически значимая связь между GSTT1 (в комбинации с делецией GSTM1) и снижением ОФВ1 у мужчин, независимо от статуса курения [4]. По результатам российского исследования, делеция GSTM1 ассоциирована с риском развития ХОБЛ и снижением легочной функции, в то время как роль делеции GSTT1 в данных процессах не подтверждена [11]. В другом исследовании связь ассоциации обоих генов, кодирующих глутатионтрансферазы, со снижением легочной функции у курильщиков была опровергнута [6]. Следует отметить, что нулевые генотипы GSTM1 и GSTT1 являются потенциально патологическими: они не кодируют функционально активные ферменты, которые являются важнейшим компонентом фазы детоксикации ксенобиотиков, в т.ч. известных канцерогенов, входящих в состав табачного дыма. Исследование, проведенное ранее, показало связь между полиморфизмами генов, кодирующих глутатионтрансферазы, генотоксичным эффектом и курением табака [7].

Наличие сочетанного нулевого генотипа GSTM1, GSTT1 (гомозиготные делеции по обоим генам) зарегистрировано в 4 случаях, и только во 2-й группе. Это приводит к полному отсутствию активности глутатионтрансфераз и может способствовать неполноценности структур соединительной ткани и накоплению в клетке токсичных промежуточных метаболитов без их дальнейшего обезвреживания [4, 5, 7]. Такое скопление реактивных веществ в клетке может вызвать оксидативный стресс, способствовать развитию апоптоза и привести к выраженным морфологическим изменениям в соединительной ткани.

Выводы:

1. Установлена высокая частота встречаемости гомозиготной делеции генов, кодирующих глутатионтрансферазы, у пациентов с ХОБЛ, ассоциированной с ИБС, причем нулевой генотип GSTT1, в отличие от нулевого генотипа GSTM1, достоверно связан с тяжестью ХОБЛ;

2. При наличии ассоциированного делеционного генотипа GSTM1 и GSTT1 повышен относительный риск возникновения сочетанной патологии — ХОБЛ, ассоциированной с ИБС.

Литература

1. Chan-Yeung M., Lam S., Koener S. Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes and functional activity in smokers with and without COPD // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2007. Vol. 11, No. 5. P. 508–514.
2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease* // NHLBI/WHO workshop report. Last update 2008. URL: www.goldcopd.org.
3. Huiart L., Ernst P., Suissa S. Cardiovascular morbidity and mortality in COPD // *Chest.* 2005. Vol. 128. P. 2640–2646.
4. Imboden M., Downs S.H., Senn O. et al. Glutathione S-transferase genotypes modify lung protection decline in the general population: SAPALDIA cohort study // *Respir. Res.* 2007. Vol. 8, No. 2.
5. Jeffery P.K. Remodelling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Proceeding of the ATS.* 2004. Vol. 1. P. 176–183.
6. Jian-Qing He, Jian Ruan, John E. Conneff et al. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers // *Am. J. of Resp. and Crit. Care Med.* 2002. Vol. 166. P. 323–328.
7. Palma S., Cornetta T., Padua L. et al. Influence of glutathione-S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke // *Mutat. Res.* 2007. Vol. 633, No. 1. P. 1–12.
8. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R. et al. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism // *Biochem. J.* 1994. Vol. 300. P. 271–276.
9. Seidegard J., Worachek W.R., Pero R.W., Pearson W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. Vol. 85. P. 7293–7297.
10. Sram R.C. Effect of glutathione-S-transferase M1 polymorphism on biomarkers of exposure. // *Environ. Hlth. Perspect.* 1998. Vol. 106. P. 231–239.
11. Yanchina E.D., Ivchik T.V. Associations of glutathione-S-transferase M1 0/0 (GSTM1 0/0), GSTT1 0/0 and -1562 C/T matrix metalloproteinase 9 (MMP9 CT) genotypes with a risk and clinical features of COPD // *European Human Genetics Conference: Final Programme and Abstracts.* 2006.
12. Ye Z., Song H., Higgins J.P.T. et al. Five glutathione-S-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies // *PLoS Med.* 2006. Vol. 3, No. 4. P. 0524–0534.

Поступила в редакцию 08.12.2009.

POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE TRANSFERASE GENES IN CASE OF CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE ASSOCIATED WITH ISCHEMIC HEART DISEASE
T.V. Tili¹, V.A. Nevzorova¹, S.E. Vakhrusheva¹, E.A. Panchenko¹, M.P. Isaeva²

¹ Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), ² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of FEB RAS (159 100 Anniversary of Vladivostok Av. 690022 Russia)

Summary — Applying polymerase chain reaction, the authors have studied distribution of polymorphous variants of genes responsible for coding glutathione transferases (GSTM1 и GSTT1) in 60 patients with chronic obstructive lung disease associated with stable angina and 30 healthy men and detected high frequency of homozygous deletions of these genes. The zero genotype GSTT1 is reliably indicative of the severity of lung pathology. The associated deletion genotype GSTM1 and GSTT1 is characterized by increasing relative risk of a combined pathology of heart and lungs. Detection of molecular genetic markers will make it possible to apply them for identifying risk groups and implementing prevention of chronic obstructive lung disease and ischemic heart disease.
Key words: glutathione transferase, genotype, chronic obstructive lung disease, ischemic heart disease.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 1, p. 13–15.