

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ
БИОТРАНСФОРМАЦИИ И ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ С РИСКОМ
РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ
ГИПОКСИЧЕСКИЕ ПОРАЖЕНИЯ ЦНС**

Ю.Н. ДЕРКАЧ, Е.Г. КАЛАУР, Н.Ю. ДЕРКАЧ

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Реферат

Статья посвящена изучению особенностей распределения аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты фазы 1 (CYP1A1, CYP1A2) и фазы 2 (NAT2, GSTM1, GSTT1) детоксикации ксенобиотиков у детей, перенесших в периоде новорожденности перинатальную гипоксию, болеющих острыми респираторными заболеваниями более 4-6 раз в год и не склонных к частым острым респираторным заболеваниям.

Ключевые слова: аллельные гены, ксенобиотики, перинатальная гипоксия, биотрансформация, цитохромы, детоксикация.

В последнее время широко проводятся исследования связи полиморфизма ферментов клеточной биотрансформации и детоксикации с риском развития некоторых патологических состояний [1,3]. Благодаря работе ферментов биотрансформации и детоксикации происходит превращение токсичных для клетки продуктов в водорастворимые нетоксичные производные в две фазы. Ферменты первой фазы связывают ксенобиотики с образованием мутагенных промежуточных метаболитов (таких, как супероксид-анион-радикал и ароматические углеводороды), которые под действием ферментов второй фазы превращаются в нетоксичные продукты и выводятся из организма [2].

К ферментам биотрансформации относят цитохромы P450. Они являются ключевыми компонентами монооксигеназ и катализируют окисление множества ксенобиотиков, включая полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), полихлорированные бифенилы и другие, которые чрезвычайно стабильны и широко распространены в окружающей среде. У человека наиболее важными в метаболизме чужеродных веществ является семейство цитохромов P450-CYP1. CYP1 семейство цитохромов P450 состоит из 2 членов - CYP 1A1 и CYP 1A2. Цитохром P450 CYP 1A2 конститутивно экспрессируется в печени человека, катализирует активацию обнаруженных в сигаретном дыме канцерогенных ариламинов, активирует гетероциклические амины-промотагены, образующиеся при пиролизе пищевых белков. Для данной группы ферментов показано существование генетического полиморфизма, что фенотипически проявляется в различном уровне их активности [4,8]. С помощью секвенирования геномной ДНК были обнаружены предполагаемые полиморфизмы гена CYP1A2 во 2 и

7 экзонах, а также в 1 интроне. Причем только полиморфизм в 1 интроне оказывает действие на индуцибельность CYP1A2 [2, 9]. На основании активности в метаболизме ряда ПАУ популяция может быть разделена на два фенотипа: интенсивные метаболитеросители мутантного аллеля А гена CYP1A2 и слабые метаболитеросители дикого варианта С гена CYP1A2 [4].

В настоящее время также установлено, что ключевую роль во второй фазе детоксикации ксенобиотиков играют глутатион-S-трансферазы (GSTs). Эти ферменты катализируют присоединение глутатиона к электрофильному центру разнообразных химических соединений, что приводит к потере токсичности и образованию гидрофильных продуктов, которые в дальнейшем могут быть метаболитированы и выведены из клетки. GSTs обладают также некоторой пероксидазной активностью, благодаря чему играют важную роль во внутриклеточном связывании и транспорте большого числа как эндогенных, так и экзогенных соединений. У человека выделяют четыре основных класса GSTs: α (GSTA), μ (GSTM), δ (GSTT) и π (GSTP).

