

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ II ТИПА

© Бисултанова Зура Исановна (а), Джамбетова Петимат Махмудовна (а, б)
Джамалова Айшат Зеудыевна (с)

(а) Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова, старший преподаватель, г. Грозный.

(б) Комплексный научно-исследовательский институт им. Х.И. Ибрагимова РАН, зав. лабораторией эколого-генетического мониторинга живых систем, доктор биологических наук, petimat-lg@rambler.ru, г. Грозный.

(с) Комплексный научно-исследовательский институт им. Х.И. Ибрагимова РАН, заведующая отделом биологических исследований, кандидат биологических наук, dzhamalovam@list.ru, г. Грозный.

Аннотация. Исследованы ассоциации генотипов глутатион-S-трансфераз (GSTT1, GSTM1 и GSTP1) с сахарным диабетом II (СД II) в этнической группе чеченцев. Максимальный эффект выявлен при комбинации нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 усиливая риск СД II. Нулевой аллель Val гена GSTP1 совместно с GSTT1 и GSTM1 усиливает риск СД II более чем в 5 раз. Важно проводить подобные генетические исследования в различных популяциях для разработки прогностических схем и альтернативных стратегий лечения СД II.

Ключевые слова: полиморфизм генов, глутатион-S-трансферазы, сахарный диабет, чеченская популяция.

GENETIC POLYMORPHISM OF THE SYSTEM OF DETOXIFICATION OF XENOBIOTICS IN TYPE II DIABETES MELLITUS

© Bisultanova Zura Isanovna (a), Dzhambetova Petimat Makhmudovna (a, b)
Dzhamalova Aishat Zeudyevna (c)

(a) Chechen State University named after. A.A. Kadyrov, Grozny.

(b) Complex Research Institute named after. H.I. Ibragimov RAS, Doctor of Biological Sciences, petimat-lg@rambler.ru, Grozny.

(c) Complex Research Institute named after. H.I. Ibragimova RAS, Head of the Department of Biological Research, Candidate of Biological Sciences, dzhamalovam@list.ru, Grozny.

Annotation. Associations of glutathione-S-transferase genotypes (GSTT1, GSTM1 and GSTP1) with diabetes mellitus II (DMII) in the Chechen ethnic group were studied. The maximum effect was detected with a combination of GSTT1 and GSTM1 null genotypes, increasing

the risk of diabetes II. The null allele Val of the GSTP1 gene, together with GSTT1 and GSTM1, increases the risk of diabetes II by more than 5 times. It is important to conduct similar genetic studies in different populations to develop prognostic patterns and alternative treatment strategies for T2DM.

Keywords. Gene polymorphism, glutathione-S-transferase, diabetes mellitus, Chechen population.

ВВЕДЕНИЕ

Глутатион-S-трансферазы (GST) относятся к группе мультигенных и многофункциональных ферментов детоксикации, которые защищают клетки от широкого спектра химических токсикантов и окислительного стресса. Окислительный стресс приводит к клеточной дисфункции, которая способствует патофизиологии таких заболеваний, как рак, атеросклероз и сахарный диабет. Важно оценить, связаны ли генотипы глутатион-S-трансфераз (GSTT1, GSTM1 и GSTP1) с сахарным диабетом 2 типа, поскольку полиморфные варианты этих генов нарушают способность противодействовать окислительному стрессу, который является особенностью диабета [2]. Множество исследований зафиксировали значительные популяционные различия в связи генов и их генетических маркеров с сахарным диабетом.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось исследование характера влияния на риск развития сахарного диабета второго типа генотипов глутатион-S-трансфераз (GSTT1, GSTM1 и GSTP1) в этнической группе чеченцев.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группы исследования включали 162 пациента с установленным диагнозом сахарный диабет II типа и 154 человека контрольной группы. Все участники дали добровольное согласие на участие в настоящем исследовании.

Генотипирование. ДНК экстрагировали из образцов соединительной ткани методом универсальной пробоподготовки. Из одного образца получали 160-180 мкл ДНК аликвоты. Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0. Генотипирование делеций генов GSTT1 и GSM1 проводили с использованием протокола мультиплексной ПЦР с двумя праймерами для каждого гена. Для генотипирования миссенс-мутации GSTP1 Ile/Val использовали две пары праймеров: два внешних и два аллель специфичных. Информация о последовательности олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров приведена в таблице 1.

