

## REFERENCES

- Alan H.B. Tietz clinical guide to laboratory tests. Moscow: Labora; 2013. (in Russian)
- Kazakova M.S., Lugovskaya S.A., Dolgov V.V. Reference interval of indicators of the total blood analysis of the adult working population. *Clinical laboratory diagnostics. Russian journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2012; 6: 43–9. (in Russian)
- Kishkun A.A. *Guide to laboratory methods of diagnostics*. Moscow: GEOTAR-media; 2007. (in Russian)
- Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. Value of unripe granulocytes in diagnostics of infectious and inflammatory processes at cardiac patients. *Clinical laboratory diagnostics. Russian journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 5: 25–40. (in Russian)
- Shaw J.L., Cohen A., Konforte D., Binesh-Marvasti T., Colantonio D.A., Adeli K. Validity of establishing pediatric reference intervals based on hospital patient data: a comparison of the modified Hoffmann approach to CALIPER reference intervals obtained in healthy children. *Clin. Biochem.* 2014; 47(3): 166–72. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.008.
- Ridefelt P., Hellberg D., Aldrimer M., Gustafsson J. Estimating reliable pediatric reference intervals in clinical chemistry and haematology. *Acta Paediatr.* 2014; 103(1): 10–5. doi: 10.1111/apa.12438.
- Sinclair L., Hall S., Badrick T. A survey of Australian haematology reference intervals. *Pathology*. 2014; 46(6): 538–43. doi: 10.1097/PAT.0000000000000148.
- Bosco Gahutu J. Clinical chemistry reference intervals in a Rwandan population. *Br. J. Medicine Medical Res.* 2013; 3(3): 532–42. doi: 10.9734/bjmmr/2013/2741.
- Henry E., Christensen R.D. Reference intervals in neonatal hematology. *Clin. Perinatol.* 2015; 42(3): 483–97. doi: 10.1016/j.clp.2015.04.005.
- Zierk J., Arzideh A., Haecckel R., Rascher W., Rauh M., Metzler M. Indirect determination of pediatric blood count reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(4): 863–72. doi: 10.1515/cclm-2012-0684.
- Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. CLSI C28-A3. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008. Available at: <http://www.clsi.org>
- Bertholf R.L. Statistical methods for establishing and validating reference intervals. *Lab. Medicine*. 2006; 37(5): 306–10. doi:10.1309/cbmn-prfn-lu1x-a4xv.
- Bolann B.J. Easy verification of clinical chemistry reference intervals. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(11): e279–81. doi:10.1515/cclm-2013-0356.
- Daly C.H., Liu X., Grey V.L., Hamid J.S. A systematic review of statistical methods used in constructing pediatric reference intervals. *Clin. Biochem.* 2013; 46(13–14): 1220–27. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.05.058.
- Blankenstein M.A. Reference intervals – eves met a normal person? *Ann. Clin. Biochem.* 2015; 52(Pt 1): 5–6. doi: 10.1177/0004563214561503. Available at: <http://www.acb.sagepub.com>
- Katayev A., Balciza C., Seccombe D.W. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results: is there a better way? *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(2): 180–6. doi: 10.1309/ajcpn5bmtsf1edyp.
- Horowitz G.L. Estimating reference intervals. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 133(2): 175–7. doi: 10.1309/AJCPQ4N7BRZQVHAL.
- Petrova O.V., Tarasov D.G., Zakharova L.R. Experience of introduction of LIS PSM in cliniko-diagnostic laboratory. *Poliklinika*. 2011; 4(2): 36–7. (in Russian)
- Melzer S., Zachariae S., Bocsi J., Engel C., Loffler M., Tarnok A. Reference intervals for leukocyte subsets in adults: Results from a population-based study using 10-color flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2015; 88(4): 270–81. doi: 10.1002/cyto.b.21234.
- Lim E.M., Cembrowski G., Cembrowski M., Clarke G. Race-specific WBC and neutrophil count reference intervals. *Int. J. Lab. Hematol.* 2010; 32(6, Pt 2): 590–7. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01223.x.
- Kazakova M.S., Lugovskaya S.A. Reference interval of indicators of the total blood analysis at use of the automatic hematologic analyzer. *Clinical laboratory diagnostics. Russian journal (Klinicheskaya laboratornaya diagnostika)*. 2014; 9: 10–1. (in Russian)

Поступила 23.11.15  
Принята к печати 12.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.153.979.733-036.11-092:612.015.341:575.08

Лучинина Ю.А.<sup>1</sup>, Гончарова М.В.<sup>1</sup>, Сурин В.Л.<sup>1</sup>, Иващенко Т.Э.<sup>2</sup>,  
Пустовойт Я.С.<sup>1</sup>, Карпова И.В.<sup>1</sup>, Кравченко С.К.<sup>1</sup>

## АССОЦИАЦИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ С КЛИНИЧЕСКИМ ПРОЯВЛЕНИЕМ ОСТРОЙ ПЕРЕМЕЖАЮЩЕЙСЯ ПОРФИРИИ

