

Н. Г. Горовенко, С. В. Подольська, Н. В. Чернюк
**ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ СПАДКОВОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО
ВИНИКНЕННЯ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ**

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України
Івано-Франківський національний медичний університет

Останніми роками пріоритетного значення набуває вивчення особливостей формування і розвитку соціально-значущих захворювань, серед яких патологія бронхолегеневої системи займає одне з перших місць [8]. Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) є прикладом мультифакторіального захворювання, в розвитку якого, поряд із факторами довкілля, суттєва роль належить генетичній компоненті [3, 7]. У збільшенні захворюваності, частоти загострень та тяжкості клінічних проявів ХОЗЛ значну роль відіграють забруднення довкілля, професійні шкідливі фактори, куріння. Куріння вважається агресивним екзогенним чинником, який ініціює цілий комплекс нікотин-асоційованих дисфункцій пульмокардіальної системи [5]. При поєднанні куріння з наявністю у людини конституційних та спадкових факторів ризику суттєво зростає ймовірність виникнення ХОЗЛ [7]. Водночас, забруднення довкілля великою кількістю токсичних речовин сприяє зниженню бар'єрної функції слизових оболонок дихальної системи, викликає респіраторні дисфункції та порушує механізми імунного захисту.

Реакція організму кожної конкретної людини на вплив оточуючого середовища залежить від генетично детермінованих особливостей функціонування ферментних систем I і II фази детоксикації ксенобіотиків [4]. Так, глутатіон-S-трансферази (GSTs) — велика група ферментів, які безпосередньо залучені до другої фази біотрансформації, характеризуються широкою субстратною специфічністю та здатністю до метаболізму багатьох речовин [6]. Встановлено широкий ізоморфний спектр GST, який визначається поліморфізмом генів, що їх кодують. Відмінності в структурі ізоферментів призводять до різної здатності метаболізувати ксенобіотики. Це обумовлює різний ступінь схильності кожної окремої особи до виникнення мультифакторних захворювань, зокрема патології органів дихання [2]. Статистично значущу кореляцію наявності функціонально неактивних алелів генів GSTM1 і GSTT1 із виникненням і перебігом захворювань дихальної системи було виявлено при бронхіальній астмі, емфіземі, раку легень, важкому хронічному бронхіті [16, 17]. Результати наукових публікацій про асоціації виявлення нульових алелів генів GSTM1 та GSTT1 з підвищеним ризиком виникнення ХОЗЛ у різних популяціях є неоднозначними. При аналізі даних літератури встановлено, що частота делеційного варіанту гена GSTT1 у хворих на ХОЗЛ коливалася від 13 % у болгар і 18 % у словаків до 40 % у бразильців європейського походження [14, 15]. Встановлено суттєві популяційні варіації поліморфізму гена GSTM1 та відмінності у трактуванні значення його нульового алелю у розвитку ХОЗЛ [12–13].

Тому актуальним залишається дослідження частоти поліморфних варіантів генів GSTM1 та GSTT1 сімейства GSTs та їх впливу на виникнення та перебіг ХОЗЛ у населення України.

Мета дослідження — вивчення делеційного поліморфізму генів GSTT1 і GSTM1 у хворих на ХОЗЛ різного ступеня тяжкості з метою дослідження можливості застосування цих маркерів для визначення схильності до виникнення хронічного обструктивного захворювання легень.

Матеріал і методи дослідження. Для реалізації поставленої мети проведено комплексне обстеження 86 хворих на ХОЗЛ (37 жінок та 49 чоловіків), які перебували на стаціонарному лікуванні в пульмонологічному відділенні обласного клінічного фтізіопульмонологічного центру та обласній клінічній лікарні м. Івано-Франківська. Діагноз встановлювали згідно рекомендованих критеріїв (Наказ МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р.).

Серед обстежених хворих 33 особи (38,37 %) тривало курили і мали середній ступінь ніотинової залежності, 53 пацієнта (61,63 %) ніколи не курили. В анамнезі у 19 осіб (22,09 %) виявлено тривалий вплив шкідливих професійних факторів. Середній вік хворих складав $(58,10 \pm 10,8)$ років, середній вік дебюту захворювання — 47,22 років, середня тривалість захворювання — $(10,60 \pm 5,84)$ років.

