

УДК 617.741:575.113.12

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗ M1 И T1 С РАЗВИТИЕМ ПСЕВДОЭКСФОЛИАТИВНОГО СИНДРОМА

© Брежнев А.Ю., Иванов В.П., Баранов В.И., Васильева О.В., Полоников А.В.

Кафедра офтальмологии, кафедра биологии, медицинской генетики и экологии
Курского государственного медицинского университета, Курск
E-mail: drbrezhnev@hotmail.com

Целью настоящего исследования явилось изучение вклада делеционных полиморфизмов генов глутатион S-трансфераз GSTM1 и GSTT1 в развитие псевдоэксфолиативного синдрома (ПЭС). Генотипирование делеционных полиморфизмов генов GSTM1 и GSTT1 осуществлялось с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции у 144 пациентов с верифицированным диагнозом ПЭС и 142 человек без признаков заболевания. Установлено, что у женщин делеционный вариант GSTM1 является фактором риска, ассоциированным с ПЭС ($\chi^2=5,96$; $p=0,015$). Сочетание двух «+» GST-генотипов обеспечивает статистически значимое снижение вероятности возникновения заболевания более чем в 5 раз, а наличие хотя бы одного делеционного генотипа, соответственно, увеличивает её ($\chi^2=5,67$, $p=0,018$). Причем защитный эффект комбинации генотипов GSTM1«+»/GSTT1«+» выявлен у женщин ($\chi^2=4,99$; $p=0,026$) и не был характерен для мужчин ($\chi^2=0,75$; $p=0,39$).

Ключевые слова: псевдоэксфолиативный синдром, глутатион-S-трансфераза, полиморфизм генов, генотип.

THE ASSOCIATION OF POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GSTT1 AND GSTM1 GENES WITH PSEUDOEXFOLIATION SYNDROME

Brezhnev A.Yu., Ivanov V.P., Baranov V.I., Vasilyeva O.V., Polonikov A.V.
Ophthalmology Department, Biology, Medical Genetics & Ecology Department
of the Kursk State Medical University, Kursk

The aim of the present study was to investigate the association of glutathione S-transferase GSTT1 and GSTM1 genotypes with pseudoexfoliation syndrome (PEX). Multiplex polymerase chain reaction was used to study the GSTT1 and GSTM1 polymorphisms in 144 PEX patients and 142 unaffected controls. In the current study we have determined a significant association of GSTM1 null genotype with PEX in the female patients ($\chi^2=5.96$; $p=0.015$). The two plus genotype combination (i.e., T1M1) was found at significantly higher frequencies in the control group as compared to the PEX patients ($\chi^2=5.67$, $p=0.018$). This association was specifically related to the female patients ($\chi^2=4.99$; $p=0.026$); no association was seen in the male patients ($\chi^2=0.75$; $p=0.39$). The results suggest that there should be a significant involvement of the GSTT1 and GSTM1 polymorphisms in XFS etiopathogenesis in Kursk population.

Keywords: pseudoexfoliation syndrome, glutathione S-transferase, gene polymorphism, genotype.

Несмотря на упоминания о псевдоэксфолиативном синдроме (ПЭС) исключительно в офтальмологической литературе, заболевание представляет собой проблему общебиологического характера. Концепция ПЭС как системного процесса с преимущественным поражением органа зрения находит все больше подтверждений и в настоящее время синдром рассматривается как генерализованное поражение экстрацеллюлярного матрикса с избыточной продукцией и накоплением патологического внеклеточного материала в различных интра- и экстраокулярных тканях [11]. ПЭС является одним из главных факторов риска развития глаукомы, дистрофических изменений переднего сегмента глаза, нарушений гематофтальмического барьера, а в офтальмохирургии значительно увеличивает частоту возникновения ряда интра- и послеоперационных осложнений [5].

Этиология и патогенез заболевания остаются не полностью изученными до настоящего време-

ни. Предполагается мультифакториальная природа данной патологии с вовлечением как наследственных, так и негенетических факторов [6]. Особая роль в развитии ПЭС отводится окислительным механизмам повреждения, что подтверждается высоким уровнем маркеров оксидативного стресса в структурах и средах глаза таких пациентов [8, 9]. Среди многочисленных механизмов антиоксидантной защиты и системы цитопroteкции особое место занимает семейство ферментов глутатион S-трансфераз (GST), внутри которого наиболее частым объектом для молекулярно-генетических исследований являются классы GSTM1 и GSTT1. Повышение их экспрессии наблюдается при воздействии света, снижение - при развитии некоторых заболеваний органа зрения. Показана взаимосвязь полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 с первичной открытоугольной глаукомой, сенильной катарактой, экссудативной формой возрастной макулярной дегенерации [2, 10, 12, 13]. Однако в литературе представлены

единичные исследования о вовлеченности генов GST в этиопатогенез ПЭС, причем, зачастую, они носят противоречивый характер. В отдельных популяциях указывается на достоверную взаимосвязь синдрома и указанных полиморфизмов [7], в других отрицается роль генов GST в формировании псевдоэксфолиативного процесса [14]. Целью настоящего исследования явилось изучение вклада делеционных полиморфизмов генов глутатион S-трансфераз GSTM1 и GSTT1 в развитие ПЭС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужила выборка из 286 пациентов, представителей русской национальности, уроженцев Курской области, находившихся на стационарном лечении в ОБУЗ «Офтальмологическая больница» в период 2007-2009 гг. Основную группу составили 144 пациента с верифицированным диагнозом ПЭС, контрольную группу – 142 человека без признаков синдрома.

