

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ACE (I/D), GSTT1, GSTM1, TNF α И ОЖИРЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕУТОЧНЕННОЙ ИНФЕКЦИИ ПОДКОЖНО-ЖИРОВОЙ КЛЕТЧАТКИ

Ж.В. Королева, С.В. Подольская

Национальная медицинская академия последипломного образования
имени П.Л. Шупика, Киев

Резюме. Для выявления полиморфных генетических маркеров ассоциированных с повышенным риском развития патологических состояний определяли инсерционно-делеционный полиморфизм гена ACE, делеционный полиморфизм генов GSTT1 и GSTM1, -308 G>A полиморфизма в промоторной области гена TNF α .

Ключевые слова: генетические маркеры ACE (I/D), GSTT1, GSTM1, TNF α , неутонченная инфекция подкожно-жировой клетчатки.

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) хорошо известен как ключевой фермент в регуляции кровяного давления. Он участвует в целом ряде процессов, протекающих в организме; его функция определяется его локализацией, а также действием на регуляторные пептиды. АПФ широко распространен в организме. Основная масса фермента находится в мембранно-связанном состоянии – он является интегральным белком плазматической мембраны. Почти вся молекула АПФ локализована вне клетки, гидрофобный трансмембранный участок находится на карбоксильном конце полипептидной цепи, а внутриклеточный гидрофильный участок насчитывает всего 30 остатков аминокислот. Фермент располагается на внешней поверхности плазматической мембраны разных клеток – эндотелиальных, специализированных эпителиальных, находящихся в местах интенсивного всасывания или выделения жидкости и солей, нейроэпителиальных, на нервных окончаниях, на клетках моноклеарного ряда, а также в репродуктивных органах. Относительно недавно было обнаружено, что АПФ является также компонентом тканей, богатых фибриллярным коллагеном (матрикс сердечных клапанов, рубцы, образующиеся в результате инфаркта миокарда, и др.), и что его содержание повышается с усилением фиброза[6,7]. Предпола-

гается, что он может оказывать влияние на состав внеклеточного матрикса, в частности на синтез коллагена. Кроме того, АПФ был обнаружен в атеросклеротических бляшках в стенках сосудов, что указывает на участие фермента в атеросклеротических процессах. Влияние АПФ на сердечно-сосудистую систему в какой-то степени, а может быть и во многом, генетически обусловлено. Была обнаружена связь полиморфизма гена АПФ с уровнем его активности в крови и тканях и с повышенным риском возникновения ряда сердечно-сосудистых заболеваний. При клонировании гена АПФ было обнаружено, что в интроне 16 либо присутствует (Insertion, I) либо отсутствует (Deletion, D) фрагмент ДНК, состоящий из 287 пар оснований. При этом отмечалась корреляция между D аллелями и уровнем АПФ в крови, лимфе и тканях. Уровень АПФ в сыворотке у здоровых людей гомозиготных по D аллели был почти в два раза выше, чем у гомозиготных по I аллели и имел среднее значение у гетерозиготных – ID генотип. С полиморфизмом гена также связан и уровень АПФ в сердце человека. D-аллели гена АПФ считают фактором риска возникновения инфаркта миокарда, спазма коронарных сосудов, гипертрофии левого желудочка, кровоизлияний, а также высоким риском развития атеросклероза. У больных, гомозиготных по D-аллели, отмечается повышенный тонус гладкой мускулатуры сосудов.

Генетическая предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям, включая острые случаи ишемии, наблюдается и у людей, которые согласно общепринятым критериям характеризуются низкими факторами риска (к факторам риска обычно относят повышенный вес, гиперхолестеринемию, липопротеинемию и др.) [2].

