

## РОЛЬ ГЕНА ПЕРВОЙ ФАЗЫ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ CYP2E1 (G1293C) В РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА

Костюшок Н.Я.<sup>1</sup>, Иванова Л.А.<sup>1</sup>, Павлюченко И.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, e-mail: ShagalovaN@list.ru

На данный момент имеется множество нерешенных вопросов, связанных с патогенезом сахарного диабета 1-го типа. Выявление генов, ответственных за развитие и течение сахарного диабета, важно как для попыток профилактики диабета, так и для подбора адекватной сахароснижающей терапии. Сахарный диабет – это полигенное заболевание. Мы предполагаем, что определенные полиморфные варианты генов, ответственных за синтез ферментов системы цитохрома р450, могут иметь важное значение в утяжелении течения диабетических осложнений. Основную патологическую роль в этом способны играть свободные радикалы, которые в большом количестве накапливаются в организме. Так, в нашей работе мы оценили полиморфизм гена «алкогольного цитохрома» CYP2E1 (G1293C) – фермента первой фазы биотрансформации ксенобиотиков. В ходе работы были получены данные о том, что носители гетерозиготного полиморфизма исследуемого гена имеют более высокий уровень альбуминурии и более низкий уровень скорости клубочковой фильтрации по сравнению с гомозиготными носителями данного полиморфизма. Кроме того, у лиц с гетерозиготным полиморфизмом активность ферментов окислительного стресса (глутатион-S-трансферазы, каталазы) и маркера свободнорадикального окисления – малонового диальдегида – также была выше, чем у лиц с гомозиготным полиморфизмом, и значительно выше, чем у лиц из группы контроля. Это позволяет сделать вывод о более тяжелом течении диабетической нефропатии у лиц с гетерозиготным полиморфизмом гена «алкогольного» цитохрома.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа; ген CYP2E1 (G1293C); диабетическая нефропатия, окислительный стресс.

## THE ROLE OF THE GENE OF THE SECOND PHASE OF THE XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION SYSTEM CYP2E1 (G1293C) IN THE DEVELOPMENT OF DIABETIC NEPHROPATHY IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Kostyushok N.Ya.<sup>1</sup>, Ivanova L.A.<sup>1</sup>, Pavlyuchenko I.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FGBOU VO «Kuban State Medical University», Krasnodar, e-mail: ShagalovaN@list.ru

At the moment, there are many unresolved issues concerning the pathogenesis of diabetes mellitus. Identification of the genes responsible for the development and course of diabetes mellitus is extremely important, both for prevention attempts and for the selection of adequate hypoglycemic therapy. Diabetes mellitus is a polygenic disease. We suggest that cytochrome p450 enzymes may play a role in aggravating the course of diabetic complications. The main pathological role in this can be played by free radicals, which accumulate in large quantities in the body, in the case of altered activity of oxidative stress enzymes. So in our work we evaluated the polymorphism of the gene «alcoholic cytochrome» CYP2E1 (G1293C) – the enzyme of the first phase of xenobiotic biotransformation. In the course of the work, data were obtained that carriers of heterozygous polymorphism of the studied gene had higher albuminuria and a lower level of glomerular filtration rate, compared with homozygous carriers of this polymorphism. In addition, the activity of oxidative stress enzymes (glutathione-S-transferase, catalase and malondialdehyde) was also higher in individuals with heterozygous polymorphism than in individuals with homozygous polymorphism. And significantly higher than those from the control group. This allows us to conclude about a more severe course of diabetic nephropathy in individuals with heterozygous polymorphism of the «alcoholic» cytochrome gene.

Keywords: type 1 diabetes mellitus; CYP2E1 gene (G1293C); diabetic nephropathy, oxidative stress.