Частоту поліморфних варіантів генів GSTT1 і GSTM1 у хворих на ХОЗЛ порівнювали з такою в контрольній групі з 253 практично здорових людей у віці від 17 до 78 років (середній вік обстежених — $(39,93 \pm 2,14)$ років) обстежених в молекулярно-генетичній лабораторії кафедри медичної генетики НМАПО імені П. Л. Шупика [9]. Матеріалом для дослідження слугували зразки ДНК 86 хворих на ХОЗЛ. Поліморфізм генів глутатіон-S-трансфераз GSTT1 та GSTM1 визначали за допомогою методу мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з детекцією ампліфікованих фрагментів в 1,5 % агарозному гелі. Послідовності праймерів для виявлення делеційних варіантів генів GSTT1 та GSTM1 та умови ампліфікації відповідали протоколу [10].

Для статистичного аналізу отриманих даних використовували стандартні критерії χ^2 та Фішера–Ірвіна. Розрахункові формули робочого листа Excel були запрограмовані згідно рекомендацій Бабица П.Н. та співавт. [1]. Відношення шансів (Odds Ratio (OR)) та довірчі інтервали розраховували з використанням програми Epi Info 6.

Результати і обговорення. Результати дослідження розподілу частот поліморфних варіантів генів GSTT1 та GSTM1 у хворих на ХОЗЛ засвідчили, що сумарна кількість пацієнтів з делеційним варіантом гену GSTT1 переважала таку у контрольній групі (17,44 % та 14,23 % відповідно (рис. 1,а)). Однак відмінності між порівнюваними

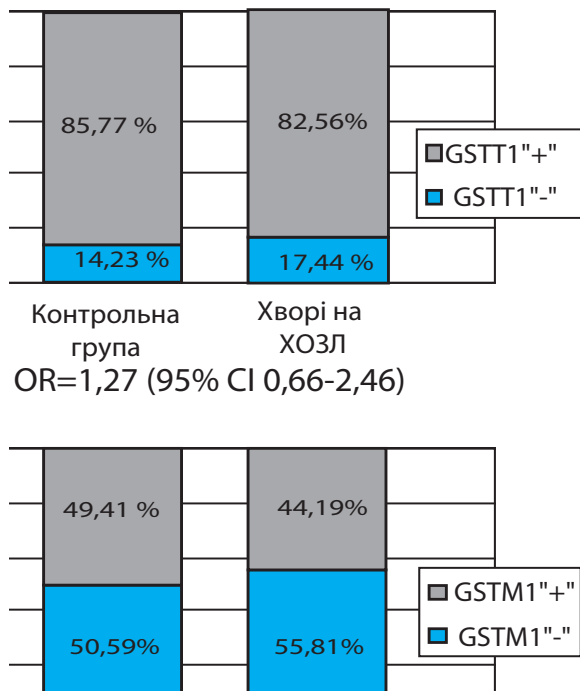


Рис. 1. Частота делеційного поліморфізму генів GSTT1 (а), GSTM1 (б) у хворих на ХОЗЛ та в контрольній групі

групами були недостовірними ($OR=1,27$ 95 % CI 0,66–2,46, $p=0,586$). Водночас значення величини відношення шансів було вищим 1, що може вказувати на асоціацію наявності алелі GSTT1-I з підвищеним ризиком виникнення ХОЗЛ. Подібні результати отримані при обстеженні 217 словаків, хворих на ХОЗЛ, серед яких частота носіїв делеції GSTT1 складала 18 % ($OR=0,91$ CI 0,52–1,6, $p=0,729$) [14].

