

Н.В.Кононыхина^{1,2}, О.Н.Бачинский³, В.И.Бабкина³, Е.В.Трубникова^{1,2}, В.П.Иванов²

Вовлеченность полиморфных вариантов гена EPHX1 в формирование хронической патологии легких профессионального и непрофессионального генеза в популяции жителей Курской области

1 – ГОУ ВПО "Курский государственный университет" Росздрава, научно-исследовательская лаборатория "Генетика": 305000, Курск, ул. Радищева, 33;

2 – ГОУ ВПО "Курский государственный медицинский университет" Росздрава, кафедра биологии, медицинской генетики и экологии: 305041, Курск, ул. К.Маркса, 3;

3 – ГОУ ВПО "Курский государственный медицинский университет" Росздрава, кафедра поликлинической терапии, профболезней, ВПТ: 305041, Курск, ул. К.Маркса, 3

N.V.Kononykhina, O.N.Bachinsky, V.I.Babkina, E.V.Trubnikova, V.P.Ivanov

Involvement of gene EPHX1 polymorphic variants in development of occupational and nonoccupational chronic lung disease in residents of Kursk region

Summary

Recently, growing attention has been paid to the genetic predisposition to respiratory diseases. A major direction is searching candidate genes responsible for occurrence and course of the disease. This study investigated the involvement of epoxide hydrolase gene group in development of occupational respiratory diseases and nonoccupational chronic bronchitis.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, occupational bronchitis, microsomal epoxide hydrolase, DNA polymorphism.

Резюме

В последнее время все больше внимания уделяется генетической предрасположенности к возникновению патологии бронхолегочной системы. Основными направлениями являются поиск и изучение генов-кандидатов, ответственных за возникновение и характер течения заболевания. В данном исследовании проводилось изучение вовлеченности гена группы эпоксидгидролаз в формирование профессиональной бронхолегочной патологии и хронического бронхита непрофессиональной этиологии.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, профессиональный бронхит, микросомальная эпоксидгидролаза, ДНК-полиморфизм.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относится к наиболее распространенным заболеваниям человека, что обусловлено загрязнением окружающей среды, табакокурением и повторяющимися респираторными инфекциями [1, 2]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от ХОБЛ погибают ~ 3 млн человек, а к 2030 г. она может занять 4-е место среди ведущих причин смерти человека [3, 4]. В последующие 20 лет предполагается значительное увеличение ущерба от ХОБЛ [5]. Большая часть информации о распространенности, смертности и заболеваемости ХОБЛ не соответствует действительности — в основном из-за поздней диагностики, что, в свою очередь, приводит к недооценке общего ущерба, наносимого этой патологией [6].

В последние годы активно обсуждается проблема генетической предрасположенности к развитию ХОБЛ. Профессиональная патология легких представлена группой заболеваний, вызываемых воздействием внешних факторов, применяемых на производстве. Поиск отечественными учеными генетических факторов предрасположенности к развитию бронхо-

легочных заболеваний профессионального генеза актуален именно с точки зрения выявления генетической конституции, чувствительной к неблагоприятным факторам агрессивной промышленной среды [7]. В России, как и во всех промышленно развитых странах, имеется тенденция к увеличению числа больных ХОБЛ [8].

Главную роль в защите легких от вдыхаемых токсичных продуктов и активных форм кислорода играют ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты. Наиболее активно метаболизм чужеродных соединений происходит в пневмоцитах 2-го типа. Микросомальные гидроксилирующие системы легких представлены главным образом различными цитохромами, а также микросомальной эпоксидгидролазой (mEH или EPHX). Эти системы относятся к 1-й фазе процесса метаболизма чужеродных веществ, в течение которой происходит превращение ксенобиотиков в электрофильные метаболиты для их последующей инактивации и выведения. Микросомальная эпоксидгидролаза обеспечивает детоксикацию эпоксид-производных полиароматических углеводородов и имеет

большое значение в защите легких от высокоактивных производных эпоксида, образующихся в основном при курении и приводящих к повреждению легочной ткани. Однако, наряду с детоксикацией, mEH осуществляет еще и активацию канцерогенов. Ускоренное превращение эпоксидов в высокоактивные метаболиты повреждает ДНК и тем самым способствует увеличению количества хромосомных aberrаций, что является одной из причин развития новообразований легких [9]. Результаты работ по исследованию полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК) достаточно разноречивы. Первыми связь генного полиморфизма EPHX с предрасположенностью к развитию эмфиземы установили *Smith* и *Harrison*. Они обнаружили, что нуклеотидная замена в 3-м экзоне встречается чаще у больных эмфиземой, чем в контрольной группе (28 % vs 6 %). Отечественными учеными среди 240 больных проведено исследование связи полиморфных вариантов некоторых генов ФБК (в т. ч. EPHX) и предрасположенности к развитию ХОБЛ. Авторы основывались на предположении, что полиморфизм генов способен модулировать уровень активности ФБК, т. е. влиять на избирательную восприимчивость организма к повреждающему действию экзогенных факторов [10].