Сахарный диабет, по определению Всемирной организации здравоохранения – это группа обменных заболеваний, которые характеризуются гипергликемией, являющейся результатом дефектов секреции или действия инсулина либо обоих этих факторов. Он

является самым распространенным эндокринным заболеванием. В основе развития сахарного диабета 2-го типа (СД 2-го типа) лежат многофакторные причины, начиная от неправильного образа жизни и заканчивая генетической предрасположенностью. Если мы вполне можем представить, как несбалансированное питание и низкая физическая активность ведут к развитию гипергликемии, то точно ответить на вопрос о генетической предрасположенности до сих пор не представляется возможным. Однако, если нам удастся выяснить семейный анамнез сахарного диабета, то предположить генетическую составляющую станет проще. Точнее, проще будет сказать, что она точно есть, а вот какие именно гены стоят за этой «предрасположенностью» – вопрос до сих пор не решенный. Скрининг мутаций генов может обеспечить дополнительные параметры для профилактических мероприятий [1]. В отношении сахарного диабета 1-го типа (СД 1) образ жизни никак не влияет на его манифестацию. В связи с тем, что патогенез СД 1-го типа не изучен до конца, точно понять, какие именно мутированные гены привели к развитию СД 1, сложно. Кроме того, СД 1-го типа – это полигенное заболевание, а значит, в его основе лежит полиморфизм сразу множества генов, и их вовлечение ведет не к прямому развитию заболевания, а лишь к предрасположенности [2]. С нашей точки зрения, полезно обратить внимание на систему генов цитохрома P450 как одну из причин утяжеления течения СД 1-го типа и его осложнений. Цитохром P450 – это молекула, в составе которой есть белок и гем (металлопротеин). Именно к гему идет присоединение молекулы кислорода, что и обеспечивает такую выраженную окислительную активность ферментов. Число 450 обозначает, что связанный с оксидом углерода гем отличается максимумом поглощения света при длине волны 450 нм [3]. Ферменты цитохрома P450 являются ферментами первой фазы биотрансформации ксенобиотиков и переводят липофильные вещества в более полярные (гидрофильные) метаболиты, которые затем выводятся из организма. В случае различных полиморфных вариантов генов системы цитохрома P450 этот процесс может нарушаться, что в дальнейшем будет способствовать прогрессии окислительного стресса и перекисного окисления липидов, а в итоге приведет к свободнорадикальному повреждению клеток [4]. Это клинически может проявляться быстропрогрессирующим и тяжелым течением диабетических осложнений. Нам бы хотелось рассмотреть такое грозное и часто очень поздно выявляемое осложнение СД 1-го типа, как диабетическая нефропатия (ДН). Негативное влияние на клетки и эндотелий оказывается за счет повышенного образования свободных радикалов и за счет дисбаланса в системе антиоксидантной защиты, что приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ) и гибели клеток. Эти нарушения, получившие название окислительного стресса, вносят значительный вклад в патогенез всех осложнений СД, в особенности ДН. Это осложнение протекает особенно тяжело из-за его бессимптомного начала. Как правило, клинически ДН проявляет

себя на стадиях 4–5, когда возникают такие осложнения, как эподефицитная анемия, ренальная остеодистрофия, уремия, артериальная гипертензия, гипоальбуминемия и др. Эти осложнения сами по себе требуют серьезного лечения и утяжеляют течение сахарного диабета. Тяжелейшим исходом ДН является необходимость в проведении диализа. Если начать лечение на ранних стадиях хронической болезни почек, то можно предупредить развитие диализных стадий, а также вовремя осуществлять профилактику и коррекцию осложнений [5]. Из огромного количества энзимов семейства цитохрома р450 наше внимание особенно привлекает «алкогольный цитохром» – один из центральных ферментов этой системы [6]. Ген «алкогольного цитохрома» назван так в силу своих способностей кодировать фермент, который способен окислять этанол, ацетол и ацетон. В организме любого человека в норме вырабатывается эндогенный этанол, однако он присутствует в сыворотке крови в очень низких концентрациях. Одной из основных функций этанола в организме человека является его превращение в ацетальдегид. Последний же является эндогенным регулятором окислительного фосфорилирования [7]. Все вышеописанное принципиально важно для понимания молекулярных механизмов работы ферментов окислительного стресса. Однако в случае изменения их активности (повышении, снижении) весь процесс окислительно-восстановительного фосфорилирования может измениться, что и приведет к нарастанию процессов свободнорадикального повреждения и перекисного окисления липидов [8].

Целью работы было оценить тяжесть течения ДН у лиц с СД 1-го типа и различными полиморфными вариантами гена системы биотрансформации ксенобиотиков *CYP2E1(G1293C)* «алкогольного цитохрома».