Дослідження частоти делеційного варіанту гену GSTM1 у хворих на ХОЗЛ у порівнянні з контрольною групою не виявило статистично значимих відмінностей ($OR=1,23$ 95 % CI 0,75–2,02, $p=0,476$), хоча кількість пацієнтів з делеційним варіантом даного гену переважала таку в контролі, а показник OR був вищим за 1 (рис. 1, б). Наші результати узгоджуються з даними інших авторів, які також не виявили істотних асоціацій між генотипом GSTM1-I і ХОЗЛ у словацькій популяції, але вказували на роль комбінації генів EPHX1 His113-His113/GSTM1-I у збільшенні ризику розвитку ХОЗЛ [11]. Не виявлено асоціацій делеційного поліморфізму генів GSTT1 і GSTM1 з

ХОЗЛ у корейців і тайванців [12, 14]. На противагу цьому, встановлено більш високий ризик виникнення ХОЗЛ у носіїв делеції в гені GSTM1 в гомозиготному стані ($OR=3,6$ 95 % CI 1,52–8,54, $p=0,003$) в болгарській популяції [15].

Наступним етапом роботи була оцінка розподілу частот поліморфних варіантів генів GSTT1 та GSTM1 залежно від віку, тривалості та тяжкості перебігу захворювання. Встановлено, що середня тривалість захворювання була найбільшою у осіб з поєднанням функціонально неактивних алелів GSTT1 та GSTM1. За наявності делеції в одному з генів GST середня тривалість ХОЗЛ також була вищою, ніж у носіїв генотипів GSTT1+I і GSTM1+I. Якщо в цілому по групі середній вік дебюту хвороби становив 47,2 роки, то найнижчий показник початку захворювання (44,5 років) спостерігався у пацієнтів з поєднанням делеційних варіантів по генам GSTT1-I та GSTM1-I або лише з делецією у гені GSTT1-I (рис. 2). Майже не відрізнявся вік дебюту ХОЗЛ у пацієнтів з генотипами GSTM1-I, GSTT1+I і GSTM1+I.

Проведено оцінку розподілу варіантів генотипів GSTM1, GSTT1 в групах хворих із різною тяжкістю перебігу ХОЗЛ (таблиця 1). Виявлено, що генотип GSTT1-" асоційований з тяжкістю перебігу ХОЗЛ: $OR=5,41$, 95 % CI 1,70–17,21 при помірному і $OR=3,16$, 95 % CI 0,98–10,8 при тяжкому перебігу захворювання.

Таблиця 1

Частота генотипу GSTT1-" у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень різного ступеня тяжкості порівняно із загальною групою хворих

Групи хворих	GSTT1-"	χ^2	OR
Загальна група хворих	17,44%		
Хворі на ХОЗЛ I ст.	6,67%	–	Критерій Фішера-Ірвіна $p=0,454$
Хворі на ХОЗЛ II ст.	53,33%	7,43	5,41 (1,70–17,21) $p=0,006$
Хворі на ХОЗЛ III ст.	40,00%	2,7	3,16 (0,98–10,80) $p=0,101$

Стосовно розподілу поліморфних варіантів GSTM1, отримано достовірні дані про значущу роль нульового генотипу при тяжкому перебігу захворювання у порівнянні із загальною групою хворих ($\chi^2=9,13$; $p=0,003$). Це свідчить на користь гіпотези про можливу залежність між наявністю у хворого генотипу GSTM1-" і наростанням тяжкості ХОЗЛ.

Таблиця 2

Частота генотипу GSTT1-" GSTM1-" у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень різного ступеня тяжкості порівняно із загальною групою хворих

Групи хворих	GSTT1-" GSTM1-"	χ^2	OR
Загальна група хворих	11,63%		
Хворі на ХОЗЛ I ст.	10,00%	–	Критерій Фішера-Ірвіна $p=0,678$
Хворі на ХОЗЛ II ст.	40,00%	7,31	7,29 (1,87–30,94) $p=0,007$
Хворі на ХОЗЛ III ст.	50,00%	–	5,04 (1,22–21,10) $p=0,053$ Критерій Фішера-Ірвіна $p=0,036$

