

Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов *GSTP1* и *GSTM1* с выживаемостью больных циррозом печени вирусной и алкогольной этиологии

Рачковский М.И.¹, Гончарова И.А.², Белобородова Э.И.¹, Белобородова Е.В.¹, Груздева Е.Г.³, Алексеева А.С.³, Пузырёв В.П.²

Analysis of association of polymorphic variants of genes *GSTP1* and *GSTM1* with survival rate sick of liver cirrhosis of a virus and alcoholic etiology

Rachkovskiy M.I., Goncharova I.A., Beloborodova E.I., Beloborodova Ye.V., Gruzdeva Ye.G., Alekseyeva A.S., Puzyryov V.P.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

³ ОГУЗ «Томская областная клиническая больница», г. Томск

© Рачковский М.И., Гончарова И.А., Белобородова Э.И. и др.

С целью изучения ассоциации полиморфных вариантов генов глутатион-S-трансферазы пи и мю (*GSTP1* и *GSTM1*) с выживаемостью больных циррозом печени (ЦП) проведено одномоментное проспективное исследование 189 больных ЦП вирусной (гепатиты В, С, В и С) и алкогольной этиологии. Проведено сравнение частоты распределения полиморфных вариантов генов *GSTP1* и *GSTM1* между умершими и выжившими больными за 4 года. С большей выживаемостью больных ЦП ассоциировались наличие генотипа AA гена *GSTP1* (критерий χ^2 Пирсона, $p = 0,008$) и нулевой генотип *GSTM1* (критерий χ^2 Пирсона, $p = 0,027$). Шансы развития летального исхода у больных ЦП с наличием генотипов GG и AG по гену *GSTP1* в 2,5 раза выше, чем у больных с генотипом AA. Наличие активной копии гена *GSTM1* увеличивает шансы развития летального исхода в 2 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости учета генетических факторов в прогнозе ЦП.

Ключевые слова: полиморфизм генов, цирроз печени, прогноз.

With the purpose of studying of association of polymorphic variants of genes glutathione S-transferases pi and mu (*GSTP1* and *GSTM1*) with survival rate sick of liver cirrhosis (LC), it is lead uninstantly research of 189 sick of LC of a virus (HBV, HCV, HBV+HCV) and an alcoholic etiology. Have been compared a frequencies of allocation of polymorphic variants of genes *GSTP1* and *GSTM1* between the died and persisted patients for the season 4 years. With greater survival rate of sick of LC associated: presence of genotype AA of gene *GSTP1* (χ^2 Pearson, $p = 0,008$) and «null» genotype *GSTM1* (χ^2 Pearson, $p = 0,027$). Chances of development of a lethal outcome at sick of LC with presence of genotypes GG and AG on gene *GSTP1* in 2,5 times above, than at patients with genotype AA. Presence of active gene replica *GSTM1* enlarges chances of development of a lethal outcome in 2 times.

The received results testify to necessity of the count of genetical factors for the forecast of LC.

Key words: polymorphism genes, liver cirrhosis, forecast.

УДК 616.36-004-02-036:575.13]-07

Введение

В настоящее время большое значение в исследовании патогенеза и прогноза заболеваний

печени, включая цирроз печени (ЦП), уделяется генетическим факторам. В частности, изучаются полиморфные варианты генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, поскольку в этио-

логии ЦП одной из ведущих причин выступает алкоголь, также являющийся ксенобиотиком. Кроме этого, при ЦП уменьшаются возможности организма по обезвреживанию токсинов, поскольку печень является ключевым органом, участвующим в процессах биотрансформации ксенобиотиков. Можно предположить, что у больных ЦП, имеющих более высокий уровень биотрансформации ксенобиотиков, определяющийся активностью ферментов этого процесса, в меньшей степени будет происходить повреждение печени и других органов экзогенными и эндогенными токсинами и, соответственно, будет лучше прогноз. Активность ферментов определяется экспрессией генов, их кодирующих. Поскольку эти гены имеют полиморфные варианты, то и ферменты будут отличаться по последовательности аминокислот или пространственной конфигурации белковых молекул, а это будет приводить к различной активности ферментов. Названные обстоятельства определяют интерес к изучению полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков.

Особое внимание гепатологов в последнее время привлекает изучение ферментов семейства глутатион-S-трансфераз (GST), осуществляющих конъюгацию сульфгидрильной (SH) группы глутатиона с ксенобиотиками или их метаболитами, образовавшимися в первой фазе биотрансформации ксенобиотиков. Данная реакция играет ведущую роль в защите клеток от свободных радикалов [1]. Микросомальная GST тесно связана с цитохром P₄₅₀-системой, что служит для быстрой инактивации активных метаболитов, включая алкоголь [2].

