

УДК 575.224.22:616.248

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗ θ_1 И μ_1 (*GSTT1* И *GSTM1*) У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

© 2002 г. М. Б. Фрейдин¹, Е. Ю. Брагина¹, Л. М. Огородова², В. П. Пузырев^{1,2*}

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 634050, Томск

²Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск

Поступила в редакцию 30.10.2001 г.

Представлены результаты изучения полиморфизма по нулевым аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* у 69 больных атопической бронхиальной астмой и 57 здоровых жителей Томска. Показано, что распределения генотипов 0/0 и + каждого гена и двух генов одновременно не имеют значимых различий у больных астмой и здоровых лиц. Не установлено связи изученного полиморфизма со степенью тяжести астмы. Опираясь на полученные данные, следует предположить, что нулевые аллели генов *GSTT1* и *GSTM1* не являются существенным фактором риска развития атопической бронхиальной астмы.

Ключевые слова: атопическая бронхиальная астма, гены глутатионтрансфераз, нулевые аллели, полиморфизм.

Атопическая бронхиальная астма (БА) – одно из наиболее распространенных во всем мире тяжелых мультифакторных заболеваний. Изучение молекулярно-генетических основ этой патологии в течение последних 10–15 лет позволило установить важную роль в детерминации предрасположенности к БА полиморфизма многих генов, в том числе, генов интерлейкинов и их рецепторов (*IL4*, *IL5*, *IL4RA* и др.), генов β -субъединицы высокоаффинного рецептора IgE (*FCER1B*), β_2 -адренергического рецептора (*ADRB2*), 5-липоксигеназы (*ALOX5*) и т.д. [1]. На сегодняшний день с помощью позиционного клонирования устойчиво картированы восемь хромосомных локусов БА: 5q31.1–33, 6p12–21.2, 11q12–13, 12q14–24.1, 13q12–22, 14q11–12, 16p12.1–11.2 и Xq28/Yq12 [2]. Исследования, проведенные на клеточных линиях и модельных животных, убедительно показали функциональный механизм патологического действия некоторых генов предрасположенности к заболеванию [3, 4].

Несмотря на явные успехи, до полного понимания механизмов взаимодействия генетических и средовых факторов в детерминации БА все еще далеко. По мнению одного из ведущих специалистов по генетике БА, все, что сегодня известно о молекулярно-генетических основах заболевания, можно предположить и без проведения генетических исследований [5]. Возможно, поводом для такого пессимизма является недостаток сведений

о связи генетического полиморфизма с заболеванием. Так, по данным некоторых авторов, число генов-кандидатов атопической БА составляет 1900 [6], в то время как изучено, возможно, не более 50 из них. Это обстоятельство определяет актуальность анализа связи с БА полиморфизма еще не проанализированных или слабо изученных генов, среди которых можно выделить гены ферментов биотрансформации – цитохромов печени, глутатионтрансфераз, ацетилгидролаз и т.д.

Ферменты биотрансформации превращают широкий спектр ксенобиотиков и биологически активных эндогенных метаболитов в безопасные для организма вещества. В частности, они осуществляют детоксикацию компонентов табачного дыма и других поллютантов, стимулирующих развитие БА [7], а также принимают активное участие в катаболизме лейкотриенов, простагландинов и прочих медиаторов воспаления, составляющего основу патогенеза заболевания [8].

Гены ферментов биотрансформации высоко полиморфны, причем разные аллели этих генов могут кодировать белки, различающиеся по уровню ферментативной активности [9]. Это обуславливает неодинаковую способность к биотрансформации у разных людей, их метаболическую специфичность, что, в свою очередь, может быть основой индивидуальной предрасположенности к некоторым заболеваниям [10].

Полиморфизм генов биотрансформации активно изучают при онкологической патологии, в

*Эл. почта: valery@img.tsu.ru

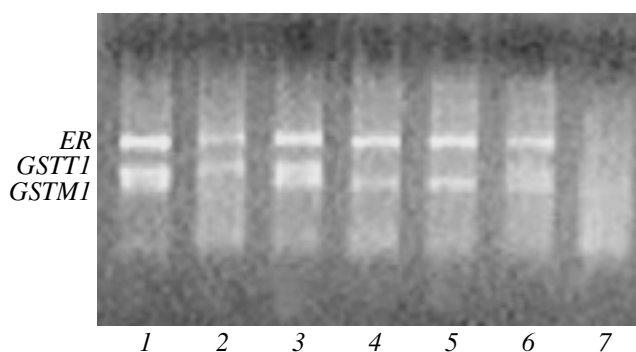


Рис. 1. Пример идентификации 0/0 и + генотипов по генам *GSTT1* и *GSTM1* с помощью мультиплексной ПЦР-амплификации: *ER* – контроль ПЦР (183 п.н.); 1, 3, 6 – генотип *GSTT1* + *GSTM1* + (131 и 114 п.н. соответственно); 2 – *GSTT1* + *GSTM1* 0/0; 4, 5 – *GSTT1* 0/0 *GSTM1* +; 7 – отсутствие ПЦР-продукта.