В последние годы существенно возросла частота заболеваний, связанных с высоким уровнем эстрогенов в крови женщин, что значительно снижает качество, а иногда и продолжительность жизни. Как известно, женские половые гормоны синтезируются в яичниках и жировой ткани, после чего поступают в системный кровоток. Одним из осложнений ожирения, широко распространенного как во всем мире, так и в Украине, является повышение количества эстрогена в крови, что является одним из пусковых механизмов развития патологических процессов. Биологической активностью обладает только свободная форма гормона, который, благодаря своей липофильности, может легко проникать в ядро клетки, где локализованы рецепторы к эстрогенам. Связываясь с ядерным рецептором, гормон образует гормон-рецепторный комплекс, который инициирует активацию или ингибирование определенных генов, что в свою очередь вызывает ускорение или ослабление синтеза белков, кодируемых этими генами. После воздействия на клетку молекула эстрогена разрушается и выводится из организма. Но стероидные гормоны – это липофильные соединения, молекулы которых выводятся из организма, только после перевода их в водорастворимую форму, что осуществляют ферменты второй фазы детоксикации ксенобиотиков. Глутатион-S-трансферазы – мультигенное семейство ферментов, которые участвуют в детоксикации большого числа электрофильных ксенобиотиков путем их конъюгации с глутатионом. Синтез глутатион-S-трансфераз (GSTs) контролируется генами, для каждого из которых описаны полиморфизмы. Наличие того или иного аллельного варианта может как определять значительные различия в метаболизме экзогенных соединений, так и рассматриваться в качестве фактора предрасположенности к патологическим состояниям. В генах *GSTT1* и *GSTM1* выявлены протяженные делеции, наличие которых приводит к тому, что синтезируются укороченные белковые продукты без выраженной ферментативной активности. Частота «нулевого» аллеля гена *GSTM1* варьирует от 40 до 60% в различных популяциях и этнических группах. Обширная делеция в струк-

турной части гена *GSTT1*, которая приводит к синтезу белкового продукта без ферментативной активности, встречается у европейцев с частотой до 20% в различных популяциях [1,3,8,9,11,12].

Фактор некроза опухолей α (TNF α) – белок с молекулярной массой 17 кДа – синтезируется моноцитами/макрофагами, нейтрофилами, Т-лимфоцитами, натуральными киллерами, тучными клетками и обладает широким спектром биологического действия. Этот цитокин играет ключевую роль в развитии воспалительного ответа: инициирует синтез IL-1, IL-6, служит хемоаттрактантом для нейтрофильных гранулоцитов, активирует макрофаги, а также стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. TNF α вовлечен в патогенез большинства инфекционных и иммунопатологических заболеваний, где он может выполнять различные функции, главным образом, выступая в качестве медиатора развития врожденного иммунитета. Тем не менее, повышенная продукция TNF α может быть причиной развития осложнений острых воспалительных процессов и септического шока, а также играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний и реакций отторжения трансплантата. В экспериментах на животных показано, что у трансгенных мышей с искусственно введенным геном TNF α человека развивался тяжелый полиартрит, напротив, knockout мыши по гену рецептора TNF α имели существенно сниженную сопротивляемость некоторым патогенам, указывая на важное значение TNF α в противоинфекционной резистентности.

В большинстве случаев в сыворотке крови здоровых доноров TNF α не определяется, либо находится на очень низком уровне, не превышая 50 пг/мл, однако при развитии патологии эта цифра может возрастать в несколько раз. Продукция TNF α в ответ на стандартные стимулы варьирует у разных людей, причем в популяции встречаются стабильные низкопродуцирующие или высокопродуцирующие фенотипы, хотя структура синтезируемого белка остается неизменной. При стимуляции липополисахаридом клеток цельной периферической крови, взятой от группы здоровых доноров, треть образцов показала в 2 раза более высокую продукцию TNF α в сравнении с остальными. В последнее время накапливается все больше данных о значении функционального полиморфизма гена TNF α в индивидуальных колебаниях уровней продукции соответствующего белка. Под функциональным полиморфизмом подразумеваются единичные замены нуклеотидов либо тандемные повторы

участков нуклеотидов в некодируемой части гена (промотор, интрон). Подобные изменения не сказываются на структуре белка, но в некоторых случаях изменяют скорость транскрипции мРНК (понижая или повышая ее).