Наиболее интересными для исследования являются белки GSTM и GSTT, так как их гены характеризуются значительным популяционным полиморфизмом. У человека встречается 3 аллельных варианта гена GSTM1: GSTM1A и GSTM1B, кодирующие белки со сходной ферментативной активностью, и GSTM10, который содержит протяженную делецию и кодирует неактивный вариант фермента (так называемый нулевой аллель). Ген GSTT1, как и ген GSTM1, может содержать обширную делецию в структурной части, и у него также существует функциональ-

но неактивный нулевой аллель. В ряде исследований была показана связь между полиморфными вариантами данных ферментов и процессами канцерогенеза, риском развития бронхиальной астмы, частых острых респираторных заболеваний - особенно в том случае, когда пациенты являются гомозиготными носителями по нулевому аллелю (генотип O/O) [1, 6]. Эти ферменты также участвуют в метаболизме различных лекарственных средств, что может иметь значение для терапии при различных заболеваниях. Комплексное воздействие при конъюгации ксенобиотиков оказывает также ариламин-М-ацетилтрансфераза (NAT). Путем переноса ацетоацила с ацетилкоэнзима А на субстраты она нейтрализует более 100 лекарственных средств, определяя их токсичность и переносимость, а также осуществляет полиморфное ацетилирование ариламинов, аминоксодержащих эндо- и экзогенных субстратов (гистамин, серотонин, лейкотриены, канцерогены) [12]. Физиологические концентрации серотонина имеют особое значение в периоде интенсивно текущих процессов онтогенеза системы новорожденного ребенка, особенно, перенесшего перинатальную гипоксию. Ариламин-М-ацетилтрансфераза имеет две формы - NAT1 и NAT2. Ген NAT2 локализован в локусе 8p21.3-23.1 [12], его бимодальный полиморфизм определяется комбинацией 8 точечных мутаций, причем 5 мутаций ведут к замене аминокислот в ферменте и уменьшению ацетиляторной способности (медленный ацетиляторный генотип) при гомозиготном расположении аллелей. Для медленных фенотипов характерны аллели *5A, *5B, *5C, *6A, *6B, *7B и * 14, при этом предполагается, что аллели группы *5 снижают синтез протеина в печени, *6A - продуцируют нестойкий фермент [1, 11]. Медленный генотип NAT2 (NAT2*5/*5 и NAT2*4/*4) отвечает за предрасположенность к атопии и раннюю манифестацию заболевания [1], снижает интранатальную гиббернацию плода, замедляет запуск дендритного ветвления, формирование новых сетей межнейронных связей, на базе которых формируются постнатальные функциональные системы, опосредуя риск дезадаптации в периоде новорожденности и развития функциональных отклонений в деятельности нервной системы в последующие возрастные периоды [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состоит в изучении особенностей распределения аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты фазы 1 (CYP1A1, CYP1A2) и фазы 2 (NAT2, GSTM1, GSTT1) детоксикации ксенобиотиков у детей, перенесших в периоде новорожденности перинатальную гипоксию, болеющих острыми респираторными заболеваниями более 4-6 раз в год и не склонных к частым острым респираторным заболеваниям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 102 ребенка (средний возраст 3.17 ± 1.78 лет), которым в периоде новорожденности был установлен диагноз гипоксически-ишемического поражения ЦНС на основании данных акушерско-гинекологического анамнеза, клинического обследования детей при рождении, оценки неврологического статуса, лабораторных и инструментальных методов обследования. Сформированы две группы детей: первая – 52 ребенка (30 девочек и 22 мальчика), болеющих более 4-6 раз в год респираторными инфекциями и вторая группа 50 детей, соответствующих по возрасту и полу первой группе, не склонных к частым заболеваниям респираторного тракта. У детей 51% матерей имел соматические заболевания, 64% - гинекологические заболевания, у 83% случаев отмечалось неблагоприятное течение беременности (угроза прерывания, токсикоз, анемия, хроническая фетоплацентарная недостаточность и др.). Оценку по шкале Апгар при рождении 7 баллов и менее имели 94,2% детей. У всех детей имели место нарушения неврологического статуса. Синдром угнетения ЦНС в виде снижения двигательной активности, коммуникабельности, мышечной гипотонии, гипорефлексии отмечался у 49 (48%) детей. Повышенная нервно-рефлекторная возбудимость (беспокойство, тремор, спонтанный рефлекс Моро, повышенный мышечный тонус) выявлена у 24 (23,5%) новорожденных. У 29 (28,5%) детей имело место сочетание синдрома угнетения с элементами возбуждения.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследованы частоты полиморфных аллелей генов CYP1A1, CYP1A2, NAT2, GSTM1, GSTT1 у всех детей.

