

Таблица 4

Суммарные данные методов лучевой диагностики в обнаружении патологии органов брюшной полости и забрюшинного пространства

Выявленные изменения	УЗИ (n=155)		СКТ (n=94)		МРТ (n=39)		Всеми методами (n=155)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Панкреатит	43	27,7	16	17,0	5	12,8	56	36,1
Энтероколит	54	34,8	14	14,9	-	-	58	37,4
Пиелонефрит	26	16,8	16	17,0	2	5,1	39	25,2
Конкременты почек	30	19,4	19	20,2	2	5,1	32	20,6
Забрюшинные образования	4	2,6	6	6,4	2	5,1	7	4,5
Всего изменений	157		71		11		192	
Всего больных	76	49,0	29	30,8	9	23,1	114	73,5

для изучения состояния кишечника, почек и забрюшинного пространства.

Метод сцинтиграфии, по данным исследования, обладал ещё более низкими показателями диагностической эффективности в исследовании структуры органов брюшной полости и забрюшинного пространства.

Таблица 5

Эффективность различных методов лучевой диагностики в установлении наличия изменений органов брюшной полости и забрюшинного пространства, %

Метод исследования	Se	Sp	Ac
УЗИ	96,2	99,1	97,4
СКТ	90,1	93,1	92,0
МРТ	92,3	95,1	93,7
РНДИ	87,2	91,1	88,6

В целом показания трех методов лучевой диагностики

ЛИТЕРАТУРА

1. Ибадильдин А.С., Борисов Г.Н. Полисиндромность цирроза печени. – М.: Медицина, 1999. – 196 с.
2. Ивашкин В.Т., Буевров О.А., Лапина Т.Л. Гастроэнтерология нового века: проблемы диагностики // Тер. архив. – 2001. – Т.73. №8. – С.33-36.
3. Колчина О.С. Современные клинико-диагностические особенности течения хронических диффузных заболеваний печени в пожилом возрасте: Дисс. ... канд. мед. наук. – Астрахань, 2000. – 156 с.
4. Комаров Ф.И., Вязицкий П.О., Селезнев Ю.К. Комплексная диагностика заболеваний органов брюшной полости и забрюшинного пространства: Атлас. – М.: Медицина, 1999. – 345 с.

Информация об авторах: 127206, Москва, ул. Вучетича, д. 21, ГКБ №50, e-mail: bavgusta@mail.ru, Кулюшина Елена Анатольевна – ассистент кафедры лучевой диагностики МГМСУ, к.м.н.

© ХАСАНОВА Г.М., ВИКТОРОВА Т.В. – 2010

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Г.М. Хасанова¹, Т.В. Викторова²

(¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, ректор – член-корр. РАМН, проф. В.М. Тимербулатов; ²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, директор - д.б.н., проф. В.А. Вахитов, лаборатория экологической генетики человека, зав. - д.м.н., проф. Т.В. Викторова)

Резюме. В статье приводятся результаты молекулярно-генетического анализа ассоциации полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с тяжестью течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, молекулярно-генетический анализ, ферменты биотрансформации ксенобиотиков.

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF ENZYME GENES OF XENOBIOTICS BIOTRANSFORMATION WITH SEVERITY OF HEMORRHAGIC FEVER COURSE WITH RENAL SYNDROME

G.M. Khasanova, T.B. Viktorova
(Bashkir State Medical University, Ufa)

Summary. The results of molecular-genetic analysis of association of enzymes genes polymorphic variants of xenobiotics biotransformation with severity of hemorrhagic fever course with renal syndrome have been presented in the article.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, molecular-genetic analysis, enzymes of xenobiotics biotransformation.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является ведущей природно-очаговой инфекцией в краевой патологии Башкортостана (РБ). Природный очаг ГЛПС на территории РБ считается одним из самых активных в мире [2]. Заболеваемость ГЛПС в Башкирии регистрируется ежегодно и составляет 40-60% от заболеваемости этой инфекцией по Российской Федерации. Учитывая широкое распространение ГЛПС, а так же экологическую обстановку крупного промышленного города Уфы, мы поставили цель изучить ассоциацию полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных ГЛПС.