Ген TNF α расположен на шестой хромосоме (6p21.3) в локусе, кодирующем молекулы главного комплекса гистосовместимости первого (HLA-A, B, C) и второго классов (HLA-DP, DQ, DR). Расположение в средней части генома определяет большую вариабельность локуса, в частности, промоторная зона гена TNF α включает восемь полиморфных участков с единичными нуклеотидными заменами: -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A, -376G/A, -308G/A, -244G/A, -238G/A. Однако, наиболее значимыми для человека считаются два. Это единичные нуклеотидные замены гуанина на аденин в положениях: -308 (G/A) и -238 (G/A), которые вызывают изменения уровня продукции TNF α , т. е. являются функциональными. Позиции -308 и -238 приходятся на промотор, что сказывается на возможности транскрипционных факторов связываться с этой частью гена и, таким образом, влиять на скорость транскрипции. Данные нуклеотидные замены - явление достаточно распространенное, к примеру, среди белых европейцев около 27-33 % в своем генотипе содержат полиморфный редкий аллель -308*A. Дальнейшими исследованиями было показано, что клетки периферической крови людей, гомозиготных по полиморфному аллелю -308*A, синтезируют цитокин в 3 раза активнее, чем клетки лиц с генотипом -308 GG. Рассматривая данный вопрос, четыре независимые группы исследователей использовали химерную конструкцию, состоящую из промоторного участка гена TNF α и гена, транскрипционную активность которого легко измерить (ген хлорамфениколацетилтрансферазы, или люциферазы). В результате было показано, что нуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции -308 значительно повышает транскрипционную активность и увеличивает скорость образования мРНК и, соответственно, продукцию цитокина. Степень повышения транскрипционной активности зависит от вещества, воздействующего на клетку, а также от типа самой клетки. В большинстве случаев это действительно так, однако, существует ряд работ, не подтвердивших влияние полиморфизма в области -308 на эффективность транскрипции гена TNF α . Причина разногласий, по-видимому, кроется в использовании разных типов клеток, в которые трансфецировались плазмиды. Наиболее активная

транскрипция полиморфного гена TNF α (-308*A) идет в макрофагах: в них она в 5 раз выше, чем транскрипция нормального гена -308*G. Учитывая тот факт, что макрофаги – основной источник TNF α , их генетически обусловленная способность к увеличенной продукции провоспалительного цитокина может отражаться на развитии воспалительных и иммунных реакций организма. Высокий показатель встречаемости, а также влияние на продукцию TNF α делают упомянутую генетическую вариацию интересной для исследователей. Ее значение рассмотрено практически при всех видах патологии, однако, данные, представленные в литературе, сильно варьируют и зачастую противоречат друг другу, что обычно объясняется малым числом наблюдений [4].

Целью работы было определение делеционного инсерционно-делеционного полиморфизма гена *ACE* полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1*, -308G>A полиморфизма в промоторной области гена *TNF α* , у пациенток с диагнозом неуточненная инфекция подкожно-жировой клетчатки (бактериальный целлюлит) для выявления полиморфных генетических маркеров, ассоциированных с повышенным риском развития патологических состояний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были обследованы 25 пациенток в возрасте 24-84 года с диагнозом неуточненная инфекция подкожно-жировой клетчатки (бактериальный целлюлит), наблюдавшихся на кафедре дерматовенерологии Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика. Больные находились на стационарном лечении на клинических базах кафедры – в Киевской городской клинической кожно-венерологической больнице и Межрайонном клиническом кожно-венерологическом диспансере № 4 г. Киева. Все больные проходили клинико-лабораторное обследование, включающее сбор анамнеза, общий осмотр и выполнение в динамике общепринятых лабораторных и инструментальных методов исследования. Для того, чтобы оценить, является ли масса тела пациенток недостаточной, нормальной или имеется ожирение, вычисляли индекс массы тела по формуле, предложенной А.Кетеле ($I = m/h^2$ m-масса тела в килограммах; h-рост в метрах; и измеряется в кг/м²) и в зависимости от величины индекса массы тела делили пациенток на группы с дефицитом массы

тела, нормальной массой тела, избыточной массой тела и ожирением I-III степени.

Пациенты поступали в стационар в первые 2-3-10 дней от начала заболевания. Течение заболевания у всех больных оценивалось как средней степени тяжести. Местный воспалительный процесс локализовался на нижних конечностях.