Для проведения молекулярно-генетического анализа отбирались образцы венозной крови в количестве 5 мл. Выделение ДНК проводилось стандартным методом из лимфоцитов с использованием гуанидина. Частоты различных генотипов генов были исследованы методом ПЦР. ДНК из крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [11] и растворяли в 10 мМ Трис/1 мМ ЭДТА, рН 8,0 хранили при 4°С. Для обнаружения генетического полиморфизма в 1 интроне гена [7] использовали метод исследования полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в комбинации с ПЦР. Смесь для амплификации объемом 15 мкл включала 0,2 мМ каждого праймера, ЮмМ трис-НС1, рН 8.3, 1,25 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 200 мМ каждого дезоксирибонуклеотида и 0,5 ед. Taq-полимеразы и 1,5 мкл геномной ДНК. Реактивы для постановки ПЦР были синтезированы в «Силекс», Москва. ПЦР проводилась при следующих температурных условиях: 3 мин - денатурации при 95°С, за которой следовали 35 циклов амплификации в режиме 95° в течение 30 сек, 62°С - 30 сек, 72°С - 1 мин. ПЦР была терминирована при 72°С в течение 10 мин, последующим охлаждением до 4°С. Ампли-

Таблица 1. Распределение генотипов генов GSTM1 и GSTT1 у детей 1 и 2 групп

Генотипы	1 группа		2 группа		Критерий	
	N=52	Частота, %	N=50	Частота, %	X ²	P
GSTT1 (+)	41	78,8	44	88,0	1,558	<0.25
GSTT1 0/0	11	21,2	6	12,0	1,558	<0.25
GSTM1 (+)	32	61,5	38	76,0	2,488	<0.2
GSTM1 0/0	20	38,5	12	24,0	2,488	<0.2
GSTT10/0/GSTM10/0	5	9,6	1	2	2,652	<0.2
GSTT1(+)/ GSTM10/0	15	28,9	11	22	0,634	<0.5
GSTM1(+)/GSTT10/0	6	11,5	5	10	0,060	<0.9
GSTM1(+)/ GSTT1(+)	26	50	33	66	2,675	<0.2

фицированные фрагменты смешивали с 2 ед. рестриктазы AраI. Продукты рестрикции анализировали в 6% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете. Для статистической обработки результатов использовали стандартный метод с поправкой на непрерывность и двусторонний критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты генотипирования генов GSTM1 И GSTT1 представлены в таблице 1. Присутствие нормального аллеля (+) определялось наличием на электрофореграмме продукта амплификации размером 271 пн для гена GSTM1 и 315 пн для GSTT1. Отсутствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивидуума по делеционному аллелю одного из генов (генотип O/O). Таким образом, гомозиготные по нормальному аллелю и гетерозиготные по делеции в генах GSTM1 и GSTT1 лица оказывались в одной группе (генотип «+»).

Из приведенных данных видно, что в первой и второй группах были обнаружены генотипы «+» и O/O для обоих анализируемых генов. При сравнении частоты гомозигот по делеции гена GSTT1 (O/O генотип) было установлено, что в обеих исследуемых выборках она практически не отличается. В то же время при анализе

гена GSTM1 наблюдалось отличие в частоте встречаемости генотипа O/O у детей первой и второй группы – в первой группе его частота оказалась выше (38.5%) по сравнению со второй (24%). Однако данные различия не являются статистически достоверными ($X^2 = 2.488$, $p < 0.2$). Далее был проведен анализ частоты комбинаций различных генотипов генов GSTT1 и GSTM1 в двух выборках. В результате были обнаружены все возможные сочетания генотипов:

GSFTV(+)/GSTM1(+);
 GSTT1 (+)/GSTM1(0/0);
 GSTT1(0/0)/GSTM1(+)
 GSTT1(0/0)/GSTM1 (0/0) (таблица 1).