то время как данные о связи их аллельных вариантов с БА единичны.

В настоящей работе представлены результаты анализа связи атопической БА с полиморфизмом по так называемым нулевым аллелям (протяженные делеции, проявляющиеся на уровне фенотипа отсутствием ферментативной активности белков) генов глутатионтрансфераз θ_1 и μ_1 (*GSTT1* и *GSTM1* соответственно).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Анализировали образцы ДНК 69 неродственных больных атопической БА, русских по национальности, проходивших лечение в клиничко-профилактических учреждениях Томска в 1997–2000 гг., и 57 здоровых неродственных русских жителей Томска.

Типирование образцов по генам *GSTT1* и *GSTM1* проводили путем мультиплексной ПЦР с использованием трех пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участку гена рецептора эстрогенов, *ER*, (F: 5'-caa-gtc-tcc-cct-cac-tcc-cc; R: 5'-gtg-cga-gtg-gct-cag-tgt-gt) и генов *GSTT1* (F: 5'-ggt-cat-tct-gaa-ggc-caa-gg; R: 5'-ttt-gtg-gac-tgc-tga-gga-cg), и *GSTM1* (F: 5'-tgc-ttc-acg-tgt-tat-gga-ggt-tc; R: 5'-gtt-ggg-ctc-aaa-tat-acg-gtg-g) [11]. Смесь для амплификации объемом 12 мкл содержала 100–200 нг ДНК, 2.5 пмоль каждого праймера, 1 мМ смесь четырех dNTP, 1 мМ MgCl₂, 0.5 ед./акт. *Taq*-ДНК-полимеразы (“Сибэнзим”, Новосибирск) и 10 × буфер, поставляемый производителем вместе с ферментом. Программа амплификации включала 5 мин предварительной денатурации при 94°C, четыре цикла: 94°C – 20 с, 65°C – 25 с, 72°C – 20 с; четыре цикла: 94°C – 20 с, 63°C – 25 с, 72°C – 20 с; 25 циклов: 94°C – 20 с, 61°C – 25 с, 72°C – 20 с. Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин.

Продукты амплификации фракционировали в 3%-ном агарозном геле с бромистым этидием в течение 30 мин при напряжении 130 В и визуализировали в УФ-свете.

Гомозиготность по нулевым аллелям (0/0) генов *GSTT1* и *GSTM1* определяли по отсутствию на электрофореграммах фрагментов размером 131 и 114 п.н. соответственно (рис. 1). Наличие этих фрагментов свидетельствовало о присутствии по крайней мере одной нормальной (без делеции) копии генов (гомо- и гетерозиготы, +/+ и +/0). Участок гена *ER* размером 181 п.н. использовали в качестве внутреннего контроля амплификации.

Статистическая обработка данных включала анализ таблиц сопряженности с помощью точного теста Фишера–Ирвина [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У генов *GSTT1* и *GSTM1*, кодирующих соответственно глутатионтрансферазы θ_1 и μ_1 , выявлен полиморфизм по так называемым нулевым аллелям, представляющим собой протяженные делеции, вследствие которых образуются укороченные белковые продукты без выраженной ферментативной активности [9, 13]. Эти варианты генов достаточно широко распространены в популяциях. Так, у европеоидов частота гомозигот по нуль-аллелям *GSTT1* составляет 10–20%, а *GSTM1* – 40–60% [14]. По-видимому, функциональное значение для организма может иметь только гомозиготность по нулевым вариантам генов, так как лишь в этом случае все синтезируемые глутатионтрансферазы будут практически неактивны; у гетерозигот следует ожидать компенсацию отсутствия одной активной копии гена за счет второго нормального аллеля. Таким образом, для выяснения патогенетического значения полиморфизма по нуль-аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* правомерно будет объединить гомозигот по нормальным аллелям, +/+, с гетерозиготами, +/0, в одну группу, +. Вероятно, предрасполагающее к БА значение имеют нулевые генотипы, так как глутатионтрансферазы являются важным компонентом системы биотрансформации, и их дефицит может привести к накоплению веществ, стимулирующих развитие заболевания (внешнесредовые поллютанты и т.п.), нарушению метаболизма стероидов, простагландинов, лейкотриенов и других биологически активных веществ, участвующих в реализации патогенеза БА.

Анализ полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1* у жителей Томска выявил незначительную гетерогенность по частотам нулевых и ненулевых генотипов у больных атопической БА и здоровых лиц (рис. 2). Так, у больных доля нуль-генотипов гена *GSTT1* на 8.5%, а *GSTM1* на 1.4% выше, чем у здоровых лиц. Эти различия статистически незначи-

мы ($p = 0.338$, $p = 0.840$ соответственно) и носят, таким образом, случайный характер.