Материалы и методы

Всего обследовано 97 больных с серологически подтвержденным методом РНИФ (МФА) диагнозом ГЛПС, в возрасте от 18 до 60 лет, получивших стационарное лечение в городской клинической больнице №13 г. Уфы. Контрольная группа была сформирована из 426 серонегативных по ГЛПС доноров, проживающих на территории РБ, соответствующих выборке больных по возрасту и полу.

Материалом для молекулярно-генетического исследования служили образцы ДНК. Кровь набирали в пробирки со стандартным консервантом (1 мл глюцира) в соотношении 4 мл крови на 1 мл консерванта. До выделения ДНК кровь хранилась при температуре +4°C не более 1 месяца. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [5].

Анализ полиморфных локусов генов GSTP1 проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на термоблокере в автоматическом режиме с использованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров. Гидролиз амплифицированного фрагмента ДНК гена GSTP1 [3] проводили в стандартных условиях: к 10 мкл амплификата добавляли 5 единиц фермента Alw261 и инкубировали при 37°C не менее 12 часов. При отсутствии полиморфного сайта рестрикции продукты амплификации имели размеры 176 пн, что соответствует «нормальному» аллелю Ile. При наличии полиморфного сайта рестрикции фрагмент размером 176 пн расщеплялся на фрагменты размером 91 и 85 пн, что соответствует полиморфному аллелю Val.

Полиморфизм локусов генов CYP1A1 исследовался методом ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

После амплификации ПЦР-продукты всех локусов подвергались гидролизу соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Для этого 5 мкл амплификата смешивали с 5 ед фермента в соответствующем буфере, смесь выдерживали при определенной температуре, согласно рекомендациям производителей («Сибэнзим», «Fermentas», «Promega») в течение 12 ч.

Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 7%-ном полиакриламидном геле. После окончания электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета программ: «Statistica for Windows 6.0», «Rows and Columns», про-

граммного обеспечения MS Excel (Microsoft). При парном сравнении частот генотипов в группах больных и здоровых лиц использовался точный двухсторонний критерий Фишера, а так же критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йетса на непрерывность. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов Odds Ratio (OR). Значимость.

Результаты и обсуждение

Учитывая то, что гены детоксикации ксенобиотиков контролируют биотрансформацию и выведение из организма эндогенных и экзогенных токсических соединений, а при ГЛПС страдает один из главных органов выведения – почки, представлялось важным изучить полиморфизм генов детоксикации ксенобиотиков у больных ГЛПС.

Гены детоксикации фазы II представлены в основном генами суперсемейства глутатионтрансфераз и ариламинов-N-ацетилтрансфераз.

Ген GSTP1 находится на хромосоме 11 (11g13). Преимущественно экспрессируется в альвеолярных клетках, бронхиолах, селезенке и в плаценте. Его белковый продукт обнаружен также в мозге, особенно на границе гемато-энцефалического барьера. Генетический полиморфизм обусловлен заменой нуклеотидов в 313 или 341 положении GSTP1, что приводит к появлению функционально различных форм фермента. На сегодняшний день открыто 4 аллеля этого гена: GSTP1*A – аллель «дикого типа» и измененные аллели GSTP1*B, GSTP1*C и GSTP1*D, полученные при сочетании двух одонуклеотидных полиморфизмов. Транзиция аденина на гуанин в 313 положении в 5 экзоне гена приводит к замене изолейцина на валин в 105 положении, которая затрагивает последовательность ДНК, кодирующую сайт связывания фермента с определенными субстратами.