При сравнении частот комбинаций различных генотипов в группах были выявлены две тенденции: частота комбинаций генотипов GSTT1 (0/0)/GSTM1 (0/0) была значительно выше в первой группе (9.6% против 2% во второй), а комбинация генотипов GSTT1 (+)/GSTM1 (+) встречалась чаще во второй группе (66%) по сравнению с первой группой (50%). В то же время статистический анализ не выявил каких-либо достоверных различий для наблюдаемых тенденций ($X^2 = 2.652$, $p < 0.2$ - в первом случае и $X^2 = 2.675$, $p < 0.2$ - во втором случае).

Результаты анализа частот полиморфных аллелей, копирующих ферменты 1 фазы детоксикации ксенобиотиков, представлены в табл. 2. Как следует из полученных данных, частоты аллелей и генотипов для генов CYP1A1, CYP1A2 достоверно не отличаются у детей 1 и 2 групп. Частоты мутантных аллелей для цитохромов CYP1A1, CYP1A2 не превысили 10%.

Результаты анализа аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты 2 фазы детоксикации, у детей 1 и 2 групп представлены в табл. 3. Частота гомозигот по нулевому аллелю гена GSTM1 во второй группе составила 43.2%. У детей первой группы частота гомозигот гена GSTM1 O/O (56.8%) несколько превысила популяционный уровень, однако при сравнении со второй группой достоверных различий выявлено не было.

Частота гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1 во второй группе оказалась несколько ниже популяционной (23.3%) и составила 15%. У детей первой группы было выявлено достоверное повышение частоты гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1 (табл. 3). Так, частота GSTT1 O/O у детей первой группы составила 36% и достоверно отличалась от таковой во вто-

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей генов CYP1A1, CYP1A2 у детей 1 и 2 групп

Генотипы	Частота, %	
	1 группа	2 группа
CYP1A1		
N/N	93.1	89.2
N/F	6.9	10.8
N	96.5	95
F	3.5	5
CYP1A2		
N/N	82.8	94.5
N/M	14.9	5.5
MM	2.4	0
N	90.2	95.2
M	9.8	4.8

N/N, N/F, N/M, M/M, N, M- «быстрые» и «медленные» аллели гена цитохромов CYP1A1, CYP1A2 в гомо- и гетерозиготном состоянии

Таблица 3. Распределение генотипов и аллелей генов GSTM1, GSTT1, NAT2 у детей 1 и 2 групп

Генотипы	Частота, %	
	1 группа	2 группа
<i>GSTM1</i>		
+	43.2	56.4
O/O	56.8	43.6
<i>GSTT1</i>		
+	64	85
O/O	36	15
$f = 5.82. p < 0.05$ OR = 3.26 (1.25 - 8.49)		
<i>NAT2</i>		
N/N	14.9	15.4
N/S	32.4	38.5
S/S	52.7	46.2
N	34.5	32.1
S	65.5	67.9

N/N, N/S, S/S, N, S («быстрые» и «медленные» аллели гена N-ацеттирования в гомо- и гетерозиготном состоянии)

рой группе ($X^2 = 5.82; p < 0.05$). Риск частых острых респираторных заболеваний у детей, имеющих генотип GSTT1 O/O, увеличивается в 3.26 раза ($C1_{5\%} = 1.25-8.49$).

При сравнении распределения полиморфных аллелей гена NAT2 достоверных различий между исследованными группами выявлено не было (табл. 3). При этом «медленный» аллель S доминировал как у детей первой, так и второй групп (65.5% и 67.9% соответственно).

