

УДК: 616.37–002.1:575.174.015.3

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ EPHX1 И CYP1A1 С РАЗВИТИЕМ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА У РУССКИХ

Самгина Т.А., Бушуева О.Ю., Назаренко П.М., Полоников А.В.
ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

THE INVESTIGATION OF ASSOCIATION POLYMORPHISMS OF XENOBIOTICS BIOTRANSFORMATION ENZYMES GENES EPHX1 AND CYP1A1 TO THE DEVELOPMENT OF ACUTE PANCREATITIS IN RUSSIANS

Samgina T.A., Bushueva O.Y., Nazarenko P.M., Polonikov A.V.
Federal public budgetary educational institution of higher education "Kursk State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russia

**Самгина
Татьяна Александровна**
Samgina Tatyana A.
tass@list.ru

Самгина Т.А. — доцент кафедры хирургических болезней № 2
Бушуева О.Ю. — доцент кафедры биологии и медицинской генетики
Назаренко П.М. — профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней № 2
Полоников А.В. — профессор кафедры биологии и медицинской генетики
Samgina T.A. — ass. Professor of the department of surgical diseases № 2
Bushueva O.Y. — ass. Professor of the department of biology and medical genetics
Nazarenko P.M. — Professor, Head of the department of surgical diseases № 2
Polonikov A.V. — Professor of the department of biology and medical genetics

Резюме

Цель — исследование влияния полиморфизмов H139R и I462V генов EPHX1 и CYP1A1 на развитие острого панкреатита (ОП) в русской популяции. Образцы цельной крови были собраны у 299 больных острым панкреатитом и 238 здоровых. Генотипирование полиморфизмов (rs2234922) гена EPHX1 и (rs1048943) гена CYP1A1 выполнено с помощью метода ПЦР с дискриминацией аллелей с помощью TaqMan-зондов. Было обнаружено, что аллель 139H (OR=1.34 95 % CI 1.03–1.75) ассоциирован с пониженным риском развития острого панкреатита, ассоциации полиморфизма I462V с развитием острого панкреатита не обнаружено, проведенный стратифицированный анализ влияния курения и генотипов полиморфизмов H139R и I462V генов EPHX1 и CYP1A1 на развитие острого панкреатита также не обнаружил различий в группах больных и здоровых.

Ключевые слова: острый панкреатит, генетический полиморфизм, ферменты биотрансформации ксенобиотиков

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 147 (11): 34–37

Summary

The aim of this study was to investigate the relationship between polymorphisms H139R and I462V of genes EPHX1 and CYP1A1 in the development of acute pancreatitis (AP) in the Russian population. Whole blood samples were collected from 299 patients with acute pancreatitis and 238 healthy controls. Genotyping of the SNPs (rs2234922) EPHX1 gene and (rs1048943) CYP1A1 gene accomplished using PCR with allele discrimination using TaqMan-probes. It has been found that the allele 139H (OR = 1.34 95 % CI 1.03–1.75) associated with a reduced risk of acute pancreatitis. I462V polymorphism association with development of acute pancreatitis detected. Conducted stratified analysis of smoking and genotypes of polymorphisms H139R and I462V genes EPHX1 and CYP1A1 in the development of acute pancreatitis also found no differences in the groups of patients and healthy controls.

Key words: acute pancreatitis, genetic polymorphism, xenobiotics biotransformation enzymes

Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 147 (11): 34–37

Введение

Согласно современным представлениям об этиопатогенезе острый панкреатит (ОП) представляет собой мультифакториальное заболевание, развитие которого определяется сложным взаимодействием множества генов и различных факторов внешней среды [1,2,3]. Вопросы, касающиеся генетических механизмов ОП и его осложнений, изучены пока не достаточно [1,2,3].