92% женщин имели сопутствующую патологию (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, артериосклероз, варикозная болезнь с явлениями хронической лимфопатии, недостаточности, хронический панкреатит, хронический холецистит, онихомикоз).

Контрольную группу составили 68 женщин такого же возраста, никогда не обращавшихся в специализированные медицинские учреждения по поводу инфекционных заболеваний кожи.

Для молекулярно-генетического исследования использовали периферическую кровь. Забор крови осуществляли в количестве 2,7 мл закрытой системой «Моноветт» производства фирмы «SARSTEDT» (Германия) с антикоагулянтом ЭДТА. Полученные образцы крови хранили в течение 24 часов при $t +4^{\circ}\text{C}$, длительно – при $t -20^{\circ}\text{C}$. ДНК выделяли по стандартной методике с использованием коммерческой тест-системы «ДНК-сорб-В» (Москва, Российская Федерация).

Для выявления инсерционно-делеционного полиморфизма гена *ACE* (I/D) методом полимеразной цепной реакции пользовались последовательностями праймеров и температурными режимами амплификации, предложенными [10] на кафедре медицинской генетики НМАПО им. П.Л. Шупика.

Для исследования делеционного полиморфизма генов *GSTM1*, *GSTT1* пользовались последовательностями праймеров и температурными режимами для мультиплексной полимеразной цепной реакции, предложенными [2].

Для выявления $-308\text{G}>\text{A}$ полиморфизма в промоторной области гена *TNF* α методом полимеразной цепной реакции пользовались последовательностями праймеров и температурными режимами амплификации, предложенными [13].

Продукты амплификации разделяли в соответствии с молекулярным весом при помощи электрофореза в 2% агарозном геле.

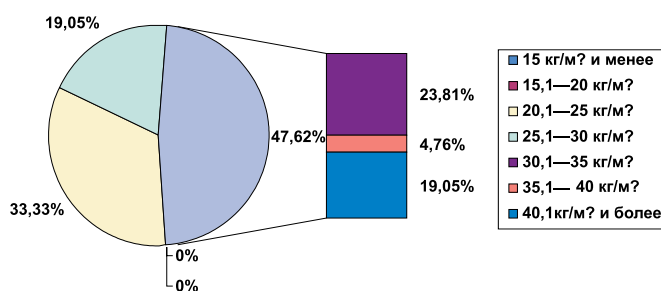
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из значимых факторов риска развития заболеваний является избыточный вес. Для определения степени ожирения пациенток и оценки

роли избыточной массы тела в развитии неуточненной инфекции подкожно-жировой клетчатки (бактериального целлюлита) рассчитывали индекс массы тела обследованных женщин. Женщин с пониженной массой тела среди заболевших женщин не было. Нормальную массу тела (индекс массы тела $22,5\text{--}25,0\text{ кг/м}^2$) имели 33,33% пациенток, избыточный вес (индекс массы тела $25,1\text{--}29,8\text{ кг/м}^2$) – 19,05% пациенток, ожирение I-III степени (индекс массы тела $31,5\text{--}55,1\text{ кг/м}^2$) было выявлено у 47,62% обследованных. Показатели индексов массы тела пациенток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки представлены в диаграмме 1.

Диаграмма 1

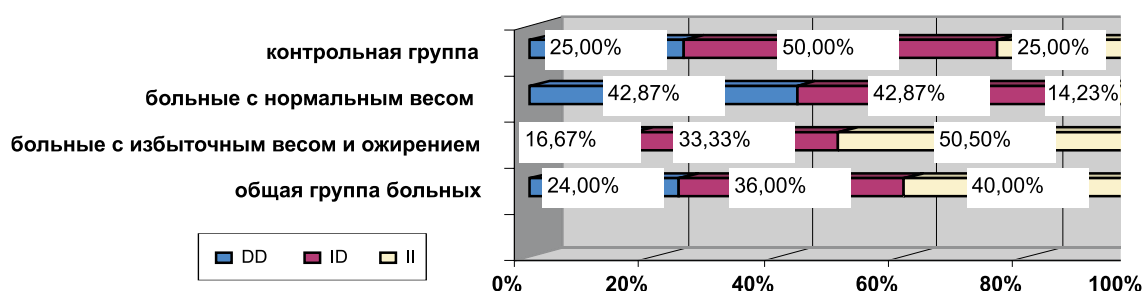
Показатели индексов массы тела пациенток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки



При сравнении частоты инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента у пациенток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе выявили отличия в частоте распределения аллелей во всех исследуемых группах и подгруппах по сравнению с контролем. Соотношение DD, ID и II генотипов в контрольной группе было таким – 25% DD генотип, 50% ID генотип, 25% II генотип, что соответствует нормальному распределению аллелей. В общей группе больных было выявлено меньшее число женщин с DD и ID генотипом и большее с II генотипом по сравнению с контролем – 24% DD генотип, 36% ID генотип, 40% II генотип. При этом различия в распределении I и D аллелей в подгруппах пациенток с нормальной массой тела и с ожирением также различаются – 42,87% DD генотип, 42,87% ID генотип, 14,23% II генотип у пациенток с нормальной массой тела и 16,67% DD генотип, 33,33% ID генотип, 50,50% II генотип у пациенток с ожирением [$\chi^2=4,22$; $p=0,0400$], (диаграмма 2).

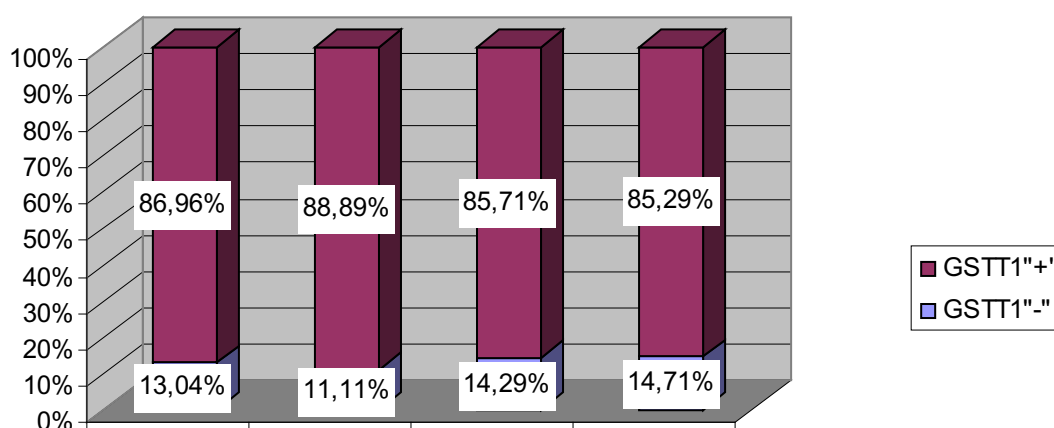
Діаграма 2

Инсерционно-делеционный полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента (ACE) у пациенток с неутонченной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе



Діаграма 3

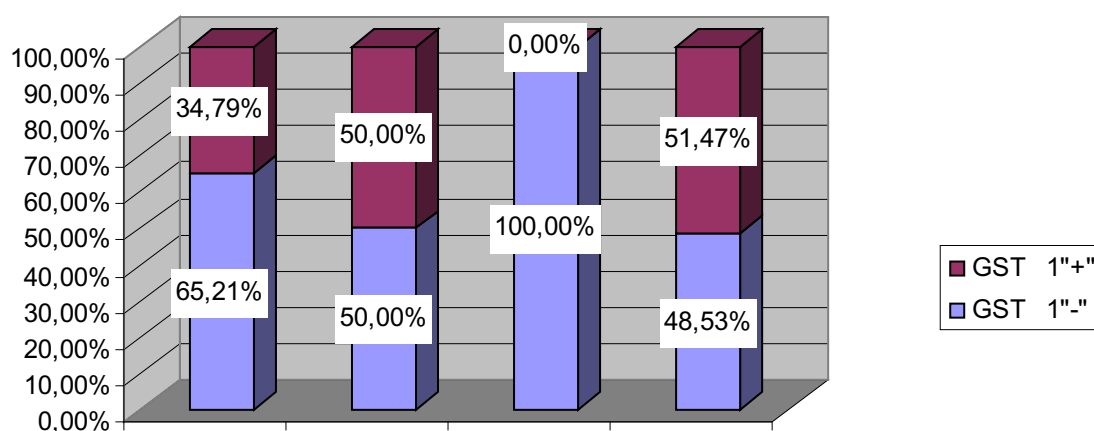
Аллельный полиморфизм гена GSTT1 у пациенток с неутонченной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе



При исследовании делеционного полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы T1 не было выявлено значимых отличий в изучаемых группах.

Діаграма 4

Аллельный полиморфизм гена GSTM1 у пациенток с неутонченной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе



При исследовании делеционного полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы M1 было выявлено повышение доли лиц с нефункциональной аллелью в группе пациенток с неутон-

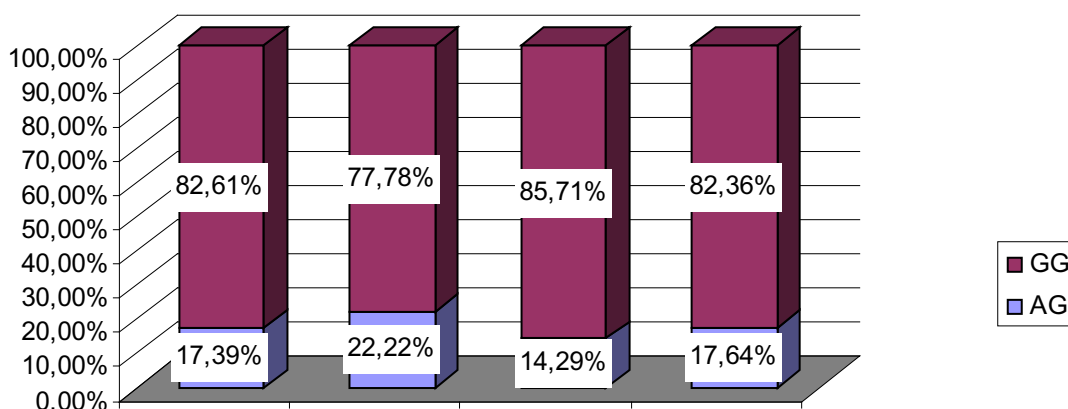
ченной инфекцией подкожно-жировой клетчатки (65,21% по сравнению с 48,53% в контрольной группе, различия были статистически недостоверны [$\chi^2=3,06$; $p=0,0802$]). Разделив группу паци-

енток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки на две подгруппы – женщин с нормальной массой тела и имеющих избыточную массу тела и ожирение, выявили статистически значимые различия между этими двумя подгруппами и при сравнении с контрольной группой. У всех больных с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и нормальной массой тела была выявлена нефункцио-

нальная аллель гена *GSTM1* (100%), что позволяет говорить о статистически достоверных отличиях [$\chi^2=4,40$; $p=0,0359$], тогда как в группе женщин с избыточной массой тела и ожирением частота делеционного варианта гена *GSTM1* достоверно не отличалась от аналогичных значений в контрольной группе (50% и 48,53% соответственно, [$\chi^2=0,31$; $p=0,57849$]).

Диаграмма 5

–308G>A полиморфизм в промоторной области гена *TNF α* у пациенток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе



При исследовании –308G>A полиморфизма в промоторной области гена *TNF α* у пациенток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе отличий в частоте встречаемости аллелей A и G выявлено не было.

ВЫВОДЫ

Преобладание генотипа *DD* гена *ACE* у больных с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки имеющих нормальный вес тела (42,87%) по сравнению с пациентами с избыточной массой тела и ожирением (16,67%), можем говорить о роли сосудистых факторов в патогенезе заболевания.

У больных с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки при исследовании делеционного полиморфизма гена глутатион-S-

трансферазы T1 (*GSTT1*) не было выявлено значимых отличий в изучаемых группах.