Целью настоящего исследования стало изучение частоты полиморфизма Y113N и H139R гена EPHX1 у больных с профессиональным бронхитом, хроническим бронхитом непрофессионального генеза и здоровых жителей Курской обл. и возможной ассоциации генотипов с возникновением заболевания.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила популяционная выборка ($n = 661$) не родственных между собой русских жителей Курской обл. Центрально-Черноземного района России. В группу рабочих с диагнозом профессиональный хронический бронхит были включены 162 человека со стажем работы во вредных условиях труда от 7 до 38 лет. Верификация диагноза производилась специалистами Центра профессиональных болезней г. Курска. В группу пациентов с ХОБЛ вошли 154 человека, находившихся на стационарном лечении в пульмонологических отделениях клинических больниц г. Курска (№ 6, ОКБ № 1). Диагноз ХОБЛ ставился врачами-клиницистами согласно международной классификации. В контрольную группу вошли 343 относительно здоровых жителя Курской обл., которые по полу и возрасту соответствовали представителям основных групп.

Клиническое обследование включало в себя сбор жалоб, анамнеза жизни и анамнеза заболевания, физикальные, инструментальные и лабораторные методы обследования. Программа была единой: у испытуемых проводился забор венозной крови из локтевой вены в количестве 10–15 мл с целью экстракции ДНК. Выделение ДНК производили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из замороженной венозной крови. Идентификацию аллельных вариантов генов EPHX1 (Y113N, H139R) проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). При приготовлении растворов для проведения ПЦР использовали реагенты высокой степени очистки *Ultra pure* и *Bio-technology Grade* (США). ПЦР проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,6 мкл образца геномной ДНК. Амплификацию выполняли на многоканальном термоциклере "Терцик" (НПО "ДНК-технология", Москва). С целью оптимизации ПЦР для каждой пары праймеров был рассчитан оптимальный температурно-временной режим отжига и подобрана соответствующая концентрация $MgCl_2$. Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов (5–10 мкл амплификата) производилась с помощью 5–10 U эндонуклеаз. Реакция протекала в присутствии буферов и при температурных условиях, рекомендованных производителями эндонуклеаз. Продукты рестрикции фракционировали в 2–3,5%-ном агарозном геле и окрашивали в этидиумбромиде. Образовавшиеся в результате фракции визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете на приборе GDS-8000 (UVP, США). В качестве маркера молекулярного веса использовали амплификат исследуемого полиморфизма.

Базу данных формировали посредством программного пакета *Statistica 6.0*. Данные обрабатывали по стандартным методикам вариационной статистики. Математические расчеты проводились с помощью программ *Statistica 6.0* и *Excel*.

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

Результаты и обсуждение

При изучении частоты полиморфизма Y113N гена EPHX1 было выявлено отклонение от равновесия Харди–Вайнберга в контрольной группе ($\chi^2 = 4,8544$; $df = 1$; $p < 0,05$), в группе профессионального бронхита ($\chi^2 = 5,5481$; $df = 1$; $p < 0,05$), в группе хронического бронхита ($\chi^2 = 12,7957$; $df = 1$; $p < 0,05$) за счет уменьшения наблюдаемой гетерозиготности. Полученные данные, касающиеся наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, представлены в табл. 1.

При исследовании частоты полиморфизма H139R гена EPHX1 отклонение от равновесия Харди–Вайнберга выявлено не было ($p > 0,05$). Данные по наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности представлены в табл. 2.

При сравнении выборок профессиональных больных и здоровых индивидов по распределению частот аллелей полиморфизма Y113N гена EPHX1 были выявлены статистически достоверные результаты (отношение шансов (ОШ) = 1,41; 95%-ный доверительный интервал (ДИ) – 1,08–1,85; $\chi^2 = 6,57$; $p = 0,01$), а при сравнении группы пациентов с хроническим бронхитом с контрольной группой статистически достоверные результаты отсутствовали (ОШ = 1,17; 95%-ный ДИ – 0,89–1,95; $\chi^2 = 1,23$; $p = 0,27$).

