

УДК 575.113: 616.72-002.775-085

Б. О. БЕКМАНОВ

## ГЕНЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ В РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

(«Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, г. Алматы)

Изучено связь полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков глутатион S-трансферазой (GST) M1 и T1 у пациентов с ревматоидным артритом и в контрольной группе. Показано, что среди больных ревматоидным артритом распространены все 4 варианта генотипов, однако гомозигот по «нулевому» аллелю GSTM1 гена среди людей, болеющих ревматоидным артритом, почти в 2 раза больше (30%), чем в контрольной группе (16%). Это позволяет предположить, что «нулевой» аллель гена GSTM1 играет значительную роль в предрасположенности к ревматоидному артриту.

**Введение.** Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное системное заболевание соединительной ткани. Главной отличительной чертой этого заболевания является – синовиит, приводящий к деструкции суставного хряща, костным эрозиям и в итоге к деформации суставов. Распространенность ревматоидного артрита составляет 0,4-0,8% [1]. Заболевание чаще встречается в странах с сырым и влажным климатом. РА подвержен любой возраст, но пик заболеваемости приходится после 50-летия жизни. Женщины болеют в три-четыре раза чаще мужчин. До настоящего времени этиология РА не установлена. Как возможная причина артрита изучается роль вирусов, не исключается полиэтиологичность заболевания [2]. Окончательно роль инфекции в возникновении и развитии РА пока не выявлена. Большое значение придается генетической предрасположенности [3-5]. У больных изменен генетический контроль над иммунными реакциями. Значительно чаще, чем в популяции, при РА обнаруживаются антигены гистосовместимости HLA-DR<sub>4</sub> и HLA-Dw<sub>4</sub> [6]. Развитие болезней с наследственной предрасположенностью во многом определяется влиянием факторов окружающей среды на индивидуальные генотипы. Взаимодействие генетических и внешних факторов может определить чувствительность организма к различным болезням. Систематическая идентификация вариаций в последовательностях множества генов, ответственных за предрасположенность к мультифакторным болезням и вовлеченных в реакцию организма на условия окру-

жающей среды, является новым направлением генетики человека.

Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз (GST) [7, 8], кодирующих ферменты, ответственные за вторую фазу детоксикации ксенобиотиков, в последнее время часто рассматривают в эпидемиологических исследованиях для определения групп генетического риска развития того или иного заболевания, связанного с накоплением мутаций под действием эндо- и экзогенных факторов. В семействе GST выделяют 4 основных класса: *альфа* (GSTA), *мю* (GSTM), *тета* (GSTT), *ни* (GSTP), сходных по своим аминокислотным последовательностям, но кодируемым разными генами. Каждый класс генов имеет несколько аллельных вариантов, кодирующих белки, отличающиеся по энзиматической активности, или имеющих мутации, препятствующие образованию белковых продуктов («нулевые аллели»). В ряде работ показано, что гены глутатион S-трансфераз, особенно GSTM1 и GSTT1 вовлечены в патогенез различных раков и выступают в качестве модификаторов и факторов риска при самых различных заболеваниях, связанных с неблагоприятным действием факторов внешней среды [9-12]. Не случайно, популяционный скрининг аллельных вариантов генов GSTM1 и GSTT1 сегодня стал предметом широкого обсуждения в мировой научной литературе. Для Казахстана такие исследования приобретают особую актуальность в связи с неблагоприятной экологической обстановкой многих регионов Республики. Выявление комбинаций специфических

генотипов, опосредующих индивидуальную чувствительность к возникновению данных заболеваний, предоставит возможность для разработки эффективных мер профилактики, ранней диагностики, прогнозирования течения болезни и методов их терапии.

### Материалы и методы исследования

**Образцы крови человека.** Материалом для исследования служили образцы крови 96 пациентов с установленным клиническим диагнозом ревматоидного артрита (РА), не имеющих сопутствующих аутоиммунных заболеваний. Материалы были собраны в период 2007-2009 годы в Центральной городской клинической больнице. В качестве контроля использовали образцы крови (100 человек), не болеющих РА.

**Выделение ДНК из образцов крови.** ДНК выделяли из замороженных (-20°C) образцов периферической крови, содержащих в качестве антикоагуляционного агента ЭДТА. Лимфоциты и лейкоциты промывали 2-3 раза раствором 1xSSC с осаждением клеток при центрифугировании на 13000 об/мин и ресуспендриванием осадка. Для экстракции ДНК использовали лиазирующий буфер (0,2 М ацетат Na, 1% SDS). От белковых компонентов освобождались путем стандартной фенол-хлороформной экстракции: 1 обработка равным объемом фенола, 2 – фенол-хлороформной смесью, 1 – хлороформом. ДНК из водной фазы осаждали добавлением 2,5 объемов 96% этанола, осадок ДНК промывали 80% раствором этанола, высушивали на воздухе и растворяли в бидистиллированной воде. Для очистки образцов от примесей РНК, в раствор ДНК добавляли РНК-азу до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Образцы ДНК хранили при -20°C.