Существуют несколько классов GST в зависимости от метаболизируемого субстрата и органной принадлежности ферментов. Примерно 10% всего пула GST организма содержится в печени [1]. Растворимые и мембраносвязанные формы GST кодируются двумя различными суперсемействами генов. В настоящее время идентифицированы восемь различных классов цитоплазматических GST: альфа, каппа, мю, омега, пи, сигма, тета и дзета [12]. *GSTM1* является одним из генов, кодирующих ферменты класса

мю. Ген локализован на первой хромосоме 1p13.3 и состоит из 10 экзонов [12]. Класс тета кодируется геном *GSTT1*, который картирован на хромосоме 22q11.23 и содержит 6 экзонов [12]. Ген *GSTP1* кодирует класс ферментов пи, локализован на хромосоме 11q13 и состоит из 9 экзонов [12]. Среди многочисленных генов семейства GST гены *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* наиболее часто изучаются в связи с предрасположенностью к развитию различных онкологических заболеваний, с их течением и исходами. Наиболее частым полиморфным вариантом для генов *GSTT1* и *GSTM1* является их делеция (нулевой генотип), которая ассоциирована с полным отсутствием ферментативной активности этих глутатион-S-трансфераз и ослаблением защиты клеток от повреждающего действия метаболитов и свободных радикалов и увеличением в связи с этим цитогенетических повреждений [4, 9]. Для европеоидов частота нулевого генотипа гена *GSTM1* колеблется от 42 до 60%, гена *GSTT1* — от 13 до 26% [12].

Предполагается, что GST защищает печень от патологических процессов, вызванных вирусом гепатита В и С, которые выражаются в обширных повреждениях ДНК в результате окислительного стресса [12]. При злоупотреблении алкоголем пониженная активность GST может приводить к повышению концентрации токсичных метаболитов, вызывающих повреждение печени. Проведено множество исследований, посвященных выявлению ассоциации ЦП алкогольной этиологии с полиморфизмами генов GST. В некоторых работах нулевые генотипы *GSTM1* и *GSTT1* ассоциировались с развитием алкогольного ЦП, а в других такой ассоциации не выявлялось [11]. При изучении ассоциации полиморфизмов GST с вирусными ЦП получены интересные данные. Так, HBV ЦП ассоциировался с нулевым генотипом *GSTM1* и генотипом Val/Val полиморфного варианта Ile105Val гена *GSTP1* [6, 8].

Таким образом, определена потенциальная роль полиморфизмов генов GST в развитии заболеваний печени, поэтому перспективными являются исследования этих генов как факторов, влияющих на течение и прогноз патологии пе-

чени в различных популяциях. Данные об ассоциации полиморфизмов генов *GST* с выживаемостью больных ЦП в литературе не встретились, что определило актуальность настоящего исследования.

Цель исследования — изучить прогностическое значение полиморфных вариантов генов *GSTP1* и *GSTM1* у больных циррозом печени вирусной и алкогольной этиологии.

Материал и методы

Проведено обсервационное одномоментное проспективное исследование с включением 189 больных (85 мужчин и 104 женщины) ЦП вирусной (гепатиты В, С, В и С), алкогольной и смешанной (алкогольно-вирусной) этиологии с оценкой конечной твердой точки — наступления летального исхода от ЦП или его осложнений. Период наблюдения — 4 года. Возраст больных — от 18 до 75 лет (медиана $Me = 51$ год). Момент включения в исследование — верификация в стационаре Томской областной клинической больницы ЦП или поступление в стационар в связи с декомпенсацией ЦП.

Диагноз ЦП подтвержден морфологически (лапароскопия с биопсией) у 35 больных, у остальных — выставлен на основании наличия признаков диффузного повреждения печени, наличия синдрома печеночно-клеточной недостаточности и синдрома портальной гипертензии (варикозное расширение вен желудка и пищевода, асцит). Этиология ЦП определена указанием в анамнезе на многолетнее злоупотребление алкоголем и данными вирусологического исследования сыворотки крови на маркеры вирусов гепатита В (HBsAg, антитела классов м и г к HBcorAg, ДНК HBV), С (антитела классов м и г к HCV, РНК HCV) и D (антитела к HDV). У всех больных в момент включения в исследование произведен забор венозной крови из кубитальной вены в объеме 5 мл для проведения генетических исследований.