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидов для генотипирования аллельных форм генов GSTT1, GSTM1 и GSTP1

название гена	5' - 3' последовательность олигонуклеотидов
GSTM-F	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAG C
GSTM1-R	GTTGGGCTCAAATATACGGTGG
GSTT1-F	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC
GSTT1-R	TCACCGGATCATGGCCAGCA
GSTP1-F	CCCAGTGACTGTGTGTTGATCAG
GSTP1-R	CCGTTACTTGGCTGGTTGATGTC

GSTP1-Fm	GACCTCCGCTGCAAATACA
GSTP1-Rm	TTGGTGTAGATGAGGGAGAC

Программу амплификации подбирали эмпирическим путем. Амплифицирование фрагментов ДНК, содержащих исследуемые области, проводили в термоциклере Thermal-Cycler (AppliedBiosystems™). Реакционную смесь, приготовленную в коровых наборах (ООО «ИзогенЛаб», Москва) подвергали денатурации при 94°C в течение 3 мин, с последующими 32 циклами при 94°C в течение 30 сек, при температуре отжига для соответствующих праймеров (61,3°C - 63,3°C) в течение 30 сек, и 62°C в течение 30 сек. Окончательный синтез длился 6 мин, при 72°. Полученные ампликоны подвергались горизонтальному электрофорезу в 1,8 % агарозном геле и визуализировались в проходящем через трансиллюминатор ЕСХ-13М (Франция) ультрафиолете с помощью красителя бромида этидия. Отсутствие делеций в генах GSTM1 и GSTT1 отмечалось наличием фрагментов с длиной 200 и 450 п.н (рис. 1).

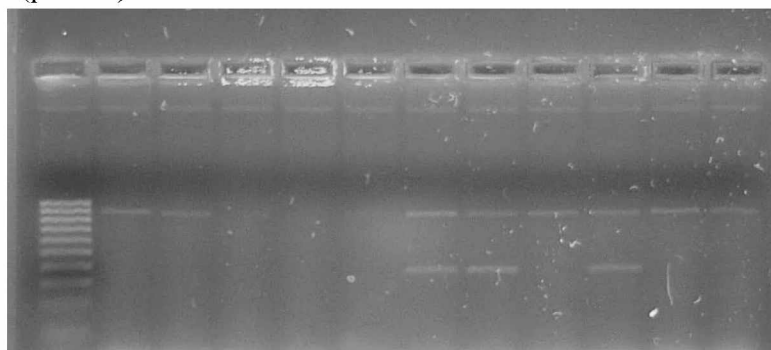


Рис. 1. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов делеционных полиморфизмов генов GSTM1 и GSTT1

Полиморфный вариант гена GSTP1 отмечался тремя фрагментами в одной дорожке на гелевой пластинке, мутантные гомозиготы соответствовали двум фрагментам длиной 420 п.н, гомозиготы дикого типа – фрагментами длиной 270 п.н.

Статистическая обработка. Результаты генотипирования полиморфизмов генов детоксикации пациентов и контрольной группы сравнивались с использованием средних значений и стандартных отклонений. Для расчета значений P использовались два независимых t -критерия для непрерывных переменных и точный критерий Фишера для категориальных переменных. Распределение генотипов сравнивали с использованием анализа χ^2 Пирсона. Генотипы GSTT1 и GSTM1 классифицировались как нулевые (GSTT1*0 или GSTM1*0) или положительные (GSTT1*1 или GSTM1*1).

Для оценки риска СД2 с учетом генотипов вычисляли отношения шансов (ОШ) и 95% доверительные интервалы (ДИ) с помощью программы WinPeri, находящейся в открытом доступе. Ассоциативный анализ проводился с использованием четырех генетических моделей: доминантной, рецессивной, гетерозиготной и гомозиготной модели. Статистическую значимость определяли по значению $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генотипирование полиморфных вариантов генов GSTM1/T1 и GSTP1. В таблице 2 представлены результаты генотипирования: частота генотипов и аллелей GSTM1, T1 и P1, а также их комбинаций для группы пациентов с сахарным диабетом и для контрольной выборки. Нами не было обнаружено достоверных различий в распределении генотипов по полу в группе пациентов и группе контроля. Распределение генотипов GSTP1 среди пациентов с СД2 и контрольной группы соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($p = 0,661$ и $0,266$, соответственно),