<sup>1</sup>ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», 199034, г. Санкт-Петербург, Россия

Острая перемежающаяся порфирия (ОПП) обусловлена частичным дефицитом порфобилиноген-дезаминазы (ПБГД), одного из ферментов цепи биосинтеза гема. Пенетрантность мутантного гена ПБГД невысока и составляет в среднем 10–15%. Какие-либо дополнительные генетические факторы, сочетание которых с мутантным аллелем гена ПБГД приводит к клиническому проявлению ОПП, в настоящее время не известны. Изучена возможная ассоциация аллельных вариантов генов фазы 1: *CYP1A1* (A2455G), *CYP2E1* (G-1259C) и четырех генов фазы 2: *NAT2* (C481T, G590A G857A), *mEPHX1*: Tyr113His – 3-й экзон, His139Arg – 4-й экзон, *GSTM1* (Del), *GSTT1* (Del) с клиническим проявлением ОПП. Установлено, что гомозиготное носительство «быстрого» аллеля гена ацетилтрансферазы (генотип N/N) ассоциировано с латентным течением заболевания. Сочетание «функционально ослабленных» генотипов глутатион-трансфераз класса T и M (*GSTT10/0*, *GSTM10/0*) можно рассматривать как неблагоприятный генетический фактор, связанный с клиническим проявлением ОПП. Сравнительный анализ частот генотипов и полиморфных аллелей генов *CYP1A1*, *CYP2E1* и *mEPHX1* не выявил статистически значимых различий между выборками больных ОПП и асимптомных носителей заболевания.

К л ю ч е в ы е с л о в а : острые печеночные порфирии; acute porphyria hepatica; система детоксикации; бессимптомное носительство генетических заболеваний.

Для цитирования: Лучинина Ю.А., Гончарова М.В., Сурин В.Л., Иващенко Т.Э., Пустовойт Я.С., Карпова И.В., Кравченко С.К. Ассоциация аллельных вариантов генов системы детоксикации с клиническим проявлением острой перемежающейся порфирии. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 156–160. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-156-160

Luchinina Yu.A.<sup>1</sup>, Goncharova M.V.<sup>1</sup>, Surin V.L.<sup>1</sup>, Ivashchenko T.E.<sup>2</sup>, Pustovoyt Ya.S.<sup>1</sup>, Karpova I.V.<sup>1</sup>, Kravchenko S.K.<sup>1</sup>

## ASSOCIATION OF ALLELIC VARIANTS OF GENES OF DETOXIFICATION SYSTEM WITH CLINICAL PRESENTATION OF ACUTE INTERMITTENT PORPHYRIA

<sup>1</sup>National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;

<sup>2</sup>The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology n.a. D.O. Ott, St-Petersburg, 199034, Russian Federation

Acute intermittent porphyria (AIP) is caused by the partial deficiency of porphobilinogen deaminase (PBGD), one of the enzymes of the heme biosynthetic pathway. The penetrance of the mutant gene PBGD is not high and averages of 10–15%. Any additional genetic factors, the combination of which with the mutant allele of the PBGD gene leads to the clinical manifestation of AIP is not currently known. The eventual associations of allelic variants

of genes of the Phase 1: *CYP1A1* (A2455G), *CYP2E1* (G1259C) and four genes of the phase 2: *NAT2* (C481T, G590A G857A), *mEPHX1*: Tyr113His – 3rd exon, His139Arg – 4th exon, *GSTM1* (Del), *GSTT1* (Del) with clinical presentation of AIP were investigated. Homozygous carriership of the “fast” allele of the acetyltransferase gene (genotype N/N) was established to be associated with a latent course of the disease. The combination of “functionally weakened” genotypes of glutathione transferase (class t~) and class M (*GSTT10/0*, *GSTM10/0*) can be considered as an unfavorable genetic factor related with the clinical presentation of AIP. Comparative analysis of the frequencies of genotypes and polymorphic alleles of genes *CYP1A1*, *CYP2E1* and *mEPHX1* revealed no statistically significant differences between the samples of patients with AIP and asymptomatic carriers of the disease.

**Key words:** acute porphyria hepatica; detoxification system; asymptomatic carriers of genetic diseases.

**For citation:** Luchinina Yu.A., Goncharova M.V., Surin V.L., Ivashchenko T.E., Pustovoyt Ya.S., Karpova I.V., Kravchenko S.K. Association of allelic variants of genes of detoxification system with clinical presentation of acute intermittent porphyria. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(3): 156-160. (in Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-156-160

**Funding.** Present study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Basic Research “Molecular genetic mechanisms of the pathogenesis of acute hepatic porphyria” (project No 09-04-00456).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 31 March 2016