**Проведение ПЦР для генотипирования аллелей GSTT1 и GSTM1 генов.** Смесь для амплификации объемом 20 мкл включала 30-50 нг изолированной ДНК образцов, 15 пмоль каждого праймера GSTT1 (s) 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3', (as) 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3' и GSTM1 (s) 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3', (as) 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3', 10 mM dNTP, 2 мкл 10xПЦР буфера (10 mM KCL, 100 mM Трис HCl, pH 9.0) и 0,5 единицы ДНК-полимеразы (Sigma, USA).

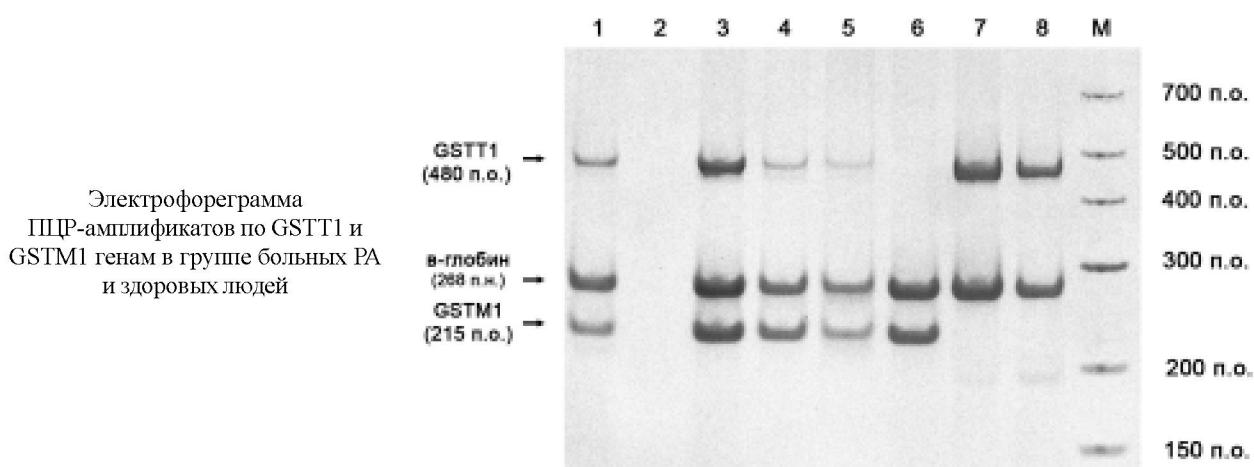
В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена β-глобина (s) 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3', (as) 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'. Условия ПЦР состояли из начальной денатурирующей температуры 94°C – 5 минут, затем проводили 35 циклов амплификации в режиме 94°C – 2 минуты, 59°C – 1 минута, 72°C – 1 минута. Реакция заканчивалась с заключительным шагом 72°C – 10 минут. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 5% полиакриламидном геле и визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете с помощью трансиллюминатора (UVTrans-illuminator-2000, BioRad, USA). Присутствие или отсутствие GSTM1 и GSTT1 аллельных генов определялось по наличию полос в области 480 (пар оснований (п.о.)) (GSTT1 ген) и 215 п.о. (GSTM1 ген), соответственно. Методы генотипирования позволяли отличить гомозиготную делецию гена (нуль-генотип, GSTM1-/-, GSTT1-/-) от гетерозиготы и нормальной гомозиготы (плюс-генотип, GSTM1+/-, GSTT1+/-).

**Статистические методы.** Относительный риск (OR) подверженности мутациям в зависимости от определенного генотипа рассчитывали по формуле: OR = (a/b)/(c/d), где a и b – количество больных в опытной выборке, соответственно имеющие и не имеющие мутации, а c и d – аналогичные показатели в контроле.

### Результаты и их обсуждение

Ревматоидный артрит – одно из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний, характеризующееся наличием значительных нарушений в системе иммунитета. РА является мультифакториальным заболеванием, в развитии которого участвуют множество факторов: внешней среды, иммунные, генетические, гормональные и др. Ряд авторов считает, что чувствительность к данному заболеванию, безусловно, ассоциирована с метаболизмом ксенобиотиков и вредным воздействием окружающей среды. Поэтому целью настоящей работы являлось установление роли полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков GSTM1 и GSTT1 в предрасположенности к ревматоидному артриту.