Известно, что восприимчивость организма к вредным воздействиям окружающей среды в значительной мере зависит от активности ферментов системы детоксикации ксенобиотиков. При наличии функционально ослабленных вариантов таких генов риск возникновения некоторых частых мультифакториальных заболеваний увеличивается [4,5].

В процесс биотрансформации, включающий ферментативное превращение чужеродных включений, или ксенобиотиков, и состоящий из трех фаз: активации, собственно детоксикации и выведения, вовлечено множество ферментов [6,7]. Так, цитохромы Р-450 осуществляют биоактивацию полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Установлено, что *CYP1A1* не обнаруживается в нормальной ткани, а экспрессируется лишь под действием ксенобиотиков. Не менее важным ферментом биотрансформации ксенобиотиков (ФБК) является микросомальная эпоксидгидролаза (*EPHX1*), осуществляющая гидролиз разнообразных токсинов внешней среды: эпоксидов, ареновых и алкеновых оксидов, образующихся в ходе их метаболической активации монооксигеназной

системой цитохромов Р-450 [8]. Главными субстратами для *EPHX1* являются эпоксидные производные ПАУ (бен-зо[а]пирен 4,5-оксид) и 1,3-бутадиена, бензин, афлотоксин В 1, кризен, нитропирен, нафталиниантрацен [9, 10].

Исследования последних лет отводят важную роль влиянию химических токсинов из окружающей среды на развитие панкреатита. Так, выявлена ассоциация острого небилиарного панкреатита с курением [11], а у курящих и употребляющих алкогольные напитки пациентов с ОП отмечается повышенный риск развития панкреонекроза [12].

Гены, ответственные за процессы детоксикации, являются важным звеном в патогенезе острого панкреатита. Однако изучению связи генов ФБК с риском развития панкреатита посвящено небольшое количество исследований в мире, и данные их противоречивы. Проведенные исследования по изучению связи полиморфизма Y113H гена *EPHX1* среди европейцев не обнаружили его связи с заболеваниями поджелудочной железы, в том числе, алкогольного панкреатита [13]. Роль генов ФБК (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP2E1* и *CYP1A1*) в развитии алкогольного панкреатита и цирроза печени изучалась среди употребляющих алкогольные напитки бразильцев, ассоциации с панкреатитом не установлено [14].

Цель исследования. В рамках настоящей работы впервые было проведено исследование влияния полиморфизмов H139R и I462V генов *EPHX1* и *CYP1A1* на развитие острого панкреатита.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили 537 образцов ДНК, включающих 299 больных ОП и 238 здоровых индивидов русской национальности. Все пациенты были этнически русские, проживающие на территории Центральной России (Курской области) и неродственные друг другу. Больные ОП (82 женщины и 217 мужчин) находились на стационарном лечении в хирургических отделениях города Курска в период с 2012 по 2015 год. Средний возраст больных составил 48,9±13,1, здоровых лиц – 47,8±12,1. Диагноз ОП устанавливался с использованием современной классификации острого панкреатита, разработанной Российским обществом хирургов в 2014 г. с учетом классификации Атланта-92 и ее модификаций, предложенных в г. Кочин в 2011 г. Международной ассоциацией панкреатологов (International Association of Pancreatology) и Международной рабочей группой по классификации острого панкреатита (Acute Pancreatitis Classification Working Group) в 2012 г., с использованием общеклинических, лабораторных (общий и биохимический анализ крови) и инструментальных (УЗИ и МРТ поджелудочной железы, ЭФГДС) методов исследования. По степени тяжести больные распределены следующим образом: легкая – 27,9 %, средняя – 39 %, тяжелая – 33,1 %. Контрольная группа формировалась в ходе профилактических осмотров на предприятиях

и государственных учреждениях, а также в стационарах ЛПУ г. Курска. В контрольную группу включали пациентов (80 женщин и 158 мужчин), не имеющих заболеваний желудочно-кишечного тракта и стойкой хронической патологии других органов и систем. Исследование одобрено этическим комитетом КГМУ, все пациенты подписали информированное согласие на проведение исследований.