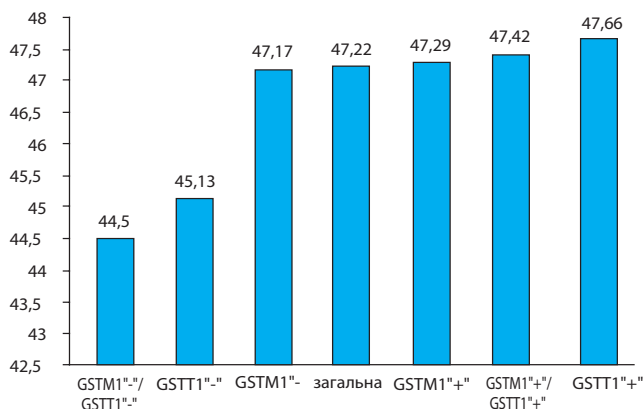


Рис. 2. Середній вік дебюту ХОЗЛ у хворих з різними генотипами

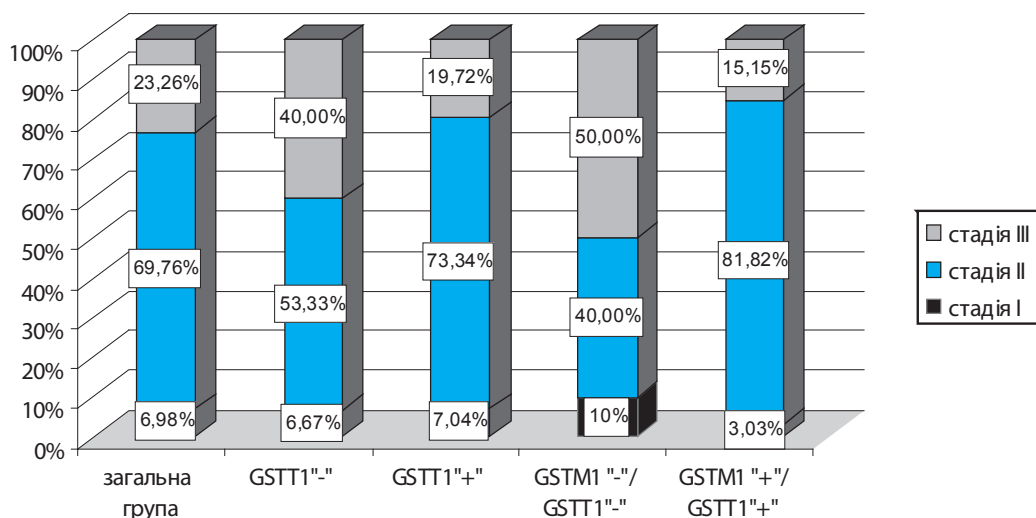


Рис. 3. Співвідношення I, II, III стадій ХОЗЛ в групах осіб з різними генотипами

Асоціацію нульових алелів (GSTT1'-' і GSTM1'-') з тяжкістю патологічного процесу демонструє значуща відмінність їх розподілу із загальною групою хворих з II ($\chi^2=7,31$; $df=1$; $OR=7,29$, 95 % CI 1,87-30,94, $p=0,007$) та III ($p=0,036$) стадіями ХОЗЛ (таблиця 2). Тобто, при поєднанні алелів GSTT1'-' і GSTM1'-' ми спостерігали більш тяжкий клінічний перебіг ХОЗЛ. Підтвердженням взаємозв'язку між тяжкістю перебігу ХОЗЛ і певними поліморфними варіантами генів GSTT1 та GSTM1 є узагальнюючі дані про співвідношення стадії ХОЗЛ в групах осіб з різними генотипами (рис. 3). Таким чином, наявність нефункціональних алелів генів GSTT1 та GSTM1 може слугувати важливим маркером прогнозування тяжкості перебігу ХОЗЛ.

Оскільки генам II фази системи детоксикації ксенобіотиків (GSTM1, GSTT1) належить важлива роль у визначенні підвищеного ризику розвитку ХОЗЛ, їх тестування може розглядатися як метод виявлення осіб зі схильністю до захворювання та використовуватись як один із засобів прогнозування його перебігу.