В контрольной выборке частота нулевого генотипа GSTT1 составила 20,78%, GSTM1 - 36,36%, В выборке пациентов частота нулевых генотипов GSTT1, и GSTM1 распределилась следующим образом: 30,86 и 48,76%, соответственно. Сравнительный анализ частоты делеционного полиморфизма GSTT1 в двух выборках показывает, что нулевые генотипы среди лиц с сахарным диабетом встречаются значительно чаще, чем среди здоровых ($p = 0,054$). Аналогичная картина наблюдается при сравнительном анализе частоты нулевых генотипов полиморфного варианта гена GSTM1: в группе пациентов этот показатель составляет 48,76%, что существенно, выше по сравнению с контрольной выборкой 36,36%. Однако различия статистически не достоверны ($p = 0,180$). Результаты ассоциативного анализа показывают, что риск развития сахарного диабета повышается у лиц с нулевым генотипом GSTT1: ОШ= 1,70 (95%ДИ 1,02 – 2,84) и 1,34 (95%ДИ 0,89 – 2,01), соответственно.

В гене глутатион-S-трансферазы P1 GSTP1 был исследован самый распространённый полиморфизм A313G (rs1693), определяющий замену изолейцина на валин в кодоне 103. Генотипирование полиморфного варианта GSTP1 выявило три варианта генотипа в обеих выборках: Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val. В группе контроля частота гомозигот Ile/Ile составила 41,56%, в группе лиц с сахарным диабетом - 38,27%. Гетерозиготные носители минорного варианта Ile/Val в контрольной выборке встречались с частотой 57,41%, в выборке пациентов – 52,59%. Частота мутантных гомозигот Val/Val среди здоровых участников составила 5,84%, в то время как среди пациентов гомозиготы по минорному аллелю встречались реже – 4,32%. Корреляционный анализ трех генетических моделей (рецессивной, доминантной, гомозиготной) не выявил значимой связи с риском развития СД2. Вместе с тем нами был отмечен протективный эффект положительного генотипа гена GSTM1 в отношении сахарного диабета в исследованной выборке ($p = 0,031$). Этот эффект существенно возрастал при совместном носительстве гомозиготного генотипа дикого типа гена GSTP1 Ile/Ile.

Нами также были исследованы генетические взаимодействия и возможный аддитивный эффект полиморфизмов генов GSTT1, GSTM1 GSTP1. Обнаружилось, что при одновременном носительстве с нулевых генотипов GSTM1 и GSTT1 риск развития сахарного диабета 2 типа увеличивается в два раза (ОШ = 2,01 при 95%ДИ (1,12 – 3,60)) ($p = 0,022$).

Наконец, мы обнаружили, что нулевые генотипы генов GSTT1, GSTM1 при взаимодействии с гомозиготным генотипом по минорному аллелю полиморфного варианта гена GSTP1 имели значимые различия между группой пациентов с нарушением метаболизма глюкозы и контрольной группой. (значение $p = 0,006$) (табл. 2).

Таблица 2. Распределение генотипов полиморфных вариантов генов GSTT1, GSTM1 GSTP1 у лиц с СД и без него