### **Материалы и методы исследования**

Исследование проводилось на базе двух кафедр ФГБОУ ВО «Кубанского государственного медицинского университета»: кафедры «Эндокринологии ФПК и ППС» и кафедры «Биологии с курсом медицинской генетики». Исследование началось в сентябре 2021 г. и продолжается до сих пор. Набор пациентов происходил на базе Краевой Клинической больницы скорой медицинской помощи г. Краснодара. В исследование были включены 50 человек с верифицированным диагнозом СД 1-го типа и 20 человек контрольной группы. Перед включением в исследование все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ КубГМУ в сентябре 2021 г. Критерии включения в основную группу: верифицированный диагноз СД 1-го типа, длительность заболевания 7–10 лет, лица европеоидной расы, уровень гликированного гемоглобина 6,5–8,0%, уровень скорости клубочковой фильтрации (СКФ) более 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>; отсутствие тяжелых соматических

заболеваний и декомпенсаций хронических заболеваний на момент включения в исследование.

Критерии исключения: сахарный диабет 2-го типа, наличие тяжелой сопутствующей патологии, наличие патологии почек в анамнезе (мочекаменная болезнь, хронический пиелонефрит, кисты почек и др.), уровень СКФ на момент включения в исследование менее 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, уровень гликированного гемоглобина более 8%, длительность сахарного диабета менее 7 лет. Наличие таких жестких критериев вступления в группу исследования позволило нам сформировать относительно «чистую выборку»: пациенты с компенсированным течением сахарного диабета 1-го типа, без тяжелых сопутствующих патологий и с сохранной функцией почек на протяжении не менее 7 лет течения заболевания. Контрольная группа была сформирована из 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу, возрасту и этнической принадлежности с пациентами основной группы. У всех пациентов при вступлении в исследование проводился полный физикальный и антропометрический осмотр. Была взята кровь на биохимическое исследование (глюкоза, креатинин, трансаминазы, мочевины, билирубин, гликированный гемоглобин и др.); проводились общий анализ утренней порции мочи; оценка уровня протеинурии (суточная моча); биохимический анализ крови для оценки активности ферментов окислительного стресса (каталаза (КАТ), супероксиддисмутаза (СОД), глутатион-S-трансфераза (Г-S-T)) и свободнорадикального окисления (СРО) – малоновый диальдегид (МДА), а также была взята сыворотка крови для проведения генотипирования гена «алкогольного цитохрома». Материалом для молекулярно-генетического исследования послужила цельная венозная кровь, которая забиралась однократно в пробирки с этилендиететрааминоуксусной кислотой (ЭДТА) при включении пациента в исследование. Для выделения геномной ДНК применяли сорбентный метод с использованием набора реактивов «ДНК-экспресс кровь» («Литех», Россия), затем методом полимеразной цепной реакции из лейкоцитарной фракции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе RotorGene выполняли генотипирование локуса G1293C гена *CYP2E1* или «алкогольного цитохрома». Регистрация FAM/NAХ позволяла определить три варианта генотипа:

- гомозигота по основному аллелю;
- гетерозигота;
- гомозигота по минорному аллелю (данный мутантный полиморфизм не был выявлен ни в одном образце крови).

Состояние баланса в системе «про-/антиоксиданты организма» наблюдаемых пациентов и контрольной группы оценивалось по активности ферментов системы антиоксидантной защиты (КАТ, СОД, Г-S-T) и уровню продуктов СРО – МДА в крови. Забор

крови с целью оценки активности ферментов окислительного стресса производился непосредственно перед выпиской пациента из стационара. Это было сделано для того, чтобы исключить влияние гипергликемии, стрессового фактора и соматической дисфункции на показатели активности ферментов окислительного стресса и СРО. Активность КАТ оценивали по методике М.А. Королюка и соавт.; уровень МДА – по методике И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили; активность СОД оценивали по методике Т.В. Сирота; Г-S-T – по методике, описанной А.И. Карпищенко. Всех пациентов опытной группы после получения результатов молекулярно-генетического исследования удалось разделить на две подгруппы: подгруппа гомозиготных носителей исследуемого гена по аллелю 1 (генотип GG) и подгруппа гетерозиготных носителей исследуемого гена (генотип GC). Далее в зависимости от полиморфного варианта гена «алкогольного цитохрома», биохимических показателей активности окислительного статуса пациента, показателей протеинурии в суточной порции мочи, уровня альбуминурии в разовой утренней порции мочи и уровня СКФ делались выводы о влиянии генетического полиморфизма G1293C гена *CYP2E1* на течение нефропатии каждого пациента.