Установлена важная роль ферментов GSTP1 в детоксикации пестицидов, а так же в процессе канцерогенеза [4]. Доказано, что при наличии мутантных форм активность фермента значительно снижена, что сопровождается нарушением процесса детоксикации ксенобиотиков. Данные, полученные при изучении генотипов гена GSTP1 у больных ГЛПС и в контрольной группе, представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов гена GSTP1 выявил статистически значимые различия между общей выборкой больных и контрольной группой. Несмотря на то, что в обеих группах чаще встречается генотип AA, доля лиц с данным генотипом в контроле оказалась значительно выше – 58,5%, чем среди больных (45,7%). Расчет показателя отношения шансов указывает на его возможную прогностическую значимость (OR=0,59; CI=0,37÷0,9).

Таблица 1
Распределение частот генотипов полиморфизма гена GSTP1, у больных ГЛПС и в контрольной группе

Генотипы	ГЛПС		Контроль		χ^2	P	OR	CI
	абс.	%	абс.	%				
AA	43	45,7	247	58,5	4,6	0,032	0,59	0,37÷0,9
AG	48	51,1	166	39,3	3,88	0,048	1,6	1,0÷2,58
GG	3	3	9	2,13	0,056	0,81	1,5	0,3÷6,24

Гетерозиготный генотип AG в 1,3 раза чаще встречался у больных (51,1%) по сравнению с контрольной группой (39,3%) (табл. 1). Статистический анализ подтверж-

дает наличие значимых различий по частоте гетерозиготного генотипа между группами и позволяет использовать его в качестве генетического маркера, ассоциированного с повышенным риском развития ГЛПС при уровне отношения шансов $OR=1,6$ ($95\%CI=1,0-2,6$).

Статистический анализ не выявил значимых различий по частоте встречаемости гомозиготного по мутации генотипа GG у больных ГЛПС и в контрольной группе. Это можно объяснить редкой частотой указанного маркера, который встречается лишь на 3 хромосомах из 188 у больных ГЛПС и в 9 случаях из 844 проанализированных хромосом контрольной группы.

С учетом клинико-лабораторных показателей, характеризующих течение заболевания, в общей группе больных ГЛПС мы выделили 2 подгруппы: 1) больные тяжелой формой заболевания; 2) больные среднетяжелой и

Таблица 2
Полиморфизм гена GSTP1 у больных ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания

Генотипы	ГЛПС тяжелая форма		ГЛПС средне-тяжелая и легкая форма		Контроль	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
AA	24	44,5	20	50	247	58,5
AG	30	55,5	17	42,5	166	39,4
GG			3	7,5	9	2,1
AA	$\chi^2=3,32$ $p=0,068$		$\chi^2=0,76$ $p=0,38$			
AG	$\chi^2=4,55$ $p=0,03$		$\chi^2=0,049$ $p=0,82$			
GG			$\chi^2=2,3$ $p=0,12$			

Примечание: χ^2 , p – различие больных с контрольной группой.

легкой формой заболевания.

Данные по полиморфизму гена GSTP1 у больных ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания представлены в таблице 2. Как видно из приведенных данных генотип AG значимо ассоциировался с тяжелым течением заболевания ($OR=1,9$; $CI=1,05-3,6$).

Таблица 3
Полиморфизм гена CYP1A1 у больных ГЛПС и в контрольной группе

Генотипы	ГЛПС		Контроль		χ^2	p
	абс.	%	абс.	%		
1A1A	88	90,72	382	91,39	0,0005	1,0005
1A2C	9	9,28	34	8,13	0,069	0,94
2C2C			2	0,48		

Группа генов фазы I представлена генами суперсемейства цитохрома P-450, а так же нецитохромных окислителей. Один из наиболее известных представи-

телей семейства цитохромов P-450 – цитохром P-450 1A1 (арилгидрокарбонкарбоксилаза), кодируется геном CYP1A1. Полиморфизм гена CYP1A1 у больных ГЛПС и в контрольной группе представлен в таблице 3. Статистический анализ не выявил значимых различий по распределению частот генотипов гена CYP1A1 между больными ГЛПС и в контрольной группе.