Ген	Генотип	Пациенты (n=162) (%)	Контроль (n=154) (%)	ОШ (95 % ДИ)	P
GSTT1	Ins/Del	112 (69,14)	122 (79,22)	0,59 0,35 – 0,98	0,054*
	Del/Del	50 (30,86)	32 (20,78)	1,70 (1,02 – 2,84)	0,054*
GSTM1	Ins/Del	83 (51,23)	98 (80,33)	0,60 (0,38 – 0,940)	0,031*
	Del/Del	79 (48,76)	56 (36,36)	1,34 (0,89 – 2,01)	0,180
GSTP1	Ile/Ile	62 (38,27)	64 (41,56)	0,87 (0,56 – 1,37)	0,567
	Ile/Val	93 (57,41)	81 (52,59)	1,19 (0,75 – 1,87)	0,484
	Val/Val	7 (4,32)	9 (5,84)	0,80 0,28 – 2,27	0,793
Два локуса					
GSTT1/ GSTM1	T1(Ins/Del / M1(Ins/Del)	68 (41,97)	71 (46,10)	1,00	0,497
	T1(Ins/Del)) /M1(Del/Del)	54 (33,33)	53 (34,42)	0,95 0,60 – 1,52	0,905
	T1(Del/Del) /M1(Del/Del)	39 (24,06)	21 (13,64)	2,01 (1,12 – 3,60)	0,022*
	T1(Del /Del)) / M1 (Ins /Del)	11 (6,79)	11 (7,14)	0,95 0,40 – 2,25	1,00
GSTT1 и GSTP1	T1(Ins/Del)) и Ile/Ile	42 (25,93)	59 (38,31)	0,56 0,35 – 0,91	0,022*
	T1(Ins/Del)) и Ile/Val	65 (40,12)	54 (35,06)	1,24 (0,79 – 1,96)	0,416
	T1(Ins/Del)) и Val/Val	5 (3,09)	9 (5,84)	0,51 (0,17 – 1,56)	0,281
GSTT1 и GSTP1	T1(Del/Del) и Ile/Ile	21 (19,14)	22 (14,28)	1,42 (0,78 – 2,58)	0,292
	T1(Del/Del) и Ile/Val	14 (8,64)	8 (5,19)	1,73 (0,71 – 4,23)	0,272
	T1(Del/Del) и Val/Val	13 (8,02)	2 (1,29)	6,63 (1,48 – 29,74)	0,006*
GSTM1(+ /+) и GSTP1	M1(Ins/Del) и Ile/Ile	49 (30,25)	66 (42,86)	0,58 (0,36 – 0,92)	0,026*
	M1(Ins/Del) и Ile/Val	29 (17,90)	26 (16,88)	0,94 (0,52 – 1,70)	0,880
	M1(Ins/Del) и	5	6	0,79	0,776

	Val/Val	(3,092)	(3,89)	(0,24 – 2,62)	
GSTM1(–/–) и GSTP1	M1(Del/Del) и Ile/Ile	33 (20,37)	29 (18,83)	1,10 (0,63 – 1,92)	0,778
	M1(Del/Del) и Ile/Val	35 (21,60)	25 (16,23)	1,42 (0,81 – 2,51)	0,252
	M1(Del/Del) и Val/Val	11 (6,79)	2 (1,29)	5,54 (1,21 – 25,27)	0,020*

Нулевой генотип GSTM1 в комбинации с генотипом Val/Val GSTP1 продемонстрировали самый высокий риск (ОШ = 4,12, 93% ДИ 1,11–13,31, $p = 0,032$), однако результаты требуют верификации, так как в контрольной выборке лиц с нулевого генотипа GSTM1 и одновременно гомозиготного по минорному аллелю 103 Val GSTP1 было незначительным (2 контрольных случая против 11 случаев).

ОБСУЖДЕНИЕ

Урбанизация и токсичность окружающей среды увеличивает частоту метаболических нарушений, в частности, при сахарном диабете 2 типа. Соответственно, риск развития СД2 может являться с различными вариантами генотипов, осуществляющих биотрансформацию ксенобиотиков. Глутатион S-трансферазы (GST) представляют собой группу генов, полиморфизмы которых могут ухудшать способность человека защищаться от окислительного стресса и повышать восприимчивость к хроническим заболеваниям, таким как диабет [4, 5].

В этом исследовании нами были проанализированы полиморфизмы GSTT1, GSTM1 и GSTP1 в связи с СД2 у 162 пациентов и 154 здоровых лиц контрольной выборки, проживающих в Чеченской Республике.

GSTT1 и GSTM1 являются наиболее распространенными полиморфизмами ферментов GST, имеющими серьезные этнические различия в человеческих популяциях, и они изучены наиболее широко. Гомозиготные минорные генотипы по генам GSTT1 и GSTM1 приводят к отсутствию функционально активных форм фермента. Делеция 30 кб встречается в нулевом генотипе GSTT1, частота которого составляет от 11% до 48% в разных популяциях, тогда как делеция 13 кб встречается в нулевом генотипе GSTM1, частота которого в популяции составляет от 20% до 60%. [1].

В нескольких исследованиях сообщалось, что минорный аллель гена GSTM1 выявляется в основном у пациентов, что предполагает больший риск развития СД2, что подтверждает гипотезу о том, что нулевой генотип снижает антиоксидантную способность, что приводит к повреждению клеток из-за действия. Однако последний метаанализ Liu LS и др. (2022), целью которого исследование наличия связи и достоверность статистически значимых связей между полиморфизмами GSTM1, GSTT1 и GSTP1 с риском СД2 показал отсутствие таковой [3].