Таблица 1
Показатели равновесия Харди–Вайнберга
полиморфизма Y113H гена ERHX1

Показатель	Контрольная группа	Профессиональный бронхит	Хронический бронхит
Наблюдаемая гетерозиготность	0,4257	0,4079	0,3526
Ожидаемая гетерозиготность	0,4831	0,4999	0,4941

Таблица 2
Показатели равновесия Харди–Вайнберга
полиморфизма H139R гена ERHX1

Показатель	Контрольная группа	Профессиональный бронхит	Хронический бронхит
Наблюдаемая гетерозиготность	0,2692	0,3272	0,2727
Ожидаемая гетерозиготность	0,2665	0,3422	0,2807

При анализе выборок профессиональных больных и здоровых индивидов по распределению частот аллелей полиморфизма H139R гена ERHX1 были выявлены статистически достоверные различия ($OШ = 1,49$; 95%-ный ДИ – 1,07–2,09; $\chi^2 = 5,13$; $p = 0,02$), а между пациентами с хроническим бронхитом и контрольной группой статистически достоверных различий не определялось ($OШ = 1,08$; 95%-ный ДИ – 0,76–1,56; $\chi^2 = 0,10$; $p = 0,75$). Частоты аллелей полиморфных вариантов гена ERHX1 представлены в табл. 3 и 4.

Анализируя распространение частот генотипов полиморфизмов Y113H гена ERHX1 в группах пациентов с профессиональными заболеваниями и здоровых индивидов, выявили статистически достоверные различия по частотам распространения гомозигот мутантного аллеля ($OШ = 1,68$; 95%-ный ДИ – 1,09–2,59; $\chi^2 = 5,66$; $p = 0,02$), что свидетельствует о вовлеченности данного генотипа в развитие заболевания. При анализе распространения частот генотипов между группой непрофессионального хронического бронхита и контрольной группой зарегистрированы показатели, очень близкие к статис-

Таблица 5
Распределение частот генотипов полиморфизма
Y113H гена ERHX1

Генотип	Профессиональный бронхит, n (%)	Хронический бронхит, n (%)	Контрольная группа, n (%)
YY	49 (30,2)	59 (37,8)	130 (37,9)
YH	66 (40,7)	55 (35,3)	146 (42,6)
HH	47 (29,0)	42 (26,9)	67 (19,5)

тически достоверным ($OШ = 1,52$; 95%-ный ДИ – 0,97–2,36; $\chi^2 = 3,43$; $p = 0,06$), что также свидетельствует о вовлеченности данного генотипа в развитие заболевания. Распределение частот генотипов полиморфизма Y113H гена ERHX1 представлено в табл. 5.

Анализ распространения частот генотипов полиморфизма H139R гена ERHX1 между группами пациентов с профзаболеваниями и здоровых индивидов выявил статистически достоверные различия по частотам генотипов гомозигот по дикому аллелю ($OШ = 1,50$; 95%-ный ДИ – 1,01–2,22; $\chi^2 = 4,05$; $p = 0,04$). Частота данного генотипа была снижена в группе профбронхита, между группами больных хроническим непрофессиональным бронхитом и здоровых лиц статистически достоверных различий не выявлено ($OШ = 1,06$; 95%-ный ДИ – 0,70–1,61; $\chi^2 = 0,08$; $p = 0,78$). При анализе распространенности частоты гомозигот по мутантному аллелю полиморфизма H139R гена ERHX1 между группами профессиональных больных и здоровых индивидов статистически достоверных различий не получено ($OШ = 2,41$; 95%-ный ДИ – 0,94–6,19; $\chi^2 = 2,49$; $p = 0,11$), однако отмечалась тенденция к накоплению мутантного генотипа в группе профбронхита. Между группами хронического непрофессионального бронхита и здоровых лиц статистически достоверных различий не выявлено ($OШ = 1,43$; 95%-ный ДИ – 0,48–4,25; $\chi^2 = 0,07$; $p = 0,79$). Анализируя частоту распространения гетерозиготного генотипа между группами профессионального бронхита и здоровых, хронического непрофессионального бронхита и здоровых, статистически достоверных различий не получили ($OШ = 1,32$; 95%-ный ДИ – 0,88–1,98; $\chi^2 = 1,79$; $p = 0,18$ и $OШ = 1,02$; 95%-ный ДИ – 0,66–1,56;

Таблица 3
Частота аллелей полиморфных вариантов гена ERHX1

Полиморфизм	Аллели	Профессиональный бронхит	Контрольная группа	Критерий различия χ^2 (p)
Y113H	113Y	0,506	0,592	6,57 (0,01)
	113H	0,494	0,408	
H139R	139H	0,781	0,842	5,13 (0,02)
	139R	0,219	0,158	