Аналогичные данные получены при сравнении частот сочетаний генотипов по генам глутатионтрансфераз в группах с различным состоянием здоровья (рис. 3) – больные БА несколько чаще имеют генотипы *GSTT1* 0/0 *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 *GSTM1* +, реже *GSTT1* + *GSTM1* + и *GSTT1* + *GSTM1* 0/0, хотя отличия статистически незначимы ($p = 0.416–0.728$).

Кроме поиска связи изученного полиморфизма с интегральным клиническим фенотипом атопической БА, нами проведен анализ взаимосвязи генотипов по генам *GST* со степенью тяжести заболевания. Согласно данным клинического обследования, 24 больных имели легкое течение БА, 33 – среднетяжелое и 12 – тяжелое. Анализ частот генотипов *GST* у больных БА не выявил существенной связи полиморфизма по нуль-аллелям с тяжестью течения болезни (табл. 1). Несмотря на явную тенденцию к изменению частот генотипов 0/0 у больных с разной степенью тяжести БА, эти отличия статистически незначимы как при совместном анализе (таблица сопряженности 3×2), так и при попарных сравнениях выборок больных ($p = 0.274–0.999$ для разных пар сравнений). Связи со степенью тяжести БА сочетаний генотипов по генам *GSTT1* и *GSTM1* также не установлено (табл. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии существенной связи полиморфизма по нуль-аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* с атопической БА и со степенью тяжести заболевания у жителей Западно-Сибирского региона.

Недавно статистически значимое повышение частоты гомозигот по нулевым аллелям генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных БА по сравнению со здоровыми лицами выявлено у жителей Ст.-Петербурга [15], что противоречит данным нашей работы. Причин такой несогласованности может быть несколько.

Во-первых, связь нулевых аллелей генов *GST* с БА могла быть следствием подразделенности популяции или других эффектов популяционной структуры (метисация, инбридинг), из которой получены выборки больных и здоровых лиц. Эффекты популяционной структуры являются основной проблемой при проводимом по алгоритму “случай–контроль” анализе связи генетических маркеров с заболеваниями [16]. Выходом в этом случае мог бы стать анализ ассоциаций на семейном материале, например, с помощью тестов Transmission/Disequilibrium Test или Affected Family-Based Control. В случае полиморфизма по нулевым аллелям генов *GST* это затруднено невозможностью отделить гетерозигот +/0 от гомозигот по нормальному аллелю +/+.

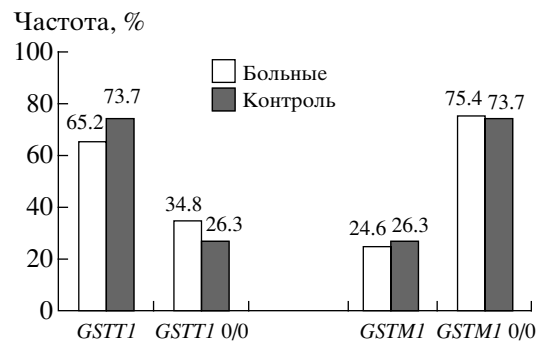


Рис. 2. Частоты генотипов по нулевым (0/0) и ненулевым (+) аллелям генов *GST* у больных БА и здоровых лиц.

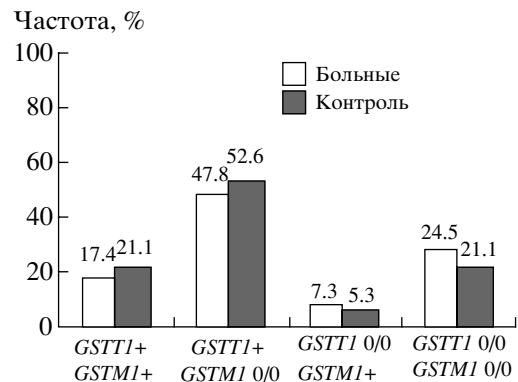


Рис. 3. Частоты сочетаний генотипов по нулевым (0/0) и ненулевым (+) аллелям генов *GST* у больных БА и здоровых лиц.

Во-вторых, вполне вероятно, что в выборке из Ст.-Петербурга нулевые аллели генов *GST* находятся в неравновесии по сцеплению с действительно патогенетически значимыми вариантами этих же или других генов. Можно представить и противоположную ситуацию – нулевые аллели генов *GST* в Томской популяции находятся в не-

Таблица 1. Частоты гомозигот по нулевым аллелям (0/0) генов *GST* у больных с разной степенью тяжести атопической бронхиальной астмы (БА)*

Степень тяжести БА	Число больных в группе	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>
Легкая	24	11 (45.83)	17 (70.83)
Средняя	33	10 (30.30)	25 (75.76)
Тяжелая	12	3 (25.0)	10 (83.33)
p^{**}		0.379	0.759

* Указано число индивидов с генотипом 0/0 и их доля (%) от общего числа больных в группе (в скобках).