Настоящее исследование показывает, что общий наблюдаемый диапазон частоты генотипов GSTM1, GSTT1 и GSTP1 в контрольной популяции был сопоставим с частотой генотипов указанных генов во многими европейскими популяциями (табл. 2). Поиск ассоциаций между полиморфными вариантами генов группы GST и риском развития сахарного диабета второго типа у жителей ЧР обнаружил наличие связи как отдельных вариантов

отдельных генов, так и их комбинированное влияние. При этом наиболее сильный эффект обнаруживался для лиц, несущих комбинацию нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 (ОШ = 2,96 (при 95%ДИ 1,46 -3,96, $p < 0,002$), показывая, что комбинированный эффект двух нулевых аллелей является более высоким фактором риска для диабета. Вместе с тем, нулевой аллель Val гена GSTP1 совместно с нулевым генотипом GSTT1 и GSTM1 усиливает риск развития сахарного диабета (II) более чем в 5 раз. Тогда как положительные генотипы защищают организм от окислительного стресса и, соответственно, снижают риск развития СД2. Эти различия во вкладе полиморфизмов в риск развития СД2 могут быть связаны с происхождением, географической изоляцией, испытываемой этнической популяцией, а также с их пищевыми привычками и образом жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что одним из факторов развития СД2 является окислительный стресс, а ферменты глутатион S-трансфераз снижают уровень активных форм кислорода. Однако, исследования по изучению ассоциаций глутатион-S-трансфераз и риска развития сахарного диабета 2 типа для разных популяций дают противоречивый результат. Существуют значительные различия среди различных этнических групп населения по всему миру. Поэтому крайне важно проводить такие генетические исследования в различных популяциях, чтобы разработать прогностические схемы и альтернативные стратегии лечения этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amer MA, Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. /Amer MA, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, Abou-El-Ela SH //Genet Mol Res.2012 - №10.– P.3722–3730.
2. Li Y, Association of GSTs polymorphisms with risk of gestational diabetes mellitus. /Li Y, Li S, Zhai Q, Hai J, Wang D, Cao M, Zhang Q. //Int J Clin Exp Pathol. 2013 - №8(11). – P.13191-13196
3. Liu LS, Individual and combined effects of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms on type 2 diabetes mellitus risk: A systematic review and meta-analysis. /Liu LS, Wang D, Tang R, Wang Q, Zheng L, Wei J, Li Y, He XF. //Front Genet. 2022 - №7(13). – P.959-291.
4. Mastana S.S., Influence of glutathione S-transferase polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) on type-2 diabetes mellitus (T2D) risk in an endogamous population from north India. /Mastana S.S., Kaur, A., Hale, R. et al. //Mol Biol Rep.2013-№40.– P.7103–7110.
5. Stoian A, Influence of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms on Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Sensorimotor Peripheral Neuropathy Risk. /Stoian A, Bănescu C, Bălașa RI, Moțățianu A, Stoian M. Moldovan VG, Voidăzan S, Dobreanu M, //Dis Markers. 2013 - №23.– P.648-694.

REFERENCES

1. Amer MA, Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. /Amer MA, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, Abou-El-Ela SH //Genet Mol Res.2012 - №10 .– P.3722–3730.

2. Li Y, Association of GSTs polymorphisms with risk of gestational diabetes mellitus. /Li Y, Li S, Zhai Q, Hai J, Wang D, Cao M, Zhang Q. //Int J Clin Exp Pathol. 2013 - №8(11). – P.13191-13196.

3. Liu LS, Individual and combined effects of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms on type 2 diabetes mellitus risk: A systematic review and meta-analysis. /Liu LS, Wang D, Tang R, Wang Q, Zheng L, Wei J, Li Y, He XF. //Front Genet. 2022 - №7(13). – P.959-291.

4. Mastana S.S., Influence of glutathione S-transferase polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) on type-2 diabetes mellitus (T2D) risk in an endogamous population from north India. /Mastana S.S., Kaur, A., Hale, R. et al. //Mol Biol Rep.2013-№40.– P.7103–7110.

5. Stoian A, Influence of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms on Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Sensorimotor Peripheral Neuropathy Risk. /Stoian A, Bănescu C, Bălașa RI, Moțățianu A, Stoian M. Moldovan VG, Voidăzan S, Dobreanu M, //Dis Markers. 2013 - №23.– P.648-694.