У больных с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки с нормальной массой тела было выявлено значимое отличие частоты нефункциональной аллели гена *GSTM1* одного из ключевых ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков, что оказывает воздействие на метаболизм ряда веществ, в том числе и эстрогенов, тогда как в группе женщин с избыточной массой тела и ожирением частота делеционного варианта гена *GSTM1* достоверно не отличалась от аналогичных значений в контрольной группе.

При исследовании –308 G>A полиморфизма в промоторной области гена *TNF α* у пациенток с неуточненной инфекцией подкожно-жировой клетчатки и в контрольной группе отличий в частоте встречаемости аллелей A и G выявлено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности (Введение в предиктивную медицину). – Санкт-Петербург: Интермедика, 2000. – 271 с.
2. Елисеева Ю.Е. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 1. – С. 1-10.
3. Примак А.В. Метаболизм эстрогенов у женщин (общие представления и клиническая практика) часть 1 // Эстетическая медицина. – 2006. – № 9. – С.1-9.

4. Рыдковская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 3. – С. 4-10.
5. Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J., Jager E. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms // Analytical biochemistry. – 1996. Vol. 236. – P. 184-186.
6. Brilla C.G. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis // Cardiovascular Res. – 2000. – Vol. 47. – P. 1-3.
7. Burlew B.S., Weber K.T. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction // Herz. – 2002. – Vol. 27. – P. 92-98.
8. French D., Wilkinson M.R., Yang W. et al. Global gene expression as a function of germline genetic variation // Hum. Molec. Genet. – 2005. – Vol. 14. – P. 1621-1629.
9. Huang R.S., Chen P., Wisel S., et al. Population-specific GSTM1 copy number variation // Hum. Molec. Genet. – 2009. – Vol. 18. – P. 366.
10. Lechin M., Quinones M., Ahmad O. et al. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy // Circulation. – 2001. – Vol. 95. – P. 1808-1812.
11. Lohmueller K.E., Pearce C.L., Pike M., et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. Nature Genet. – 2003. – Vol. 33. – P. 177-182.
12. Verlaan M., te Morsche RH, Roelofs HM, et al. Glutathione S-transferase Mu null genotype affords protection against alcohol induced chronic pancreatitis // Am. J. Med. Genet. – 2003. – Vol. 120 A. – P. 34-39.
13. Yucesoy B., Vallyathan V., Landsittel D.P. et al. Association of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 Gene Polymorphisms with Silicosis // Toxicology and Applied pharmacology. – 2001. – Vol. 172. – P. 75-82.

**РОЛЬ ПОЛІМОРФНИХ ГЕНЕТИЧНИХ
МАРКЕРІВ ACE (I/D), GSTT1, GSTM1,
TNF α ТА ОЖИРІННЯ В ПАТОГЕНЕЗІ
НЕУТОЧНЕНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПІДШКІРНОЇ
КЛІТКОВИНИ.**

Ж.В. Корольова, С.В. Подольська

Резюме. Для виявлення поліморфних генетичних маркерів асоційованих з підвищенням ризиком розвитку патологічних станів визначали інсерційно-делеційний поліморфізм гена ACE, делеційний поліморфізм генів GSTT1 та GSTM1, -308 G>A поліморфізму в промоторній ділянці гену TNF α .

Ключові слова: генетичні маркери ACE (I/D), GSTT1, GSTM1, TNF α , неуточнена інфекція підшкірної клітковини.

**THE ROLE OF GENETIC MARKERS
ACE (I/D), GSTT1, GSTM1, TNF α AND
OVERWEIGHT IN PATHOGENESIS OF
UNSPECIFIED INFECTION OF THE
SUBCUTANEOUS FAT.**

Zh.V. Korolova, S.V. Podolskaya

Rezume. Insertional and deletion polymorphism of the gene ACE, deletion polymorphism of the genes GSTT1 and GSTM1, -308 G>A in promoting zones of the gene TNF α were identified to define polymorphic genetic markers associated with high level of risk of pathologic strains development.

Keywords: genetic markers ACE (I/D), GSTT1, GSTM1, TNF α , unspecified infection of the subcutaneous fat.