Наиболее интересные результаты получены при суммарном анализе сочетаний генотипов по генам GSTM1, GSTT1, NAT2 (табл. 3).

Среди детей первой группы индивидуумы с генотипом GSTM1 O/O, NAT2 S/S встречались почти в 3 раза чаще, чем во второй группе (33.8% и 12.8% соответственно, $x^2 = 5.34, p < 0.05$). Риск частых острых респираторных заболеваний у детей с таким генотипом возрастает в 3.5 раза ($C1_{5\%} = 1.26-9.59$).

Сходная ассоциация выявлена и в отношении комплекса нулевых аллелей генов GSTM1 и GSTT1 (табл. 4). Доля гомозигот по нулевым аллелям этих генов среди детей первой группы оказалась в 4 раза больше в сравнении с детьми второй группы (21.6% и 5% соответственно, $x^2 = 5.93, p < 0.05$). Риск частых респираторных заболеваний при таком сочетании

генотипов увеличивается в 5.6 раза ($C1_{5\%} = 1.4-22.62$).

Анализ сочетания генов GSTT1, NAT2 выявил возрастание доли функционально неполноценных генотипов почти в 20 раз у детей первой группы по сравнению с детьми второй группы (20.3 и 2.5% соответственно, $x^2 = 6.59, p < 0.05$). Риск частых острых респираторных заболеваний у детей с генотипом GSTT1 O/O, NAT2 S/S повышен в 9.7 раза ($C1_{5\%} = 1.71-54.60$) (табл. 4).

ВЫВОДЫ

1. Выявлено равновесное наследование гена CYP1A2, GSTM1, GSTT1 в исследуемой группе детей. По частоте встречаемости аллелей и генотипов CYP1A2, GSTM1, GSTT1 дети первой группы не отличались от детей второй группы.
2. У детей первой группы было выявлено достоверное повышение частоты гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1.
3. Среди детей первой группы индивидуумы с генотипом GSTM1 O/O, NAT2 S/S встречались почти в 3 раза чаще, чем во второй группе контроля (33.8 и 12.8% соответственно, $x^2 = 5.34, p < 0.05$). Риск частых острых респираторных заболеваний у детей с таким генотипом возрастает в 3.5 раза.
4. Сходная ассоциация выявлена и в отношении комплекса нулевых аллелей генов GSTM1 и GSTT1. Доля гомозигот по нулевым аллелям этих генов среди детей первой группы оказалась в 4 раза больше в сравнении с детьми второй группы (21.6% и 5% соответственно, $x^2 = 5.93, p < 0.05$). Риск частых респираторных заболеваний при таком сочетании генотипов увеличивается в 5.6 раза ($C1_{5\%} = 1.4-22.62$).
5. Риск частых острых респираторных заболеваний у детей с генотипом GSTT1 O/O, NAT2 S/S повышен в 9.7 раза ($C1_{5\%} = 1.71-54.60$).
6. В результатах проведенного исследования не установлено влияние гипоксически-ишемических повреждений центральной нервной системы в периоде новорожденности на формирование предрасположенности к частым острым респираторным заболеваниям у детей раннего возраста.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях по молекулярной эпидемиологии заболеваний.

Таблица 4. Частоты функционально неполноценных генотипов (фазы 2 детоксикации) у детей 1 и 2 групп

Функционально неполноценный генотип	Частота генотипа, %		X^2	Относительный риск
	1 группа	2 группа		
GSTM1 O/O, NAT2 S/S	33.8	12.8	5.34, $p < 0.05$	3.47 ($C1 < 1.26-9.59$)
GSTM1 O/O, GSTT1 O/O	21.6	5	5.93, $p < 0.05$	5.63 ($C1 < 1.4-22.62$)
GSTTW/O, NAT2 S/S	20.3	2,5	6,59, $p < 0.05$	9.77 ($C1 < 1.71-54.60$)

ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилин, В. А. Ассоциация полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме /Вавилин В.А., Макарова СИ., Ляхович В.В. //Генетика. - 2002. -Т. 38., № 4.- С. 539-545.
2. Гуляева, Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом карценогенезе: Аналитический обзор/ Гуляева Л.Ф, Вавилин В.А., Ляхович В.В. //ГПНТБ СО РАН, Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН-Новосибирск, 2000.-85с.
3. Попова, С.Н. Полиморфизм глутатион-8-трансфераз М1 и М2 в ряде популяций России /Попова С.Н, Сломинский П.А., Галушкин С.Н. //Генетика.-2002.-Т.38, № 2.- С. 281-284.
4. Салимова, А.З. Изучение этнотерриториальных групп по данным полиморфизма ядерного генома /Салимова А.З., Кутуев И.А., Хусаинова Р.И. ДНК//Генетика.-2005-Т.41, № 7. С.973-980.
5. Скворцов И.А., Ермоленко Н.А. Развитие нервной системы у детей в норме и патологии. М.:МЕДпресс-информ, 2003.
6. Christiansen, L. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda /Christiansen L., Vugum A, Jensen A. //Hum Genet. - 2000.-Vol. 107.- P. 612-614.
7. Cristoph, S. Functional significance of a C->A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 gene tested with caffeine/ Cristoph S., Jurgen Brockmoller, Steffen Bauer.Br//J.Clin. Pharmacol.-1999.-Vol. 47.- P.445-449.
8. MacLeod, S.L. The role of recently discovered genetic polymorphism in the regulation of the human CYP1A2 gene/ MacLeod S.L., Tang Y-M, Yokoi, et al.//Proceedings of the American Association for Cancer Research. - 1998. - Vol. 39.-P.396.
9. Michiro, Ch. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-Flanking Region and intron 1 in human CYP1A2 in the Japanese population /Michiro Ch., Tsuyoshi Yokoi, Takafumi Fukui, //J. Cancer res. - 1999. - Vol. 90. - P. 899-902.
10. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed./ Sambrook J, Fritsch E., Maniatis T. //Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
11. Ревазова Ю.А., Аксенова М.Г., Сидорова И.Е., Григорьева С.А. «Изучение индивидуальной чувствительности человека к действию факторов окружающей среды молекулярно-генетическими методами». Коллективная монография ГУ НИИ ЭЧиГОС им. А.Н. Сысина к 75-летию создания института «Неинвазивные методы в оценке здоровья населения» 2006 г., с.274-282.
12. Григорьева С.А., Никитина В.А., Косякова Н.В., Кириллов А.В., Аксенова М.Г., Сидорова И.Е., Ревазова Ю.А., Чеботарев А.Н., Бочков Н.П. «Частота полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков CYP1 A1, GSTM1 и GSTT1 у жителей города Москвы». Журнал «Медицинская генетика», 2007, № 3., с.38-43.

ASSOCIATION OF POLYMORPHISM OF GENES OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES AND XENOBIOTICS DETOXICATION WITH THE RISK OF DEVELOPMENT OF DISEASES AMONG CHILDREN WHO HAD PERINATAL HYPOXIA DAMAGE TO CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Y.N. DERKACH, E.G. KALAU, N.Y. DERKACH

Educational institution "Vitebsk State Order of People's Friendship Medical University"

Abstract

The article is dedicated to the study of peculiarities of allocation of allelic variants of genes which code the enzymes of phase 1 (CYP1A1, CYP1A2) and phase 2 (NAT2, GSTM1, GSTT1) xenobiotics detoxication among children who under went perinatal hypoxia during neonatal period who suffer from respiratory diseases more than 4-6 times a year and who are not prone to frequent respiratory diseases.

Key words: allelic genes, xenobiotics, perinatal hypoxia, biotransformation, cytochromes, detoxication