Таблица 4
Частота аллелей полиморфных вариантов гена ERHX1

Полиморфизм	Аллели	Профессиональный бронхит	Контрольная группа	Критерий различия χ^2 (p)
Y113H	113Y	0,554	0,592	1,23 (0,27)
	113H	0,446	0,408	
H139R	139H	0,831	0,842	0,10 (0,75)
	139R	0,169	0,158	

Таблица 6
Распределение частоты генотипов полиморфизма
Н139R гена ERNХ1

Генотип	Профессиональный бронхит, n (%)	Хронический бронхит, n (%)	Контрольная группа, n (%)
НН	100 (61,7)	107 (69,5)	239 (70,7)
НR	53 (32,7)	42 (27,3)	91 (26,9)
RR	9 (5,6)	5 (3,2)	8 (2,4)

$\chi^2 = 0,01$; $p = 0,94$ соответственно). Распределение частоты генотипов полиморфизма Н139R гена ERNХ1 представлено в табл. 6.

Заключение

Полученные результаты позволяют судить о значительном вкладе мутантного генотипа Н139НН гена ERNХ1 в развитие профессионального и непрофессионального бронхита и рассматривать его как ген-кандидат в возникновении хронического бронхита (как профессионального, так и непрофессионального генеза). Снижение частоты дикого генотипа Н139НН в группе профбронхита, в сравнении с контрольной, и тенденция к накоплению мутантного генотипа Н139RR у данной категории больных также способствуют развитию хронического бронхита профессиональной этиологии и могут считаться генетическими маркерами формирования этой патологии, но не влияют на возникновение непрофессионального бронхита.

Литература

1. Министерство здравоохранения РФ, Научно-исследовательский институт пульмонологии МЗ РФ. Хроническая обструктивная болезнь легких. Практическое руководство для врачей. М.; 2004.
2. Garcia-Aymerich J., Agusti A, Barbera J.A. et al. Phenotypic heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease. Arch. Bronconeumol. 2009; 45 (3): 133–142.

3. Mannino D.M., Buist A.S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future Trends. Lancet 2007; 370: 65–73.
4. Овчаренко С.И., Капустина В.А. Особенности хронической обструктивной болезни легких у женщин. Consilium Medicum 2009; 11 (3): 17–21.
5. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких. Пересмотр 2003 г. Национальные институты здоровья США. М.; 2003.
6. Синопальников А.И., Воробьев А.В. Эпидемиология ХОБЛ: современное состояние актуальной проблемы. Пульмонология 2007; 6: 78–86.
7. Ахмадишина Л.З., Корытина Г.Ф., Кочетова О.В. и др. Полиморфизм генов цитохрома Р450 (СYP1A1, СYP1A2, СYP2E1) и риск развития профессионального хронического бронхита. Мед. генетика 2007; 6 (7): 32–37.
8. Овчаренко С.И., Лещенко И.В. Современные проблемы диагностики хронической обструктивной болезни легких. Рус. мед. журнал 2003; 11 (4): 160–163.
9. Brennan W.J., Boffetta P., London P. et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review. Biomarkers 2002, May–Jun; 7 (3): 230–241. Review.
10. Янбаева Д.Г., Корытина Г.Ф., Загидуллин Ш.Ф. и др. Полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты и предрасположенность к хронической обструктивной болезни легких. Молекулярная медицина 2005; 2: 58–63.

Информация об авторах

Кононыхина Наталья Владимировна – аспирант НИЛ "Генетика" КГУ; тел.: (4712) 70-32-34; e-mail: polyakova.16@mail.ru
 Бачинский Олег Николаевич – к. м. н., ассистент кафедры поликлинической терапии, профболезней, ВПТ КГМУ; тел: (4712) 58-81-47; e-mail: kurskmed@mail.ru
 Бабкина Валентина Игоревна – к. м. н., доцент кафедры поликлинической терапии, профболезней КГМУ, заслуженный врач РФ; тел.: (4712) 52-02-32; e-mail: kurskmed@mail.ru
 Трубникова Елена Владимировна – к. б. н., зав. НИЛ "Генетика" КГУ; тел.: (4712) 70-32-34; e-mail: tr_e@list.ru
 Иванов Владимир Петрович – д. м. н., проф., акад. РАЕН, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии КГМУ; тел: (4712) 58-81-47; e-mail: kurskmed@mail.ru

Поступила 25.01.11

© Коллектив авторов, 2011

УДК 616.24-036.12-056.7(470.323)