Accepted 17 July 2016

Острая перемежающаяся порфирия (ОПП) – редкое наследственное заболевание, обусловленное дефицитом фермента порфириногендезаминазы (ПБГД), катализирующего 3-ю стадию цикла биосинтеза гема. Клинически ОПП чаще всего проявляется после достижения пубертатного возраста. В мире известны единичные случаи заболевания детей, и все они связаны с гомозиготностью или смешанной гетерозиготностью (компаунды) по дефектному гену [1], в то время как взрослые за редчайшими исключениями являются гетерозиготными носителями. Заболевание имеет приступообразное течение, провоцируемое одним или сочетанием нескольких порфириногенных факторов экзогенной или эндогенной природы. К ним относят алкоголь, некоторые лекарственные препараты (нестероидные противовоспалительные, барбитураты, сульфаниламиды и др.), репродуктивная функция у женщин, инсоляция, гипогликемия, бактериальные и вирусные инфекции (например, гепатит). Своевременная точная диагностика и адекватная терапия позволяют спасти подавляющее большинство больных. В период развернутых острых проявлений заболевания, как правило, удается установить правильный диагноз ОПП, основываясь на клинических признаках и биохимической диагностике. Что же касается асимптомных носителей, то для них даже биохимическая диагностика, основанная на измерении активности ПБГД в эритроцитах, далеко не всегда дает однозначный ответ на вопрос о носительстве заболевания, поскольку диапазоны уровней активности фермента у таких пациентов перекрываются с нормальными значениями. Поэтому особое значение приобретает молекулярно-генетическое исследование, позволяющее выявлять латентных, асимптомных носителей дефектного гена, потенциально имеющих риск развития клинической стадии заболевания.

ОПП, имея доминантный характер наследования, характеризуется невысокой пенетрантностью (по максимальным оценкам до 10–15%), свидетельствующей о том, что мутация в гене *ПБГД* является необходимым, но недостаточным условием клинического проявления болезни, основная тяжесть которого связана не с дефицитом продукта ферментативной реакции, катализируемой ПБГД, а с накоплением избытка токсичного субстрата-предшественника. Поскольку снижение активности ПБГД на 50% за счет мутантного аллеля не является достаточным основанием для образования патологического фенотипа, должны существовать какие-то дополнительные генетические факторы, предопределяющие клиническое проявление ОПП у гетерозиготных носителей мутантного гена. Интенсивные исследования в области молекулярной генетики острых порфирий ведутся во многих странах мира. Однако многие авторы отмечают неполноценность современного медико-генетического консультирования острых порфирий из-за невозможности дифференцированного подхода к асимптомным носителям заболевания и выделения среди них каких-либо групп риска. Это обусловлено

отсутствием информации о дополнительных генетических факторах, сонаследующихся с мутантными генами и принципиально влияющих на патогенез заболевания. Такие факторы в настоящее время обнаружены только для двух доминантно наследуемых порфирических нозологий, не относящихся к острым порфириям, – эритропротической протопорфирии (ЭПП) и поздней кожной порфирии (ПКП) [2]. Для ЭПП показана определяющая роль в формировании клинического фенотипа сонаследования мутантного гена феррохелатазы с полиморфным аллелем этого же гена дикого типа (полиморфизм T/C в позиции 48 интрона 3), в котором активирован криптический акцепторный сайт сплайсинга, генерирующий aberrantную лабильную мРНК [3, 4]. Для ПКП показано участие в патогенезе совместного наследования мутантных аллелей основного гена уропорфириногендекарбоксилазы и распространенного мутантного варианта *C282Y* гемохроматозного гена *HFE* [5], а также полиморфизма *Thr461Asp* в гене *CYP1A1* [6] и генотипа A/A по C/A-полиморфизму в интроне 1 гена *CYP1A2* [7]. Ни для одной из острых печеночных порфирий, к которым, кроме ОПП, относят врожденную копропорфирию и вариегатную порфирию, никаких дополнительных генетических факторов не выявлено.

Как уже говорилось выше, для развития клинической картины ОПП помимо наличия мутации в гене *ПБГД* необходимо воздействие по крайней мере одного из ряда провоцирующих факторов, имеющих экзогенную или эндогенную природу. При этом порфириногенные факторы столь многочисленны и разнообразны, что любой человек сталкивается с теми или иными из них достаточно часто. Поэтому объяснить асимптомное носительство ОПП, которое может продолжаться в течение всей жизни человека, тем, что он с этими факторами не сталкивался, вряд ли возможно. По всей вероятности, в случае ОПП, так же как для ЭПП и ПКП, помимо наличия основной мутации в гене *ПБГД* должны существовать дополнительные генетические детерминанты, влияющие на развитие заболевания. Ранее нами было показано, что пенетрантность ОПП не связана с механизмом сонаследования мутантного и функционально ослабленного аллелей гена *ПБГД* [8]. В различных исследованиях последних лет показано, что практически все широко распространенные заболевания, включая почти 90% от всех онкологических заболеваний, в той или иной степени связаны с неблагоприятными внешними факторами. В зависимости от особенностей генома разные индивидуумы могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам [9, 10]. Поскольку провоцирующими факторами клинического проявления ОПП являются многие лекарственные препараты, химические вещества, алкоголь, в детоксикации которых принимают участие различные ферменты, мы предположили, что изучение полиморфизмов генов системы детоксикации поможет объяснить очевидные индивидуальные различия в отношении пенетрантности заболевания.