Выделение ДНК проводили по стандартной неэнзиматической методике [7]. Выделенную ДНК замораживали и хранили при температуре -20°C до проведения генотипирования.

Изучены полиморфный вариант A313G (11e105V-al) гена *GSTP1* и делеционный полиморфизм гена *GSTM1*.

Изучение полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в геномной базе данных (GDB) и литературе [5, 9]. ПДРФ-анализ проводили с помощью рестрикции амплифицированных участков генома соответствующими рестриктазами (*Bst*MA I для гена *GSTP1*) фирмы «Сибэнзим» (г. Новосибирск). Генотипирование выполняли путем разделения рестрицированных продуктов ПЦР в 3%-м агарозном геле в течение 30–40 мин. Окрашивание проводили бромистым этидием. Фрагменты визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете на установке фирмы BioRad (США). Исследования выполнены на базе НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Больные были распределены на две группы (умершие и выжившие) по отношению к развитию летального исхода в течение 4 лет. При изучении влияния полиморфных вариантов генов на выживаемость больных ЦП необходимым условием было нахождение пациентов с различными полиморфными вариантами одного гена на одной стадии заболевания. Это условие было подтверждено тем, что больные с различными полиморфными вариантами каждого исследуемого гена были сопоставимы по классам Чайлда-Пью, т.е. находились на одной стадии заболевания, кроме этого, они были сопоставимы по полу и возрасту.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Сопоставимость групп по полу, возрасту и классам Чайлда-Пью проводилась при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$.

Проведен анализ частот распределения изучаемых полиморфных вариантов генов в группах умерших и выживших больных ЦП. Проверка нулевой гипотезы об отсутствии раз-

личий между умершими и выжившими больными по частотам распределения полиморфных вариантов генов осуществлялась с использованием критерия χ^2 Пирсона. Нулевая гипотеза об отсутствии различий между группами отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По гену *GSTP1* были три варианта генотипа: AA, GG и AG. По гену *GSTM1* – два варианта генотипа: M1+ (присутствует ген) и M1- (делеция гена). Изучение влияния полиморфных вариантов генов *GSTP1* и *GSTM1* на выживаемость выявило их ассоциацию с летальностью у больных ЦП. Абсолютные частоты распределения генотипов полиморфных вариантов изучаемых генов в сравниваемых группах и результаты статистического анализа представлены в таблице.

Абсолютные частоты распределения полиморфных вариантов генов у больных ЦП

Полиморфные варианты генов	Генотип	Умершие больные ЦП	Выжившие больные ЦП	Уровень статистической значимости p
<i>GSTP1</i> A313G (Ile105Val)	AA	34	65	0,008
	GG	7	6	
	AG	43	32	
<i>GSTM1</i>	M1+	60	55	0,027
	M1-	26	48	

Проведено вычисление шансов наступления летального исхода в течение 4 лет у больных ЦП с различными генотипами по *GSTP1* и *GSTM1*.

Поскольку статистически значимых отличий по распределению частот генотипов GG и AG между группами умерших и выживших больных ЦП выявлено не было, то для оценки шансов развития летального исхода при данных генотипах по сравнению с генотипом AA они были объединены. Шансы умереть у больных ЦП в группе с генотипами GG и AG по гену *GSTP1* $50/38 = 1,32$. Шансы умереть у больных ЦП с генотипом AA по гену *GSTP1* $34/65 = 0,52$. Отношение шансов (ОШ) $1,32/0,52 = 2,54$. Это означает,

что шансы развития летального исхода в течение 4 лет у больных ЦП с наличием генотипов GG и AG по гену *GSTP1* в 2,5 раза выше, чем у больных с генотипом AA по этому гену.

Шансы умереть у больных ЦП с наличием гена *GSTM1* $60/55 = 1,09$. Шансы умереть у больных ЦП с делецией гена *GSTM1* $26/48 = 0,54$. Отношение шансов (ОШ) $1,09/0,54 = 2,02$. Это свидетельствует о том, что шансы развития летального исхода в течение 4 лет у больных ЦП с наличием активной копии гена *GSTM1* в 2 раза выше, чем у больных с отсутствием обеих копий этого гена. Логичнее предположить, что отсутствие *GSTM1* будет приводить к снижению активности процессов 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков и ухудшать прогноз при ЦП. Однако полученные данные свидетельствуют об обратном. Объяснить эту ситуацию можно, предполагая, что в процессе биотрансформации ксенобиотиков с участием *GSTM1* образуются более токсичные вещества, чем исходные продукты. Указания на такую возможность имеются в литературе [1]. Остается установить предполагаемый ксенобиотик, для чего необходимо проведение углубленных химических исследований биологических жидкостей больных. Поскольку у большинства пациентов этиология ЦП была алкогольной, можно предположить, что в суррогатах алкоголя, которые они употребляли, содержалось вещество, биотрансформация которого с участием *GSTM1* приводила к образованию более токсичного продукта. Не исключается эндогенная природа искомого вещества. В связи с этим необходимо проведение дальнейшего изучения данной проблемы.