### **Статистика**

Достоверность различий в распределении частот генотипов между группами больных и здоровых лиц оценили по тесту  $\chi^2$ , по методу сопряженных таблиц (четырёхпольная таблица). Числовые распределения показателей системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов проверялись на соответствие нормальному распределению с применением критерия Шапиро–Уилка. В ходе исследования числовые распределения показателей соответствовали нормальному закону. Количественные показатели в биохимических характеристиках пациентов (показатели активности ферментов ФБК и СРО) оценивались по критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p$  менее 0,05. Расчеты выполнены с помощью программы STATISTICA 6.1 Stat-Soft Inc, США.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При сравнении основной и контрольной групп по полиморфным вариантам локуса G1293C гена *CYP2E1* были выявлены различия в соотношении гомозиготных и гетерозиготных носителей. Так, в основной группе количество гетерозиготных носителей составило 19%, а гомозиготных по аллелю 1 – 81%, в отличие от группы контроля, где гетерозиготных носителей было значительно больше гомозиготных – 95% против 5% соответственно. Мы предполагаем, что именно гетерозиготный полиморфизм исследуемого гена оказывает более негативное влияние на состояние окислительного стресса у пациентов и ведет к развитию более тяжелой ДН. Об этом свидетельствует активность ферментов окислительного стресса. У гетерозиготных носителей гена «алкогольного цитохрома» было

выявлено значительное повышение уровня маркера свободнорадикального окисления – МДА (34,2 мкМоль/л) – и таких ферментов окислительного стресса, как КАТ (45,7 нмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг Hb), Г-S-T (43,7 мкмоль/мин/мг белка). Эти значения выше, чем у лиц с гомозиготным носительством, и значительно выше показателей активности ферментов окислительного стресса и свободнорадикального повреждения в группе контроля (таблица). Однако активность СОД у лиц опытной группы с гетерозиготным полиморфизмом была ниже, чем у лиц с тем же полиморфизмом в контрольной группе. Мутантных гомозигот по аллелю 2 ни в опытной, ни в контрольной группе выявлено не было. При оценке функции почек у лиц с гетерозиготным носительством гена «алкогольного цитохрома» показатели были также хуже, чем у гомозиготных носителей: средний уровень СКФ составил 73 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, а уровень суточной экскреции альбумина с мочой составил 210 мг/сут., что соответствует стадии альбуминурии А2. Для сравнения: в подгруппе гомозиготных носителей средний уровень СКФ составил 84 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, а суточная экскреция альбумина с мочой – 80 мг/сут., что, однако, тоже соответствует стадии альбуминурии А2. При проведении корреляционного анализа была выявлена отрицательная линейная корреляция между уровнем активности ферментов антиоксидантной защиты и уровнем СКФ: чем выше уровень активности ферментов антиоксидантной защиты, тем ниже СКФ.

Показатели системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов у лиц с различными полиморфными вариантами гена CYP2E1 (G1293C)

<b>G1293C</b>	<b>МДА (мкМоль/л)</b>	<b>КАТ (нмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг Hb)</b>	<b>Г-S-T (мкмоль/мин/мг белка)</b>	<b>СОД (усл.ед.)</b>
<b>СД1 гетерозигота (GC) n=8</b>	34,2±6,4* <i>p</i> <0,001	45,7±5,1* <i>p</i> <0,001	43,6±4,8* <i>p</i> <0,001	81,6±3,9* <i>p</i> <0,001
<b>Сд1 гомозигота (GG) n=42</b>	31,02±2,5** <i>p</i> <0,001	39,5±1,7** <i>p</i> <0,05	38,7±2,14** <i>p</i> <0,05	87,7±2,4** <i>p</i> <0,05
<b>Контрольная группа – гетерозигота (GC) n=19</b>	7,1±0,8	30,2±1,0	27,7±0,9	102,4±1,0
<b>Контрольная группа – гомозигота GG n=1</b>	6,1±0,4	32,8±1,1	29,7±1,4	73,12±0,8

Примечание: МДА – малоновый диальдегид; СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; Г-S-T – глутатионтрансфераза. \* – в сравнении с гетерозиготными носителями исследуемого гена в контрольной группе; \*\* – в сравнении с гомозиготными носителями исследуемого гена в контрольной группе.