Кроме этого, исследование полиморфизмов генов детоксикации представляется целесообразным, если учитывать тот факт, что клинический фенотип заболевания проявляется вследствие накопления избытка порфиринов и их предшественников в организме человека, которые, возможно, могут являться эндогенными субстратами для ферментов, задействованных в системе детоксикации.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния функциональных полиморфизмов двух генов фазы 1 системы детоксикации (*CYP1A1*, *CYP2E1*) и четырех генов фазы 2 (*NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*) на клиническое проявление ОПП. Выбор такого спектра генов системы детоксикации определялся широким диапазоном действия кодируемых ими ферментов и их активным

#### Для корреспонденции:

Сурин Вадим Леонидович, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия. E-mail: vadsurin@mail.ru.

#### For correspondence:

Surin Vadim L., senior researcher of the Laboratory of Genetic Engineering, National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: vadsurin@mail.ru.

#### Information about authors:

Luchinina Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-9854-4991>; Goncharova M.V., <http://orcid.org/0000-0003-1741-224X>; Surin V.L., <http://orcid.org/0000-0002-1890-4492>; Ivashchenko T.E., <http://orcid.org/0000-0002-5133-5543>; Pustovoyt Ya.S., <http://orcid.org/0000-0003-1618-6981>; Karpova I.V., <http://orcid.org/0000-0003-0924-2957>; Kravchenko S.K., <http://orcid.org/0000-0001-9086-8521>.

Таблица 1

**Праймерные системы и рестрикционные эндонуклеазы, использованные для исследования генов детоксикации**

Ген	Полиморфизм	Сочетание праймеров	Размер ПЦР-продукта	Эндонуклеаза, рестрикции
<i>CYP1A1</i>	A2455G (Ile462Val)	F:GAACTGCCACTTCAGCTG TCT/R:GAAAGACCTCCCAGCGGTCA	187 пн	Hinc II
<i>CYP2E1</i>	G(-1259)C	D:CCAGTCGAGTCTACATTGTCA/R:TTCATTCTGTCTTCTAACTGG	410 пн	RsaI
<i>NAT2</i>	C481T (Leu 161 Phe) G590A (Arg 197 Gln) G857A (Gly 286 Glu)	F:GCTGGGTCTGGAAGCTCCTC/R:TTGGGTGATACATACACAAGGG	547 пн 547 пн 547 пн	KpnI TaqI BamHI
<i>mEPHX1</i> экзон 3	T337C (Tyr113His)	F:GATCGATAAGTTCCTGTTTACC/R:ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT	162 пн	EcoR V
<i>mEPHX1</i> экзон 4	A415G (His139Arg)	F:ACATCCACTTCATCCACGT/R:ATGCCTTGAGAAGCCAT	210 пн	Rsa I
<i>GSTM1</i>		F:GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC/R:GTTGGGCTCAAATATACGGTGG	271 пн	
<i>GSTT1</i>		F:TTCCTTACTGGTCTCACATCTC/R:TCACCGGATCATGGCCAGCA	315 пн	

вовлечением в детоксикацию многих агентов экзогенной (промышленные загрязнения, фармакологические препараты, алкоголь) и эндогенной (гормоны, вирусные инфекции) природы.

**Материал и методы**

В исследование включены 60 больных ОПП и 36 асимптомных носителей заболевания. Образцы ДНК выделяли из ядерных клеток периферической крови после селективного лизиса эритроцитов 0,8% раствором хлорида аммония по стандартной методике, включающей обработку додецилсульфатом натрия (0,5%) и протеиназой К (200 мкг/мл) в течение 16–18 ч при температуре 37°C с последующей фенольной экстракцией. Полученные образцы ДНК использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для последующего анализа полиморфизмов генов системы детоксикации: *CYP1A1*, *CYP2E1*, *NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1* и *GSTT1*. ПЦР проводили в стандартной смеси (25 мкл), содержащей 20 мМ трис-НСl, рН 8,9, 15 мМ сульфат аммония, 170 мкг/мл BSA, смесь dNTP (200 мкМ по каждому), 2 мМ хлористый магний, по 15 пмоль каждого из праймеров (табл. 1) и 2 ед. активности Taq-полимеразы ("Promega", США).

На основе данных, полученных методом ПЦР, была изучена частота гомозигот по нулевому аллелю *GSTM1* и *GSTT1* среди больных ОПП и асимптомных носителей мутаций. Наличие нормального аллеля «+» определялось присутствием на электрофореграммах продукта амплификации размером 271 пн для *GSTM1* и фрагмента 315 пн для *GSTT1*. Отсутствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивидуума по делециям. Гомозиготы (+/+) и гетерозиготы (0/+) в наших экспериментах не различались. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена *CYP1A1*.