** Достигнутый уровень значимости для таблицы сопряженности 3×2 (точный тест Фишера–Ирвина).

Таблица 2. Частоты сочетаний генотипов по генам *GST* у больных атопической бронхиальной астмой (БА) с разной степенью тяжести заболевания*

Степень тяжести БА	Число больных в группе	<i>GSTT1+</i> <i>GSTM1+</i>	<i>GSTT1+</i> <i>GSTM1 0/0</i>	<i>GSTT1 0/0</i> <i>GSTM1+</i>	<i>GSTT1 0/0</i> <i>GSTM1 0/0</i>
Легкая	24	3 (12.50)	10 (41.67)	4 (16.67)	7 (29.17)
Средняя	33	7 (21.21)	16 (48.48)	1 (3.03)	9 (27.27)
Тяжелая	12	2 (16.67)	7 (58.33)	0 (0.00)	3 (25.00)
	<i>p**</i>	0.836	0.657	0.113	0.999

* Указано число индивидов с соответствующим генотипом и их доля (%) от общего числа больных в группе (в скобках).

** Достигнутый уровень значимости для таблицы сопряженности 3 × 2 (точный тест Фишера–Ирвина).

равновесии по сцеплению с полиморфизмами, которые компенсируют недостаточность ферментативной активности глутатионтрансфераз θ_1 и μ_1 . Важность этнической и популяционной специфики в детерминации предрасположенности к распространенным заболеваниям хорошо известна. Так, в популяциях разных рас и народов зачастую регистрируется сцепление с патологическим фенотипом разных локусов [16, 17]. Это говорит о том, что проявление “негативных” сочетаний аллелей генов предрасположенности может существенно модифицироваться действием других генов. Таким образом, для понимания наследственных основ патогенеза БА необходим одновременный анализ генотипов по большому спектру генов-кандидатов заболевания.

В целом, опираясь на полученные данные, следует предположить, что нулевые аллели генов *GSTT1* и *GSTM1* не являются важным фактором риска развития атопической БА.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федеральной целевой научно-технической программы “Приоритетные направления генетики” и Российского фонда фундаментальных исследований (01-04-48213 и 00-15-97876).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nanavaty U., Goldstein A.D., Levine S.J. Polymorphisms in candidate asthma genes. // *Am. J. Med. Sci.* 2001. V. 321. P. 11–16.
2. Anderson G.G., Cookson W.O.C.M. Recent advances in the genetics of allergy and asthma. // *Mol. Med. Today.* 1999. V. 5. P. 264–273.
3. Izuhara K., Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. // *Int. J. Molec. Med.* 1999. V. 3. P. 3–10.
4. Symula D.J., Frazer K.A., Ueda Y. et al. Functional screening of an asthma QTL in YAK transgenic mice. // *Nature Genet.* 1999. V. 23. P. 241–244.
5. Hall I.P. Genetics and pulmonary medicine: asthma. // *Thorax.* 1999. V. 54. P. 65–69.
6. Polvi A., West A., Kinoshita R. et al. Development of Asthma-Immuno Chip for gene expression studies of asthma and other immune mediated diseases. // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. Suppl. 1. P. 382.
7. Ketterer B. Protective role of the glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. // *Mutat. Res.* 1988. V. 202. P. 343–361.
8. Chung K.F., Barnes P.J. Cytokines in asthma. // *Thorax.* 1999. V. 54. P. 825–857.
9. Seidegard J., Vorachek 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. USA.* 1988. V. 85. P. 7293–7297.
10. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены “предрасположенности” (Введение в предиктивную медицину). СПб.: Интермедика, 2000. 272 с.
11. Spurdle A.B., Webb P.M., Purdie D.M. et al. Polymorphisms at the glutathione S-transferase *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. // *Carcinogenesis.* 2001. V. 22. P. 67–72.
12. Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций. М.: Финансы и статистика, 1989. 319 с.
13. Pemble S., Schroeder K., Spencer S. et al. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*) cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. // *Biochem. J.* 1994. V. 300. P. 271–276.
14. Rebbeck T.R. Molecular epidemiology of glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1997. V. 6. P. 733–743.
15. Иващенко Т.Э., Сиделева О.Г., Петрова М.А. и др. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме. // *Генетика.* 2001. Т. 37. С. 107–111.
16. Lander E.S., Schork N.J. Genetic dissection of complex traits. // *Science.* 1994. V. 265. P. 2037–2047.
17. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. // *Nature Genet.* 1997. V. 15. P. 389–392.

ABSTRACT