У всех обследуемых проводился забор венозной крови для проведения молекулярно-генетических исследований. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизмов (rs2234922) гена *EPHX1* и (rs1048943) гена *CYP1A1* проводилось методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96Bio-Rad Laboratories (США) с использованием протоколов, опубликованных в литературе [15]. С целью проверки качества генотипирования 10 % проб было выбрано случайным образом «случай-контроль» с целью повторного генотипирования, полученные результаты не отличались от первоначальных. Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов генов с риском развития ОП использовали критерий χ^2 и отношение шансов (OR) с 95 %-ми доверительными интервалами (CI).

Статистический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 6.0 ("StatSoft", США). Уровень статистической значимости принимали

при $p < 0,05$. Статистический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 6.0 ("StatSoft", США).

Результаты исследования

Частоты аллелей и генотипов полиморфизмов 139HR гена *EPHX1* (rs2234922), I462V гена *CYP1A1* (rs1048943) представлены в таблице 1. Генотипы исследуемых полиморфизмов находились в соответствии с распределением Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Как видно из таблицы 1, аллель 139H (OR=1.3495 % CI 1.03–1.75) ассоциирован с пониженным риском развития острого панкреатита.

Проведенный стратифицированный анализ влияния курения и генотипов полиморфизмов H139R гена *EPHX1* и I462V гена *CYP1A1* на развитие острого панкреатита показал, что среди больных острым панкреатитом курение не является значимым фактором риска (таблица 2).

Обсуждение полученных результатов

Изучение полиморфизмов генов ферментов детоксикации ксенобиотиков – одно из активно разрабатываемых направлений исследований в раскрытии патогенетических звеньев инициации и течения заболеваний легких, молочной железы, рака яичников и органов желудочно-кишечного тракта в различных популяциях [16,17,18].

Эпоксидгидролаза играет важную роль в процессе активации и детоксикации канцерогенов, продуктов табакокурения, присоединяя воду к эпоксидам бензола, бензпирена и другим полициклическим углеводородам, образованным в ходе первой фазы обезвреживания, превращает их в диолы. Генетический полиморфизм может приводить к синтезу ферментов с измененной активностью, что в свою очередь, может быть причиной изменения скорости биотрансформации. Проведенные исследования по изучению связи полиморфизма Y113H гена *EPHX1* среди европейцев не обнаружили его связи с заболеваниями поджелудочной железы, в том числе, алкогольного панкреатита [13].

Трансформация имеющихся знаний о полиморфизмах гена *EPHX1* в клиническое применение ограничивается отсутствием кристаллической структуры фермента и соотношений между его генотипом и фенотипическими проявлениями. Так, аллельный вариант 139R может быть связан с повышенной активностью *EPHX1* в отношении метаболической активации (высокотоксичных и реактивных ареновых и алифатических эпоксидов) некоторых липофильных ксенобиотиков [19,20], тогда как недавние исследования показали, что указанный аллель ассоциирован с пониженной активностью фермента в метаболизме эпоксидов ПАУ в их дигидродиольные производные [21].

В тоже время, при эпоксидировании бенз[а]пирен-4,5-оксида формирование диола может

привести к стабилизации вторичного эпоксида и существенному увеличению его токсических свойств [10].

В рамках настоящего исследования впервые обнаружена взаимосвязь полиморфизма H139R (rs2234922) гена *EPHX1* с развитием острого панкреатита, за счет снижения частоты встречаемости аллеля H гена *EPHX1* среди больных.

Полиморфизм H139R гена *EPHX1* можно рассматривать в качестве нового генетического маркера предрасположенности к острому панкреатиту в русской популяции. Однако следует продолжить дальнейшие исследования по оценке вовлеченности полиморфизмов гена *EPHX1* в развитие острого панкреатита в других популяциях мира. В перспективе с практической точки зрения данные генетического тестирования полиморфизма H139R (rs2234922) гена *EPHX1* можно будет использовать для формирования среди населения, а также членов семей, отягощенных развитием панкреатита, группы риска развития болезни и проведения необходимых профилактических мероприятий по ее предупреждению.