Для определения полиморфных вариантов генов *NAT2*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *mEPHX1* продукты ПЦР подвергали рестриktionному анализу, который проводили в реакционной смеси (10 мкл), содержащей 5 мкл ПЦР-смеси, 1 мкл 10-кратного буфера, поставляемого вместе с ферментом, 3 мкл воды и 2 ед. активности соответствующей рестриktionной эндонуклеазы (см. табл. 1) фирмы «Сибэнзим» в объеме 1 мкл. Продукты гидролиза анализировали при помощи электрофореза (ЭФ) в 6% ПААГ. Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в ЗАО «Синтол» (Москва).

Для статистического анализа использовали стандартный метод  $\chi^2$  (пакет программного обеспечения Statistica version 6.0, "Stat-Soft", США).

**Результаты**

**Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы 1 системы детоксикации ксенобиотиков**

**Ген *CYP1A1*.** Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфизма A2455G (Ile462Val) гена *CYP1A1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ) между изученными группами. Частоты аллелей S (Val462) и N (Ile 462) составили: 6,7 и 93,3% у больных ОПП 3,3 и 96,7% в группе асимптомных носителей. Частоты генотипов S/S, S/N и N/N составили: 0; 13,4 и 86,6% у больных ОПП; 0; 6,7 и 93,3% в группе асимптомных носителей.

**Ген *CYP2E1*.** Вместе с тем сравнительный анализ частот генотипов и аллелей (-1259)G/C полиморфизма гена *CYP2E1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ). Частоты аллелей C1 (-1259G) и C2 (-1259C) составили: 3,3 и 96,7% у больных ОПП; 5 и 95% в группе асимптомных носителей. Частоты генотипов C1/C1, C1/C2 и C2/C2 составили: 0; 6,7 и 93,3% у больных ОПП; 0; 10 и 90% в группе асимптомных носителей.

**Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков**

**Ген *NAT2*.** Мы провели анализ четырех полиморфных вариантов гена *ариламин-N-ацетилтрансферазы (NAT2)*: одного

«быстрого» (нормального) N-аллеля и трех «медленных» (S)-аллелей, приводящих к снижению ферментативной активности белка: C481T (аллель S1), G590A (аллель S2) и G857A (аллель S3).

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов гена *NAT2* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей нам удалось выявить статистически значимые различия в частотах генотипов N/N и N/S ацетилтрансферазы ( $\chi^2 = 5,3518$ ;  $p = 0,0207$  и  $\chi^2 = 4,3689$ ;  $p = 0,0366$  соответственно) (табл. 2).

Следует отметить, что в нашу группу асимптомных носителей также вошли люди до 45 лет и дети, у которых возможно клиническое развитие заболевания в будущем, и это могло отразиться на правильности интерпретации полученных нами результатов. Опираясь на тот факт, что клинически ОПП обычно проявляется после пубертатного возраста и у возрастных носителей (старше 45 лет) первично манифестирует крайне редко, мы разграничили группу асимптомных носителей по возрастному критерию, разбив первоначальную выборку на две подгруппы. К 1-й подгруппе мы отнесли людей старше 45 лет, ко 2-й подгруппе – до 45 лет (см. табл. 2). При сравнении этих подгрупп с группой больных ОПП мы обнаружили статистически значимые различия в распределении генотипа N/N между подгруппой асимптомных носителей, возраст которых старше 45 лет, и группой больных ОПП ( $p = 0,0290$ ,  $\chi^2 = 4,7676$ ). Отсутствие статистически значимых результатов в случае распределения генотипа N/S объясняется, по всей вероятности, резким сокращением исследуемой выборки (в 2 раза) при разбиении группы асимптомных носителей по возрастному критерию. Ко 2-й подгруппе («старшей») относятся 4 из 5 человек, имеющих генотип N/N, и только 1 женщина 36 лет оказалась в 1-й («младшей») подгруппе (см. табл. 2). У этой женщины больными являются ее мать и младшая сестра, имеющие генотип N/S ариламин-N-ацетилтрансферазы. Среди 60 больных ОПП генотип N/N встретился всего один раз у пожилой женщины, пережившей в молодости единственный приступ заболевания.

**Ген *mEPHX1*.** При анализе частот аллелей и генотипов полиморфизма Tug113His гена *микросомальной эпоксигоксиоразы (mEPHX1)* в подгруппах асимптомных носителей были получены следующие результаты: частоты аллелей S (113His) и N (113Tyr) составили 30 и 70% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет, 26,3 и 73,6%

Таблица 2

**Частоты генотипов и аллелей ариламин-N-ацетилтрансферазы (ген *NAT2*) у больных ОПП и асимптомных носителей**

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП			
	n	%	n	%	старше 45 лет		до 45 лет	
N/N	1	1,7	5	13,9	4	23,5	1	5,3
N/S	34	58,6	13	36,1	6	35,3	7	36,8
S/S	23	39,7	18	50	7	41,2	11	57,9
Всего ...	58	100	36	100	17	100	19	100
Аллель:								
N	36	31	25	35,7	14	41,2	9	23,7
S	80	69	45	64,3	20	58,8	29	76,3

Таблица 3

Частоты генотипов *GSTT1 0/0* и *GSTM1 0/0* у больных ОПП и асимптомных носителей