Всем пациентам проводилось стандартное офтальмологическое обследование. Диагноз ПЭС устанавливался по результатам биомикроскопического исследования при обнаружении псевдоэксфолиативных отложений по краю зрачка или на передней капсуле хрусталика в условиях обязательного медикаментозного мириаза. Из исследования исключались пациенты с псевдофакцией и сопутствующей глазной патологией, затруднявшей диагностику ПЭС.

У всех пациентов проводился забор венозной крови. Выделение геномной ДНК осуществляли из размороженной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование делеционных полиморфизмов генов GSTM1 и GSTT1 осуществлялось с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно описанному в литературе протоколу [3]. В качестве положительного контроля амплификации использовали фрагмент β-глобинового гена [4]. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 2,5% агарозном геле с этидиумбромидом и визуализировали в проходящем УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе GDS-8000 (UVP, США).

Для сравнения распределений частот генотипов и их комбинаций в выборках больных ПЭС и контрольной группе использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность. Различия рассматривали как достоверные при уровнях значимости $p \leq 0,05$. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к заболеванию судили по величине отношения шансов (odds

ratio, OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica 6.0 («StatSoft», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основную группу составили 59 мужчин (41,0%) и 85 женщин (59,0%), контрольную – 60 мужчин (42,3%) и 82 женщины (57,7%). Средний возраст в исследуемых группах составил $71,4 \pm 7,1$ и $69,9 \pm 9,4$ лет, соответственно ($p \geq 0,05$). В табл. 1 представлены данные по частотам генотипов GSTM1 и GSTT1 у пациентов с ПЭС и в контрольной группе. Статистически значимых различий по данному показателю между сравниваемыми группами не получено ($p \geq 0,05$), хотя следует отметить тенденцию к увеличению доли «нуль»-генотипа GSTM1 у лиц с клиническими признаками ПЭС. При анализе частот генотипов в зависимости от пола установлено, что у женщин делеционный вариант GSTM1 является фактором риска, ассоциированным с ПЭС ($\chi^2=5,96$; $p=0,015$; OR=2,28; CI=1,16-4,47). У мужчин распределение GSTM1«+» и GSTM1«del» в основной и контрольной группах не отличалось ($\chi^2=0,0005$; $p=1,0$; OR=1,03; CI=0,47-2,26). Различия в частоте встречаемости делеционного генотипа GSTT1 среди пациентов с ПЭС и в группе сравнения не достигали уровня статистической значимости ни среди мужчин ($\chi^2=2,34$; $p=0,13$; OR=2,12; CI=0,84-5,42), ни среди женщин ($\chi^2=0,57$; $p=0,45$; OR=1,40; CI=0,65-3,00). Полученные данные сопоставимы с результатами немногочисленных исследований в других популяциях в части выводов об отсутствии взаимосвязи делеционных полиморфизмов GSTM1 и GSTT1 с развитием ПЭС в общей выборке. Однако в большинстве из подобных исследований не производилась стратификация пациентов по полу, что не позволяет утверждать, является ли обнаруженная нами ассоциация генотипа «del» GSTM1 с риском развития синдрома характерной исключительно для изучаемой популяции или имеет более широкое распространение.

Учитывая комплексный характер функционирования системы антиоксидантной защиты, особый интерес представляет изучение взаимосвязи заболевания не только с отдельными генотипами, но и их комбинациями. Нами были оценены четыре возможных комбинации генотипов GST: GSTM1«+»/GSTT1 «+», GSTM1«+»/GSTT1«del», GSTM1«del»/GSTT1«+» и GSTM1«del»/GSTT1 «del». Согласно литературным данным, риск развития ряда мультифакториальных заболеваний наиболее часто ассоциирован с наличием

Таблица 1

Распределение частот генотипов *GSTM1* и *GSTT1*
среди пациентов с ПЭС и в контрольной группе

Исследуемые группы (численность, n)	Распределение генотипов <i>GSTM1</i> , n (%)*		Распределение генотипов <i>GSTT1</i> , n (%)	
	«del»	«+»	«del»	«+»
ПЭС (n=144)	70 (51,4%)	74 (48,6%)	43 (29,9%)	101 (70,1%)
Контроль (n=142)	56 (39,4%)	86 (60,6%)	29 (20,4%)	113 (79,6%)
χ^2 (p) OR (95% CI)	3,65 (0,06) 1,62 (0,99-2,67)		2,89 (0,09) 1,66 (0,93-2,96)	