Ген *CYP1A1* кодирует ключевой фермент, в 1 фазе биотрансформации ксенобиотиков превращающий полициклические ароматические углеводороды в высокоактивные мутагенные метаболиты. Известно 19 вариантов полиморфизмов гена, которые играют определенную роль в развитии онкологических и профессиональных заболеваний [21].

В представленной работе впервые изучен вклад полиморфизма I462V гена *CYP1A1* в развитие острого панкреатита, ассоциации полиморфизма I462V с развитием острого панкреатита не обнаружено, проведенный стратифицированный анализ влияния курения и генотипов полиморфизма I462V гена *CYP1A1* на развитие острого панкреатита также не обнаружил различий в группах больных и здоровых.

Литература

1. La Rusch J, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis// Curr. Opin. Gastroenterol. – 2011.-№ 27. – P. 467–474.
2. Curley P. J., McMahon M. J., Lancaster F. et al. Reduction in circulating levels of CD4 positive lymphocytes in acute pancreatitis: relationship to endotoxin, interleukin-6 and disease severity// Br. J. Surg. 1993,80. -P.1312–1315.
3. Yin YW, Sun QQ, Feng JQ, Hu AM, Liu HL, Wang Q. Influence of interleukin gene polymorphisms on development of acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis //Mol. Biol. Rep. – 2013 Oct;40(10). -P.5931–5941.
4. Thornton-Wells, T.A. Genetics, statistics, and human disease: Analytical retooling for complexity/

Генотипы/ аллели	Больные ОП (n=299)		Здоровые лица (n=238)		c² (p)	OR (95 %CI)
	n	%	n	%		
139HH	131	43.8	124	52.1	3.65(0.06)	1.39(0.99–1.96)
139HR	137	45.8	99	41.6	0.96(0.33)	1.19(0.84–1.67)
139RR	31	10.4	15	6.3	2.8(0.09)	1.72(0.91–3.27)
139H	0.667		0.729		4.77(0.03)	1.34(1.03–1.75)
139R	0.333		0.271			
462II	268	89.6	215	90.3	0.07(0.79)	1.08(0.61–1.9)
462IV	27	9.0	23	9.7	0.06(0.8)	0.93(0.52–1.66)
462VV	4	1.3	0	0	3.21(0.07)	7.26(0.39–135.6)
462I	0.941		0.952		0.54(0.46)	1.22(0.71–2.1)
462V	0.059		0.048			

Таблица 1.

Частоты аллелей и генотипов полиморфизмов 139HR гена *EPHX1*, 462IV гена *CYP1A1* в группах больных острым панкреатитом и здоровых лиц

фактор риска	Генотипы				OR(95 % CI) P -value ²	
	Больные ОП		Здоровые лица		без фактора риска	с фактором риска
	без фактора риска	с фактором риска	без фактора риска	с фактором риска		
Курение						
139RR <i>EPHX1</i>	10(9.3)	21(10.9)	10(8.1)	5(4.3)	n=231	n=307
139HH+ 139HR <i>EPHX1</i>	97(90.7)	171(89.1)	114(91.9)	110(95.7)	1.61(0.76–3.42) 0.29	2.7(0.99–7.38) 0.04
462II <i>CYP1A1</i>	103(92.8)	165(85.9)	113(91.9)	102(88.7)	1.28(0.63–2.60)0.49	0.88(0.33–2.31)0.79
462IV <i>CYP1A1</i>	4(3.6)	23(12.0)	10(8.1)	13(11.3)	1.07(0.52–2.20)0.86	0.42(0.13–1.39)0.14
462VV <i>CYP1A1</i>	4(3.6)	4(2.1)	0(0)	0(0)	5.51(0.29–103.3)0.12	10.34(0.55–194.2) 0.03

Таблица 2.