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП			
	n	%	n	%	старше 45 лет		до 45 лет	
					n	%	n	%
<i>GSTT1 0/0</i>	12	19,35	3	8,3	1	5,9	2	10,5
<i>GSTT1+</i>	50	80,65	33	91,7	16	94,1	17	89,5
<i>GSTM1 0/0</i>	31	50	17	47,2	8	47,1	9	47,4
<i>GSTM1+</i>	31	50	19	52,8	9	52,9	10	52,6
Всего...	62	100	36	100	17	100	19	100

для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет, 37,1 и 62,9% для больных ОПП; частоты генотипов S/S, S/N и N/N в подгруппах составили: 6,6; 46,7 и 46,7% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет; 10,5; 31,6 и 57,9% для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет; 15,5; 43,2 и 41,3% для больных ОПП. Статистически значимых различий не выявлено ( $c^2 = 1,487$ ;  $p > 0,05$ ).

Также не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами больных ОПП и асимптомных носителей при сравнении частот генотипов и аллелей полиморфизма His139Arg микросомальной эпоксидагидролазы ( $c^2 = 5,032$ ;  $p > 0,05$ ). Частоты аллелей F(139His) и N(139Arg) составили 17,6 и 82,4% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет; 18,4 и 81,6% для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет; 19,7 и 80,3% для больных ОПП; частоты генотипов F/F, F/N и N/N в подгруппах составили: 5,9; 23,5 и 70,6% для асимптомных носителей ОПП старше 45 лет; 5,3; 26,3 и 68,4% для асимптомных носителей ОПП младше 45 лет; 0; 39,3 и 60,7% для больных ОПП.

**Гены *GSTT1* и *GSTM1*.** Сравнительный анализ частоты делеций (0/0) генов *GSTT1* и *GSTM1* между группой больных ОПП и разными группами асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий ( $c^2 = 0,6621$ ;  $p > 0,05$  и  $c^2 = 0,001571$ ;  $p > 0,05$  соответственно). Результаты анализа частот встречаемости гомозигот *GSTT1 0/0* и гомозигот *GSTM1 0/0* у больных ОПП и асимптомных носителей представлены в табл. 3.

Также мы провели анализ по сочетанному распределению нормальных и мутантных аллелей генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных ОПП и асимптомных носителей. Все индивидуумы были разделены на четыре группы: 1) генотипы *GSTT1+*, *GSTM1+*; 2) генотипы *GSTT1+*, *GSTM1 0/0*; 3) генотипы *GSTT1 0/0*, *GSTM1+*; 4) генотипы *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0* (табл. 4). При этом у 6 человек с сочетанием генотипов *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0*, был известен провоцирующий порфириногенный фактор, из них у 3 это были лекарства, у 1 – инфекция, у 1 – красители, и только у 1 пациентки болезнь была вызвана менструальной функцией. Однако мы не обнаружили статистически значимых различий между выборками больных и асимптомных носителей ОПП при сравнении возможных комбинаций данных генотипов ( $c^2 = 1,403$ ;  $p > 0,05$ ).

## Обсуждение

Ассоциация пенетрантности ОПП и частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы I системы детоксикации ксенобиотиков: *CYP1A1* и *CYP2E1*

Цитохромы P450 играют важную роль в метаболизме порфиринов и, следовательно, могут влиять на патогенез печеночных порфирий. Возможная роль полиморфных вариантов генов, кодирующих арилуглеводородкарбоксылазу (*CYP1A1*) и микросомальную монооксигеназу (*CYP2E1*), заключается в том, что они могут индуцировать манифестацию ОПП посредством изменяющейся ферментативной активности с наиболее высоким производством реактивных интермедиатов, ингибирующих порфобилиногендезаминазу.

Арилуглеводородкарбоксылаза, кодируемая геном *CYP1A1*, участвует в метаболизме многих лекарственных средств, полициклических ароматических углеводородов и эстрогенов, осуществляя гидроксилирование эстрадиола, что приводит к его активации [11]. Однако сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфизма A245G (Phe462Val) гена *CYP1A1* между выборками больных ОПП и асимптомных носителей не выявил статистически значимых различий между изученными группами, что позволяет предположить отсутствие ассоциации между данным геном и клиническим проявлением ОПП.

В свою очередь изофермент цитохрома P450 (*CYP2E1*) является ключевым в микросомальной этанолаксилирующей системе

Таблица 4

Частоты сочетаний генотипов *GSTT1* и *GSTM1* у больных ОПП и асимптомных носителей

Генотип	Больные ОПП		Асимптомные носители ОПП		Асимптомные носители ОПП			
	n	%	n	%	старше 45 лет		до 45 лет	
					n	%	n	%
<i>GSTT1+</i> , <i>GSTM1+</i>	25	40,3	16	44,4	8	47,1	8	42,1
<i>GSTT1+</i> , <i>GSTM1 0/0</i>	25	40,3	17	47,2	8	47,1	9	47,4
<i>GSTT1 0/0</i> , <i>GSTM1+</i>	6	9,7	3	8,4	1	5,8	2	10,5
<i>GSTT1 0/0</i> , <i>GSTM1 0/0</i>	6	9,7	0	0	0	0	0	0
Всего...	62	100	36	100	17	100	19	100