Примечание: * - «del» - делеционный генотип,
«+» - нормальный генотип

Таблица 2

Частоты встречаемости комбинации «плюс»-генотипов генов
GSTM1 и *GSTT1* у пациентов с ПЭС и в контрольной группе

Исследуемые группы (численность, n)	Комбинация <i>GSTM1</i> «+»/ <i>GSTT1</i> «+», n (%)	Комбинации с наличием делецион- ных генотипов, n (%)
ПЭС (n=144)	49 (34,0%)	95 (66,0%)
Контроль (n=142)	69 (48,6%)	73 (51,4%)
χ^2 (p) OR (95% CI)	5,67 (0,018) 1,83 (1,11-3,04)	

делеционных генотипов *GSTM1* «del»/*GSTT1* «del» [1]. Однако применительно к ПЭС мы не установили подобной корреляции при межгрупповом сравнении частот генотипов ($\chi^2=2,56$; $p=0,11$; OR=0,51; CI=0,23-1,14). В свою очередь, сочетание двух «+» GST-генотипов обеспечивает статистически значимое снижение вероятности возникновения заболевания более чем в 5 раз, а наличие хотя бы одного делеционного генотипа, соответственно, увеличивает её (табл. 2). Причем защитный эффект комбинации генотипов *GSTM1* «+»/*GSTT1* «+» выявлен у женщин ($\chi^2=4,99$; $p=0,026$; OR=2,13; CI=1,09-4,17) и не был характерен для мужчин ($\chi^2=0,75$; $p=0,39$; OR=1,49; CI=0,67-3,36).

В результате проведенного исследования установлена связь делеционных полиморфизмов генов *GSTM1* и *GSTT1* с риском развития ПЭС. Присутствие делеционного генотипа хотя бы одного из указанных генов может рассматриваться как фактор риска возникновения заболевания, а сочетание «+»-генотипов, напротив, как фактор устойчивости к нему. Выявлены половые различия в распределении частот изучаемых генотипов и ассоциация *GSTM1* «del» варианта с риском развития заболевания у женщин.

Полученные результаты обосновывают необходимость дальнейшего изучения роли генов

ферментов антиоксидантной системы в этиопатогенезе ПЭС и могут быть использоваться при формировании «групп риска» по данной нозологической форме в офтальмологической практике.

Работа выполнена в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В.П., Полоников А.В., Солодилова М.А. и др. Анализ ассоциации делеционных полиморфизмов генов глутатион S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* с предрасположенностью к бронхиальной астме и особенностями ее клинических проявлений в Курской популяции // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2005. – № 3. – С. 49-55.
2. Abu-Amero K.K., Morales J., Mohamed G.H. et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Arab glaucoma patients // Mol. Vis. – 2008. – Vol. 14. – P. 425-430.
3. Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms // Anal. Biochem. – 1996. – Vol. 36. – P. 184-186.
4. Bell D.A., Taylor J.A., Paulson D.F. et al. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect

- of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1993. – Vol. 85. – P. 1159-1164.
5. *Damji K.F.* Progress in understanding pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliation-associated glaucoma // *Can. J. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 42. – P. 657-658.
6. *Damji K.F., Bains H.S., Stefansson E. et al.* Is pseudoexfoliation syndrome inherited? A review of genetic and nongenetic factors and a new observation // *Ophthalmic Genet.* – 1998. – Vol. 19. – P. 175-185.
7. *Khan M.I., Micheal S., Akhtar F. et al.* The association of glutathione S-transferase GSTT1 and GSTM1 gene polymorphism with pseudoexfoliative glaucoma in a Pakistani population // *Mol. Vis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 2146-2152.
8. *Koliakos G.G., Konstas A.G., Schlotzer-Schrehardt U. et al.* Ascorbic acid concentration is reduced in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome // *Am. J. Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 134. – P. 879-883.
9. *Koliakos G.G., Konstas A.G., Schlotzer-Schrehardt U. et al.* 8-Isoprostaglandin F2a and ascorbic acid concentration in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome // *Br. J. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 87. – P. 353-356.
10. *Oz O., Ates A.N., Tamer L., Yildirim O. et al.* Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 gene polymorphism in exudative age-related macular degeneration: a preliminary report // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 16. – P. 105-110.
11. *Ritch R., Schlötzer-Schrehardt U.* Exfoliation syndrome // *Surv. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 45. – P. 265-315.
12. *Saadat M., Jahromi M.F.* Occupational sunlight exposure, polymorphism of glutathione S-transferase M1, and senile cataract risk // *Occup. Environ. Med.* – 2006. – Vol. 63. – P. 503-504.
13. *Unal M., Guven M., Devranoglu K. et al.* Glutathione S transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are related to the risk of primary open-angle glaucoma: a study in a Turkish population // *Br. J. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 91. – P. 527-530.
14. *Yilmaz A., Tamer L., Ates N.A. et al.* Is GST gene polymorphism a risk factor in developing exfoliation syndrome? // *Curr. Eye Res.* – 2005. – Vol. 30. – P. 575-581.