Перспективи подальших досліджень полягають у співставленні генетичного поліморфізму ферментів детоксикації ксенобіотиків з адекватною кількісною оцінкою екзо- і ендогенних чинників ризику виникнення ХОЗЛ, як мультифакторіального захворювання.

Висновки

1. Частоти генотипів GSTT1I-I, GSTM1I-I, поєднання генотипів GSTT1I-I/ GSTM1I-I у хворих на ХОЗЛ становили відповідно 17,44 %, 55,81 % та 11,63 %. Встановлено асоціації генотипів GSTT1I-I і GSTM1I-I із ХОЗЛ, порівняно з контролем ($OR=1,27$ 95 % CI 0,66–2,46, $p=0,586$ і $OR=1,23$ 95 % CI 0,75–2,02, $p=0,476$). У хворих на ХОЗЛ визначено частоти делеційних варіантів генів GSTT1I-I (17,44 %), GSTM1I-I (55,81 %) та поєднання генотипів GSTT1I-I/ GSTM1I-I (11,63 %). Виявлено асоціації генотипів GSTT1I-I і GSTM1I-I із захворюванням на ХОЗЛ.

2. Показано достовірне збільшення частоти виявлення генотипу GSTT1'-' при поміжному ($\chi^2=7,43$; $df=1$; $OR=5,41$, 95 % CI 1,70-17,21, $p=0,006$), генотипу GSTM1'-' ($\chi^2=9,13$; $p=0,003$) та поєднання генотипів GSTT1'-'/ GSTM1'-' ($p=0,036$) при тяжкому перебігу ХОЗЛ. Це вка-

зує на високий ступінь схильності до розвитку ХОЗЛ та розглядається як прогностичний фактор щодо тяжкості перебігу захворювання. Асоціації делеційного варіанту гену GSTT1I-I, GSTM1I-I та їх поєднання з сімейним характером захворювання, більш раннім дебютом та тяжкістю перебігу свідчать про можливість використання дослідження поліморфних варіантів генів GSTM1 та GSTT1 як прогностичного фактору.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабич, П. Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия хи-квадрат [Текст] / П. Н. Бабич, А. В. Губенко, С. Н. Лапач // Укр. мед. часопис. — 2003. — Т. 32, № 4. — С. 138–144.
2. Баранов, В. С. Тестирование генов системы детоксикации в профилактике некоторых мультифакториальных болезней [Текст] / В. С. Баранов, Т. Э. Иващенко, Е. В. Баранова // Журнал акушерства и женских болезней. — 2003. — Т. LII, вып. 2. — С. 11–16.
3. Викторова, Т. В. Взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов в процессе развития хронических обструктивных болезней легких [Текст] / Т. В. Викторова, Г. Ф. Корытина, Д. Г. Янбаева // Мед. генетика. — 2003. — № 2. — С. 50–59.
4. Пай, Г. В. Генетические маркеры бронхолегочных заболеваний профессионального генеза на примере полиморфных генов глутатион-S-трансферазы M1 и цитохрома P-450A1 [Текст] / Г. В. Пай [и др.] // Мед. генетика. — 2003. — № 2 (5). — С. 223–226.
5. Гноевых, В. В. Математическое моделирование ранних никотин-ассоциированных дисфункций пульмо-кардиальной системы на начальных этапах развития ХОЗЛ [Текст] / В. В. Гноевых // Пульмонология. — 2007. — № 2. — С. 63–67.
6. Дмитриева, А. И. Изучение полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 у больных раком легких [Текст] / А. И. Дмитриева [и др.] // Бюллетень СО РАМН. — 2004. — № 1 (111). — С. 60–62.
7. Факторы риска хронической обструктивной болезни легких, их взаимосвязь и прогностическая значимость [Текст] / М. Г. Гамбарян, Н. А. Дидковский, А. М. Калинина, А. Д. Деев // Пульмонология. — 2006. — № 3. — С. 72–76.
8. Фещенко, Ю. И., Яшина Л.А., Горovenko Н.Г. [Текст]. Хронические обструктивные заболевания легких. — К.: Морион, 2001. — 79 с.
9. Эбрахими, М. Семейная агрегация бронхиальной астмы и полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз [Текст] / М. Эбрахими, С. В. Подольская, Н. Г. Горovenko // Астма та алергія. — 2005. — № 1. — С. 19–23.
10. Arand, M. A. Multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms [Text] / M. Arand [et al.] // Anal. Biochem. — 1996. — Vol. 236. — P. 184–186.
11. Cheng, S. L. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD [Text] / S. L. Cheng [et al.] // Eur. Respir. J. — 2004. — Vol. 23. — P. 818–824.