Анализ влияния курения, генотипов полиморфизмов H139R гена *EPHX1* и I462V гена *CYP1A1* на развитие острого панкреатита

- T.A. Thornton-Wells, J.H. Moore., J.L. Haines // Trends Genet. – 2004. – Vol.20. – P.640–647;
- Rosendaal, F.R. Forum on genetic studies in complex disease / F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma// J. Thromb. Haemost. – 2004. – Vol.2. – P. 342.
- Баранов В. С. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину / В.С. Баранов, Е.В. Баранова, Т.Е. Иващенко // СПб.: Интермедика, 2000. – 272 с.
- Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков / А.В. Спицын [и др.] // Вестн.ВОГиС. – 2006. – Том 10, № 1. – С. 97–105.
- Omicinski C. J., Aicher L., Swenson L. Developmental expression of human microsomal epoxide hydrolase // J. Pharmacol. Exp. Ther. –1994. – Vol. 269. – P. 417–423.
- Fretland A. J., Omicinski C. J. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology // Chem.Biol. Interact. – 2000. – Vol. 129. – P. 41–59.
- Morisseau C., Hammock B. D. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. –2005. – Vol. 45. – P. 311–333.
- Setiawan VW1, Pandol SJ, Porcel J, Wilkens LR, Le Marchand L, Pike MC, Monroe KR. Prospective Study of Alcohol Drinking, Smoking, and Pancreatitis: The Multiethnic Cohort. Pancreas. 2016.-45(6).-P.819–825.
- Ahmed Ali U, Issa Y, Hagenaars JC. Risk of Recurrent Pancreatitis and Progression to Chronic Pancreatitis After a First Episode of Acute Pancreatitis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2016.-14(5).-P.738–746.
- Ockenga J, Strunck S, Post C, Schulz H U, Halangk J, Pfützer R H, Löhr M, Oettle H, Kage A, Rosendahl J, KeimV, Drenth J P, Jansen J B, Lochs H, Witt H. The role of epoxide hydrolase Y 113H gene variant in pancreatic diseases.-Pancreas. 2009.-38(4).-P.97–101.
- Burim RV, Canalle R, Martinelli Ade L, Takahashi CS. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics./ Mutagenesis. 2004.-19(4).-P.291–298.
- Koressar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3// Bioinformatics.-2007.-23.-P.1289–1291.
- Xiang Li, Zheng Hu, Xinshun Qu, Jiadong Zhu, Lin Li, Brian Z. Ring, and Li Su. Putative EPHX1 Enzyme Activity Is Related with Risk of Lung and Upper Aerodigestive Tract Cancers: A Comprehensive Meta-Analysis.-Journal List.-2011.-v.6 (3).-P.147–149.
- Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Daye P, Benhamou S, Hirvonen A (2000). “High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers”. Cancer Res. 60 (3).-P. 534–536.
- Sarmanová J, Sůsová S, Gut I, Mrhalová M, Kodet R, Adámek J, Roth Z, Soucek P (2004). “Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes”. Eur. J. Hum. Genet. 12 (10).-P.848–854.
- Hassett C., Aicher L., Sidhu J. S., Omicinski C. J. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants// Hum. Mol. Genet. –1994. – Vol. 3. – P. 421–428.
- Hassett C., Lin J., Carty C. L. et al. Human hepatic microsomal epoxide hydrolase: comparative analysis of polymorphic expression // Arch. Biochem.Biophys. – 1997. – Vol. 337. – P. 275–283.
- Hosagrahara V.P., Rettie A. E., Hassett C., Omicinski C. J. Functional analysis of human microsomal epoxide hydrolase genetic variants //Chem. Biol. Interact. – 2004. – Vol. 150. – P. 149–159.