(МЭОС) и экспрессируется главным образом в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов [12]. Показано, что МЭОС метаболизирует четверть этанола, поступающего в организм [13]. Различные исследования, посвященные анализу полиморфных вариантов гена *CYP2E1*, показывают индивидуальные и популяционные различия в чувствительности (толерантности) к алкоголю [14]. Исследование полиморфизмов данного гена в нашем случае представляло интерес, поскольку алкоголь, который является субстратом для *CYP2E1*, может провоцировать клиническую манифестацию ОПП. Наши предположения о возможной ассоциации данного гена с пенетрантностью ОПП не оправдались, как и в предыдущем случае, полиморфизм гена *CYP2E1* оказался неинформативным (различия частот генотипов и аллелей по данному гену между выборками больных ОПП и асимптомных носителей были статистически незначимы).

Ассоциация пенетрантности ОПП и частот аллелей и генотипов генов ферментов фазы 2 системы детоксикации ксенобиотиков: *NAT2*, *mEPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*

Полученные данные дают основание предполагать, что генотип N/N арилмин-N-ацетилтрансферазы (ген *NAT2*) может служить фактором благоприятного прогноза в предсказании пенетрантности ОПП.

Эпоксидагидролазы (ген *mEPHX1*) осуществляют промежуточный этап детоксикации, присоединяя воду к образованным цитохромом P450 эпоксидам, превращающимся в трансгидродиоли и далее, под действием других ферментов, в конъюгаты с глюкуроновой кислотой и глутатионом [12, 15]. Различный уровень ферментативной активности обусловлен однонуклеотидными заменами в экзоне 3 – мутация T337C (Tyr113His), «медленная» форма, генотип S/S, и в экзоне 4 – мутация A415G (His139Arg), «быстрая» форма, генотип N/N. Для данного гена также не обнаружено взаимосвязи между частотами аллелей и генотипов и клиническим проявлением ОПП ( $p > 0,05$  для всех исследованных генотипов).

Глутатионтрансферазы (гены *GSTT1*, *GSTM1*) относятся к семейству изоферментов, контролирующим конъюгацию электрофильных молекул ксенобиотиков (например, различных лекарственных средств) или их метаболитов, образовавшихся в процессе фазы 1, с восстановленным глутатионом. Также эти ферменты способны к прямому связыванию с гидрофобными соединениями, такими как гем, билирубин, стероидные гормоны, что позволяет им участвовать во внутриклеточном накоплении и обеспечивать транспорт биологических веществ с ограниченной водорастворимостью. Благодаря каталитической активности и способности к связыванию они участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций [16].

При распределении частот генотипов гена *GSTT1* частота «функционально неблагоприятного» генотипа (*GSTT1 0/0*) в группе больных ОПП в 2 раза превышает таковую в объединенной группе асимптомных носителей (см. табл. 3). А при сравнении со «старшей» группой асимптомных носителей разница увеличивается уже в 3 раза. По всей вероятности, несмотря на отсутствие статистически значимых различий, «функционально неполноценные» варианты генов глутатион-S-трансферазы, особенно их «нулевые» варианты, приводящие к отсутствию синтеза соответствующих белковых продуктов, можно рассматривать как один из факторов риска клинического проявления ОПП.

Полученные результаты подтвердили наше предположение о возможном участии «функционально неполноценных» («нулевых») вариантов двух исследованных глутатион-S-трансфераз в патогенезе ОПП. Сочетание нулевых аллелей этих генов встретилось только в группе больных ОПП (см. табл. 4). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, которые в данном случае могли быть не обнаружены в силу малой репрезентативности выборки асимптомных носителей, сочетание генотипов *GSTT1 0/0*, *GSTM1 0/0* мож-

Таблица 5

## Частота встречаемости порфириногенных факторов у обследованных больных ОПП

Порфириногенный фактор	Все обследованные больные	Лица, имеющие сочетание генотипов <i>GSTT1 0/0</i> , <i>GSTM1 0/0</i>
Менструация	21	1
Лекарства	11	3
Алкоголь	4	—
Беременность	3	—
Инфекции	3	1
Красители	1	1
Инсоляция	1	—
Стресс	1	—
Неизвестно	16	—
Всего...	61	6

но рассматривать как неблагоприятный генетический фактор в пенетрантности ОПП. Следует отметить, что, несмотря на большое разнообразие порфириногенных факторов, изменение гормонального статуса является преобладающим, а лекарства и инфекции в качестве провоцирующего агента встречаются значительно реже (табл. 5). В силу того, что сочетание редких «нулевых» генотипов глутатион-трансфераз встретилось у пациентов с порфириногенными факторами (лекарствами и инфекцией), можно предположить, что данный фермент задействован в детоксикации именно этих провоцирующих заболевание агентов.