12. *Yim, J. J.* Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1 [Text] / J. J. Yim [et al.] // *Thorax*. — 2000. — Vol. 55. — P. 121–125.
13. *Imboden, M.* Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study [Text] / M. Imboden [et al.] // *Respir. Research*. — 2007. — Vol. 8 (2). — P. 1–17.
14. *Zidrik, J.* Glutathione S-transferase and Microsomal Epoxide Hydrolase Gene polymorphism and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Slovak Population [Text] / J. Zidrik [et al.] // *Croat. Med. J.* — 2008. — Vol. 49. — P. 182–191.
15. *Investigatioin of GSTP1, GSTM1, and GSTT1 gene polymorphisms and susceptibility to COPD* [Text] / D. Dimov, T. Vlaukova, S. Shazie, V. Ilieva // *Trakia J. of Scienses*. — 2008. — Vol. 6., № 4. — P. 1–8.
16. *Ivaschenko, T. E.* Glutathione-S-transferase mu and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma [Text] / T. E. Ivaschenko, O. G. Sideleva, V. S. Baranov // *J. Mol. Med.* — 2002. — Vol. 80 (1). — P. 39–43.
17. *Baranova, H.* Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis [Text] / H. Baranova [et al.] // *Hum. genet.* — 1997. — Vol. 99. — P. 822–826.

ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ СПАДКОВОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ВИНИКНЕННЯ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

Н. Г. Горovenko, С. В. Подольська, Н. В. Чернюк

Резюме

Проведено вивчення поліморфних варіантів генів ферментів II фази біотрансформації ксенобіотиків (GSTT1 і GSTM1) у 86 хворих на хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ). Встановлено асоціації генотипів GSTT1-I і GSTM1-I із ризиком виникнення ХОЗЛ у порівнянні з контролем (OR=1,27 95% CI 0,66–2,46, $p=0,586$ і OR=1,23 95% CI 0,75–2,02, $p=0,476$). Доведено достовірне збільшення частоти генотипу GSTT1-" при помірно-му ($\chi^2=7,43$; $df=1$; OR=5,41, 95% CI 1,70–17,21, $p=0,006$) перебігу ХОЗЛ, генотипу GSTM1-" ($\chi^2=9,13$; $p=0,003$) і поєднання генотипів GSTT1-" / GSTM1-" ($p=0,036$) при тяжкому перебігу ХОЗЛ. Це дозволяє вважати досліджені маркери інформативними відносно прогнозування тяжкості перебігу захворювання.

DETERMINATION OF MOLECULAR- GENETIC MARKERS OF HEREDITARY SUSCEPTIBILITY TO CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

N. G. Gorovenko, S. V. Podolskaya, N. V. Chernjuk

Summary

The study of polymorphic variants of enzymes phase II xenobiotics biotransformation genes (GSTT1 and GSTM1) in 86 patients with the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was conducted. The associations of genotypes GSTT1-" and GSTM1-" with COPD were noted in comparison with control (OR=1,27 95% CI 0,66–2,46, $p=0,586$ and OR=1,23 95% CI 0,75–2,02, $p=0,476$). The reliable increase of frequency of GSTT1-" is well-proven in moderate ($\chi^2=7,43$; $df=1$; OR=5,41, 95% CI 1,70–17,21, $p=0,006$), GSTM1-" ($\chi^2=9,13$; $p=0,003$) and GSTT1-" / GSTM1-" ($p=0,036$) in severe COPD. This allows considering the studied markers as informative in determination of the severity of the disease.