Оценку влияния генотипа на чувствительность к ревматоидному артриту проводили с помощью ПЦР-анализа. Результат амплификации аллелей GSTT1 и GSTM1 генов представлен на рисунке.



Нами было изучено распределение различных комбинаций генотипов ( $GSTT1+/\pm$ ,  $GSTM1+/\pm$ ;  $GSTT1+/\pm$ ,  $GSTM1-/-$ ;  $GSTT1-/-$ ,  $GSTM1+/\pm$ ; и  $GSTT1-/-$ ,  $GSTM1-/-$ ) среди пациентов, болеющих РА и не имеющих сопутствующих заболеваний (100 чел.), и в контрольной группе людей, не болеющих РА (100 чел.).

В табл. 1 представлено распределение генотипов у больных ревматоидным артритом и контрольной группе. Как видно из табл. 1, среди больных ревматоидным артритом распространены все 4 варианта генотипов, однако гомозигот по «нулевому» аллелю  $GSTM1$  гена среди людей, болеющих РА, почти в 2 раза больше (30%), чем в контрольной группе (16%). Это позволяет предположить, что «нулевой» аллель гена  $GSTM1$  играет значительную роль в предрасположенности к РА.

Для того, чтобы оценить влияние генотипа на индивидуальную восприимчивость к ревматоидному артриту, нами был высчитан показатель относительного риска (OR) заболеваемости РА. Как известно, превышение числа больных людей определенного генотипа над числом здоровых

Таблица 1. Встречаемость данных генотипов у больных ревматоидным артритом и в контрольной группе

Генотипы	Частота встречаемости генотипа, %	
	больные РА, чел.	контроль, чел.
$GSTM+/\pm$ , $GSTT+/\pm$	36 (36,0)	54 (54,0)
$GSTM+/\pm$ , $GSTT-/-$	17 (17,0)	19 (19,0)
$GSTM-/-$ , $GSTT+/\pm$	30 (30,0)	16 (16,0)
$GSTM-/-$ , $GSTT-/-$	17 (17,0)	11 (11,0)

людей с таким же генотипом определяет степень относительного риска развития ревматоидного артрита. Принято считать, что при значении OR < 1 генотип не влияет на развитие заболевания, в то время как при значении OR > 1 генотип оказывает существенное влияние на развитие заболевания. В табл. 2 приведены значения относительного риска подверженности РА в зависимости от определенного генотипа.

Исходя из полученных нами данных, люди с генотипами  $GSTT1+/\pm$ ,  $GSTM1-/-$  (OR 2,25) и  $GSTT1-/-$ ,  $GSTM1-/-$  (OR 1,66) более подвержены

Таблица 2. Оценка относительного риска влияния GSTT1 и GSTM1 генотипов на частоту заболеваемости ревматоидным артритом

Генотипы	Частота встречаемости генотипа, %		OR	CI (95%)	$\chi^2$	P
	больные РА	контроль				
$GSTM+/\pm$ , $GSTT+/\pm$	36 (36,0)	54 (54,0)	0,48	0,27-0,84	5,838	0,016
$GSTM+/\pm$ , $GSTT-/-$	17 (17,0)	19 (19,0)	0,87	0,42-1,80	0,034	0,854
$GSTM-/-$ , $GSTT+/\pm$	30 (30,0)	16 (16,0)	2,25	1,13-4,46	4,771	0,029
$GSTM-/-$ , $GSTT-/-$	17 (17,0)	11 (11,0)	1,66	0,73-3,74	1,038	0,308

Примечание: OR – коэффициент относительного риска; CI (95%) – минимальный и максимальный достоверный интервал; P – вероятность.

данному заболеванию, в то время как генотипы GSTT1 $+/±$ , GSTM1 $+/±$  (OR 0,48) и GSTT1 $-/-$ , GSTM1 $+/-$  (OR 0,87) не влияют на развитие данного заболевания. Таким образом, было выявлено, что нулевой аллель гена GSTM1 участвует в формировании предрасположенности к ревматоидному артриту, в то время как «нулевой» аллель GSTT1 не оказывает существенного влияния на возникновение данного заболевания.