Единственная больная, у которой был обнаружен редкий N/N аллель ацетилтрансферазы, ассоциированный с бессимптомным носительством ОПП, унаследовала от одного из родителей такой же редкий аллель, но уже по сочетанию нулевых генотипов глутатион-трансферазы, предположительно ассоциирующихся с клиническим фенотипом заболевания. Возможно, что именно такое сочетание «хорошего» и «плохого» генов обусловило единственный клинический приступ заболевания, перенесенный ею в молодости.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о вполне заслуженном внимании к исследованию генов детоксикации у больных и асимптомных носителей ОПП. Можно сделать предварительный вывод, что в молекулярных механизмах доминантной фенотипической экспрессии мутантного гена *ПБГД*, определяющего патогенез ОПП, скорее всего, задействованы не единичные гены, а целые группы генов. На данный момент анализ генетического полиморфизма генов арилами-*N*-ацетилтрансферазы и глутатион-трансфераз можно рассматривать в качестве прогностического теста для оценки риска клинического проявления ОПП.

**Финансирование.** Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект №09-04-00456).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Сурин В.Л., Лучинина Ю.А., Селиванова Д.С., Пустовойт Я.С., Карпова И.В., Пивник А.В. и др. Молекулярно-генетическое исследование острой перемежающейся порфирии в России: мутационный анализ и поиск функциональных полиморфизмов в гене порфобилиногендезаминазы. *Генетика*. 2010; 46(4): 540–52.
- Кукес В.Г. *Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты*. М.: Реафарм; 2004.

- Подымова С.Д. Механизмы алкогольного повреждения печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 1998; 5: 21–5.
- Артамонов В.В., Любченко Л.Н., Немцова М.В., Залетаев Д.В. Неблагоприятная экология и молекулярные системы проспективной диагностики высокого риска развития онкозаболеваний (на примере рака молочной железы). *Вестник НИИ молекулярной медицины*. 2004; 4: 37–54.

Остальные источники литературы см. в References

## REFERENCES

- Hessels J., Voortman G., Van Der Wagen A., Van Der Elzen C., Scheffer H., Zuijderhoudt F.M.J. Homozygous acute intermittent porphyria in a 7-year-old boy with massive excretions of porphyrins and porphyrin precursors. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2004; 27(1): 19–27.
- Badminton M.N., Elder G.H. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2005; 28(3): 277–86.
- Gouya L., Puy H., Lamoril J., Da Silva V., Grandchamp B., Nordmann Y., et al. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood*. 1999; 93(6): 2105–10.
- Gouya L., Puy H., Robreau A.M., Lyoumi S., Lamoril J., Da Silva V., et al. Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. *Hum. Genet.* 2004; 114(3): 256–62.
- Brady J.L., Jackson H.A., Roberts A.G., Morgan R.R., Whatley S.D., Rowlands G.L., et al. Co-inheritance of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase and haemochromatosis genes accelerates the onset of porphyria cutanea tarda. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115(5): 868–74.
- Gardlo K., Selimovic D., Bolsen K., Ruzichka T., Abel J., Fritsch C. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in a Caucasian population with porphyria cutanea tarda. *Exp. Dermatol.* 2003; 12(6): 843–8.
- Christiansen L., Bygum A., Jensen A., Thomsen K., Brandrup F., Horder M., et al. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Hum. Genet.* 2000; 107(6): 612–4.
- Surin V.L., Luchinina Yu.A., Selivanova D.S., Pustovoyt Ya.S., Karpova I.V., Pivnik A.V., et al. Molecular genetic study of acute intermittent porphyria in Russia: mutation analysis and functional polymorphisms search in porphobilinogen deaminase gene. *Genetics. Russian journal*. 2010; 46(4): 540–52. (in Russian)
- Nebert D.W. Polymorphisms in drug metabolising enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *A. J. Hum. Genet.* 1997; 60(2): 265–71.
- Nebert D.W., Carvan M.J. 3<sup>rd</sup>. Ecogenetics: from ecology to health. *Toxicol. Ind. Health*. 1997; 13(2–3): 163–92.
- Badawi A.F., Cavalieri E.L., Rogan E.G. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism*. 2001; 50(9): 1001–3.
- Kukes V.G. *The metabolism of drugs: clinical and pharmacological aspects*. Moscow: Reafarm; 2004. (in Russian)
- Podymova S.D. The mechanisms of alcoholic liver damage. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology (Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii)*. 1998; 5: 21–5. (in Russian)
- Neafsey P., Ginsberg G., Hattis D., Johns D.O., Guyton K.Z., Sonawane B. Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2009; 12(5–6): 362–88. doi: 10.1080/10937400903158359.
- Artamonov V.V., Lyubchenko L.N., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. The unfavorable environmental conditions and prospective diagnostics of high risk of cancer development by means of molecular systems (for example breast cancer). *Bulletin of the Institute of molecular medicine. Russian journal (Vestnik NII molekulyarnoy meditsiny)*. 2004; 4: 37–54.
- Bolt H.M., Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr. Drug Metab.* 2006; 7(6): 613–28.

Поступила 31.03.16  
Принята к печати 12.07.16