Ген CYP1A1 расположен на 15 хромосоме на участке j22-j24, экспрессируется преимущественно в лёгких [7], печени, желудочно-кишечном тракте, головном мозге, лимфоцитах и макрофагах [1].

В настоящее время описано несколько полиморфизмов гена CYP1A1. Транзиция аденина на гуанин в положении 2455 в 7 экзоне гена CYP1A1 приводит к замене изолейцина на валин в аминокислотной последовательности каталитического центра фермента, в результате чего продуцируется фермент с активностью в 2 раза выше исходной [6], что ведёт к увеличению концентрации промежуточных токсических метаболитов фазы I, в том числе и активных кислородных молекул.

Нами исследована значимость комбинаций генотипов по локусам CYP1A1 и GSTP1 в клинической характеристике больных ГЛПС. Комбинации генотипов CYP1A1 и GSTP1 у больных ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания представлена в таблице 4. Как видно из приведенных данных комбинация генотипов CYP1A1 и GSTP1 в виде 1A2C/AG встречалась только при тяжелой форме заболевания ГЛПС.

Таблица 4
Комбинации генотипов CYP1A1 и GSTP1 у больных ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания

Генотипы	ГЛПС тяжелая форма		ГЛПС средне-тяжелая и легкая форма		ГЛПС в целом
	абс.	%	абс.	%	абс.
1A2C/AA	2	50	2	50	4
1A2C/AG	5	100			5

Таким образом, гомозиготный генотип AA гена GSTP1 чаще встречался у здоровых людей. Расчёт показателя отношения шансов указывает на его возможную прогностическую значимость ($OR=0,59$; $CI=0,37-0,9$). Гетерозиготный генотип AG гена GSTP1 в 1,3 раза чаще встречался у больных ГЛПС (51,1%) по сравнению с контрольной группой (39,3%), что позволяет использовать его в качестве генетического маркера, ассоциированного с повышенным риском развития ГЛПС при уровне отношения шансов $OR=1,6$ ($CI=1,0-2,58$). Гетерозиготный генотип AG значимо ассоциировался с тяжелым течением заболевания ($OR=1,9$; $CI=1,05-3,55$). Комбинация генотипов CYP1A1 и GSTP1 в виде 1A2C/AG встречалась только при тяжелой форме заболевания ГЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сибиряк С.В., Вахитов В.А., Курчатова Н.Н. Цитохром P450 и иммунная система: факты, гипотезы, перспективы. – Уфа, 2003. – 211 с.
2. Такаев Р.М., Минин Г.Д., Коробов Л.И. и др. // Матер. Всероссийской научно-практической конференции. – Уфа, 2006. – С.29-33.
3. Harries L.W., Stubbins M.J., Forman D. et al. // Carcinogenesis. – 1997. – Vol.18. – P.641-644.

4. Helzlsouer K.J., Huang H-Y., Strickland P.T., et al. // J. Natl. Cancer Inst. – 1998. – Vol.90. – P.512-518.
5. Mathew C.C. Methods in molecular biology / Ed. Walker J.M. – N. Y.: Haman press, 1984. – Vol.2. – P.31-34.
6. Persson L., Johansson L., Ingelman-Sundberg M. // Biochem Biophys Res Commun. – 1997. – Vol.231. №1. – P.227-230.
7. Spivack S.D., Hurteau G.J., Fasco M.J., et al. // Clinical Cancer Research. – 2003. – Vol.9. – P.6002-6011.

Информация об авторах: Башкортостан, 450099, г.Уфа, ул. Бикбая дом 24 корп.3 кв.8, Хасанова Гузель Миргасимовна, электронный адрес Nail_UFA1964@mail.ru; Викторова Татьяна Викторовна - д.м.н., профессор, зав. лабораторией.