Обсуждение роли гена «алкогольного цитохрома» в патогенезе различных патологий идет давно. Так, в некоторых исследованиях подтверждено негативное влияние гомозиготного полиморфизма C\C гена *CYP2E1* на формирование хронического алкогольного панкреатита [9]. Однако в нашем исследовании носители данного полиморфизма не были обнаружены ни в опытной, ни в контрольной группе. А вот в патогенезе развития хронического алкогольного гепатита было выявлено негативное влияние гетерозиготного полиморфизма исследуемого гена [7]. Эти данные соответствуют нашим полученным результатам. Нами также было выявлено более тяжелое течение диабетической нефропатии у лиц с гетерозиготным носительством гена «алкогольного цитохрома». Очевидно, это связано с нарастанием активности ферментов окислительного стресса и дальнейшим свободнорадикальным повреждением клеток. Хочется обратить внимание, что тот или иной полиморфный вариант гена не является мутацией в чистом виде, однако может в значительной мере повлиять на активность кодируемых ферментов, что и было доказано в нашей работе на примере полиморфизма G1293C гена *CYP2E1*.

### **Выводы**

Изменение активности ферментов 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков может приводить к необратимому росту активности окислительного стресса. Это в итоге способствует перекисному окислению липидов и свободнорадикальному повреждению клеток. В случае с ДН это приводит к развитию гломерулосклероза в почечном клубочке, что и является причиной снижения функции почек и проявляется не только нарастанием креатинина и снижением СКФ, но и бессимптомной альбуминурией. В нашей работе носители гетерозиготного полиморфизма гена *CYP2E1* (G1293C) продемонстрировали более высокий уровень активности ферментов окислительного стресса и свободнорадикального окисления, чем гомозиготные носители полиморфного варианта изучаемого гена. Это коррелировало с более низкой СКФ и более высоким уровнем альбуминурии в этой подгруппе пациентов.

Оценка оксидативного статуса пациента в сочетании с выявлением отдельных полиморфных вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков поможет подтвердить гипотезу о влиянии того или иного полиморфизма генов на состояние баланса в системе «про-/антиоксиданты» и на более тяжелое и быстро прогрессирующее течение осложнений СД.

### **Список литературы**

1. Клинические рекомендации. Сахарный диабет 2 типа у взрослых. 2021 год. [Электронный ресурс]. URL: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/290> (дата обращения: 23.11.2022).
2. Викулова О.К., Железнякова А.В., Лебедева Н.О., Никитин А.Г., Носиков В.В., Шестакова М.В. Генетические факторы в развитии хронической болезни почек при сахарном диабете // Генетика. 2017. Т. 53. № 4. С. 411-425.
3. Неумоина М.В., Шмакова Т.В., Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Шутова И.В., Денисенко Т.Л., Трошина Т.А. Влияние полиморфизма CYP2C19 на метаболизм и эффективность использования ингибиторов протонной помпы // Здоровье населения и среда обитания. 2021. № 4 (337). С. 66-73.
4. Paul S., Ali A., Katare R. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus - A comprehensive review. J. Diabetes Complications. 2020. V. 34 (8). P. 107613. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2020.107613.
5. Masayuki Ya., Kengo F., Junichi H. Nonproteinuric diabetic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 2020. V. 24 (7). P. 573-581. DOI: 10.1007/s10157-020-01881-0.
6. Vikulova O., Lebedeva N., Zheleznyakova A., Nikitin A., Shamkhalova M., Shestakova M. Combined development of macrovascular and chronic kidney disease in type 2 diabetes associated with polymorphism of TNF- $\alpha$  Gene. Atherosclerosis. 2017. V. 252. P. e143-e144.
7. Новиков Д.Г., Индутный А.В., Ходосевич А.А., Горбунова Л.В., Борзенко Г.А., Самусева Н.Л. Полиморфизм генов ферментов, участвующих в метаболизме этанола, у лиц с различным уровнем кардиоваскулярного риска // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25554> (дата обращения: 21.11.2022).
8. Азизова Г.И., Дадахова А.Р., Амирова М.Ф., Биомаркеры окислительного стресса и состояние антиоксидантной системы при сахарном диабете 2 типа // Universum: медицина и фармакология. 2016. № 6 (7). С. 14-19 DOI: 10.17816/kmj2208.
9. Губергриц Н.Б., Кишеня М.С., Голубова О.А. Полиморфизм генов метаболизма этанола при хроническом алкогольном панкреатите // Терапевтический архив. 2014. № 86 (2). С. 49-55.