Выводы

1. Генотип AA по гену *GSTP1* ассоциируется с большей выживаемостью больных ЦП вирусной и алкогольной этиологии по сравнению с генотипами GG и AG.

2. Делеция гена *GSTM1* ассоциируется с большей выживаемостью больных ЦП вирусной и алкогольной этиологии.

Заключение

Полученные результаты очень важны для прогнозирования ЦП, поскольку в наиболее широко используемых прогностических моделях — Чайлда-Пью и MELD (модель терминальной стадии болезни печени) не учитываются генетические факторы, а сами модели имеют пределы прогностической точности [3]. Разработка прогностических моделей ЦП важна для распределения очередности пациентов в листе ожидания на трансплантацию печени и получения другого дорогостоящего лечения, а также решения социальных вопросов в связи с неблагоприятным прогнозом. Изучение генетических прогностических факторов в комплексе с клиническими и разработка на их основе новых прогностических моделей являются очень перспективными и важными направлениями современной гепатологии.

Литература

1. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант, 2002. 720 С.
2. Мазур И.А., Волошин Н.А., Чекман И.С. и др. Клиническое применение тиотриазолина в терапии //

- Сучасна гастроентерологія. 2005. Т. 25. № 5. С. 76–79.
3. Cholongitas E., Papatheodoridis G.V., Vangeli M. et al. Systematic Review: The Model for End-Stage Liver Disease — Should it Replace Child-Pugh's Classification for Assessing Prognosis in Cirrhosis? // Aliment. Pharmacol. Ther. 2005. V. 22. № 11. P. 1079–1089.
4. Hayes J.D., Strange R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences // Pharmacology. 2000. V. 61. P. 154–166.
5. Ishii T., Matsuse T., Teramoto S. et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease // Thorax. 1999. V. 54. P. 693–696.
6. Kandemir O., Tamer L., Tasdelen B. Effects of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 gene polymorphism on the course of hepatitis B virus infection // Hepatogastroenterology. 2008. V. 55. № 86–87. P. 1729–1733.
7. Lahiri D.K., Bye S., Nurnberger J.I. et al. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested // J. Biochem and Biophys. Methods. 1992. V. 25. P.193–205.
8. Mohammadzadeh Ghobadloo S., Yaghmaei B., Allameh A. et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 in patients with HBV-related liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal carriers // Clin. Biochem. 2006. V. 39. № 1. P. 46–49.
9. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms // Toxicol. Lett. 2004. V. 149. P. 309–334.
10. 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.
11. Stickele F., Osterreicher C.H. The role of genetic polymorphisms in alcoholic liver disease // Alcohol Alcohol. 2006. V. 41. № 3. P. 209–224.
12. White D.L., Li D., Nurgalieva Z., El-Serag H.B. Genetic Variants of Glutathione S-Transferase as Possible Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma: A HuGE Systematic Review and Meta-Analysis // Am. J. Epidemiol. 2008. V. 167. № 4. P. 377–389.

Поступила в редакцию 30.03.2008 г.

Утверждена к печати 07.04.2009 г.

Сведения об авторах

М.И. Рачковский — канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

И.А. Гончарова — канд. биол. наук, научный сотрудник НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Э.И. Белобородова — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой терапии ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

Е.В. Белобородова — д-р мед. наук, профессор кафедры терапии ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

Е.Г. Груздева — врач-гастроэнтеролог Томской ОКБ (г. Томск).

А.С. Алексева — канд. мед. наук, врач-гастроэнтеролог, зам. главного врача по лечебной работе Томской ОКБ (г. Томск).

В.П. Пузырёв — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой медицинской генетики СибГМУ, директор НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Рачковский М.И., Гончарова И.А., Белобородова Э.И. и др. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов GSTP1 и GSTM1...

Для корреспонденции

Рачковский Максим Игоревич, тел.: 8-903-950-3802, e-mail: rachkovskii@rambler.ru