Анализируя литературные данные относительно влияния генотипа на восприимчивость к ревматоидному артриту, можно отметить, что полученные нами данные согласуются с данными других авторов. Так, Б. Юн с соавторами выявили, что «нулевой» аллель гена GSTM1 ассоциирован с увеличением восприимчивости к ревматоидному артриту, показатель относительного риска составил 1,4 [13]. Также этими авторами показано, что «нулевой» генотип увеличивает риск тяжелого течения болезни. Для генотипа GSTT1 такой зависимости не наблюдалось [14, 15]. Для другого аутоиммунного заболевания – системной красной волчанки – показано, что GSTM1 $-/-$  генотип является фактором риска в сочетании с солнечной радиацией (ультрафиолетовым облучением). Показатель OR в данном случае составил 3,1 для кавказской популяции [16]. Таким образом, можно говорить о важной роли именно GSTM1 гена в возникновении и развитии аутоиммунных заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мазуров В.И. Клиническая ревматология (руководство для врачей). СПб: Фолиант, 2005. 520 с.
2. Насонов Е.Л. Ревматология. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2008. 288 с.
3. Беневоленская Л.И., Мякоткин В.А. и др. Клинико-генетические аспекты ревматических болезней. М.: Медицина, 1989. 255 с.
4. Шубаева Н.О. Молекулярно-генетические характеристики рибосомных генов и процессы гибели клеток у больных ревматоидным артритом: Дис. .... канд. биол. наук. М., 2004. 131 с.
5. Суслова Т.А., Бурмистрова А.Л. и др. Генетическая предрасположенность к ревматоидному артриту: роль генов и гаплотипов HLA класса II // Иммунология. 2007. Т. 28, № 4. С. 137-141.
6. Taneja V., Taneja N. et all. HLA-DRB1 (DW10) transgene protects collagen-induced arthritis-susceptible H2Aq and DRB1 (DW4) transgenic mice from arthritis // J. Immunol. 2003. V. 171. P. 4431-4438.
7. Sheehan D., Meade G. et all. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily // Biochem. J. 2001. V. 15. P. 1-16. Review.
8. Oakley A.J. Glutathione transferases: new functions // Curr. Opin. Struct. Biol. 2005. V. 15. P. 716-723. Review.
9. Baranova H., Bothorishvili R. et al. Glutation S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population // Mol. Hum. Reprod. 1997. V. 3. № 9. P. 775-780.
10. Park J.Y., Shantz S.P. et all. Association between Glutation S-transferase and oral cancer risk // Pharmacogenetics. 1999. V. 9. P. 497-504.
11. Новицкий В.В., Чойнзонов Е.Л. и др. Генетический полиморфизм глутатион S-трансфераз T1 и M1 у больных плоскоклеточным и мелкоклеточным раком // Российский онкологический журнал. 2008. № 1. С. 28-31.
12. Шипова О.Ю., Уразова Л.Н. и др. Полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков: взаимосвязь с риском развития рака горла // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 2. С. 62-66.
13. Yun B.R., El-Sohemy A. et all. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and rheumatoid arthritis // J. Rheumatol. 2005. V. 32. P. 992-997.
14. Burim R.V., Canalle R. et all. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P-450 (CYP2E1 and CYP1A1) and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics // Mutagenesis. 2004. № 19. P. 291-298.
15. Simic T., Savic-Radojevic A. et all. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors // Nat. Rev. Urol. 2009. V. 6. P. 281-289. Review.
16. Strange R.C., Lear J.T., Fryer A.A. Polymorphism in glutathione S-transferase loci as a risk factor for common cancers // Arch. Toxicol. Suppl. 1998. V. 20. P. 419-428. Review.

#### Резюме

Ксенобиотиктер детоксикациясы процесіне қатысатын глутатион S-трансфераза (GST) ферментінің M1 және T1 формалары ревматоидты артрит ауруымен ауыратын пациенттерде және бақылау топтарында қарастырылды. Нәтижесінде ревматоидты артритпен ауыратын адамдарда аталған геннің 4 варианты да болатыны және GSTM1 генинің «ноль» аллелдік жағдайы бақылау тобына қарағанда (16%) ревматоидты артритпен ауыратын адамдарда екі есе артық (30%) болатыны көрсетілді. Осы нәтижелерге қарап ревматоидты артрит ауруынын туындаудына GSTM1 генинің «ноль» аллелдік варианты айтартылғатай әсерін тигізеді деп тұжырымдауға болады.

#### Summary

In the present case-control study, we evaluated the association of polymorphisms in xenobiotics detoxification genes (GSTM1 and GSTT1) with rheumatoid arthritis (RA) development in rheumatoid arthritis patients and healthy control group. The distribution of «null» genotypes differed between cases and healthy controls: the frequency of polymorphic variant of GSTM1 gene was two times higher in RA patients when compared to healthy controls. Obtained results suggest that GSTM1 «null» genotype may contribute the development of susceptibility to rheumatoid arthritis.