

Роль полиморфизма (rs1800566) гена фермента НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазы 1 в развитии острого панкреатита

Т.А. Самгина, Ю.В. Канищев, С.Н. Григорьев,
П.М. Назаренко, А.В. Полоников

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Курск, Российская Федерация

The role of polymorphism (rs1800566) of NAD(F)H quinone oxidoreductase-1 in development of acute pancreatitis

T.A. Samgina, Y.V. Kanishchev, S.N. Grigor'yev, P.M. Nazarenko, A.V. Polonikov

Federal state educational government-financed institution of higher education «Kursk state medical university»,
Ministry of healthcare Russian Federation, Kursk, Russian Federation

Цель исследования. Оценить роль полиморфизма (rs1800566) гена фермента НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазы 1 (*NQO1*) в развитии острого панкреатита (ОП) в русской популяции.

Материал и методы. Образцы цельной крови получены от 349 неродственных больных ОП и 329 неродственных индивидов русской национальности без заболеваний желудочно-кишечного тракта. Средний возраст больных 48,9±13,1 года, здоровых лиц 47,8±12,1 года. Генотипирование полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* проводили с помощью

Aim of investigation. To estimate the role of genetic polymorphism (rs1800566) of NAD(F)H quinone oxidoreductase-1 in development of acute pancreatitis in the Russian population.

Material and methods. Whole blood samples were received from 349 unrelated AP patients and 329 unrelated individuals of Russian nationality having no gastrointestinal diseases. Mean age of patients was 48.9±13.1 years, mean age of healthy controls — 47.8±12.1 years. Genotyping of *NQO1* gene polymorphism (rs1800566) was carried out by real-time polymerase chain reaction.

Самгина Татьяна Александровна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры хирургических болезней № 2 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет». Контактная информация: tass@list.ru

Samgina Tatyana A. — MD, lecturer, chair of surgery No. 2, Kursk state medical university.

Contact information: tass@list.ru

Канищев Юрий Васильевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургических болезней ФПО ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Kanishchev Yury V. — MD, PhD, professor, chair of surgery, faculty of postgraduate education, Federal state educational government-financed institution of higher education «Kursk state medical university»

Григорьев Сергей Николаевич — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры хирургических болезней ФПО ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Grigoryev Sergey N. — MD, assistant-professor, chair of surgery, faculty of postgraduate education, Kursk state medical university

Назаренко Петр Михайлович — доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургических болезней № 2 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Nazarenko Petr M. — MD, PhD, professor, chair of surgery No. 2, Kursk state medical university

Полоников Алексей Валерьевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Polonikov Aleksey V. — MD, PhD, professor, chair of biology, medical genetics and ecology, Kursk state medical university

Поступила: 09.10.2017 / Received: 09.10.2017

полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Обнаружена ассоциация полиморфизма (rs1800566) генотипа Т/Т гена *NQO1* с повышенным риском развития ОП, в большей степени острого небилиарного панкреатита, у мужчин. Риск развития заболевания повышен у пациентов с генотипом ТТ независимо от объема употребляемого алкоголя и длительности алкогольного анамнеза, а также у курящих пациентов с генотипом СТ при употреблении алкоголя более 10 лет, даже выпивающих меньше 199 г этанола в неделю.

Ключевые слова: острый панкреатит, генетический полиморфизм, НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктаза 1.

Results. The association of polymorphism (*rs1800566*) of *NQO1* gene T/T genotype with high risk of AP development, mostly — acute and non-biliary pancreatitis, in males. The risk of disease was elevated in patients with TT genotype irrespective of intensity and duration of alcohol intake, as well as in smoking patients with ST genotype at alcohol consumption exceeding 10 years, even in those receiving less than 199 g of ethanol per week.

Key words: acute pancreatitis, genetic polymorphism, NAD(F) N-quinone oxidoreductase-1.

Для цитирования: Самгина Т.А., Канищев Ю.В., Григорьев С.Н., Назаренко П.М., Полоников А.В. Роль полиморфизма (rs1800566) гена фермента НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазы 1 в развитии острого панкреатита. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2018; 28(1):20-25 DOI: 10.22416/1382-4376-2018-28-1-20-25

For citation: Samgina T.A., Kanishchev Y.V., Grigor'yev S.N., Nazarenko P.M., Polonikov A.V. The role of polymorphism (*rs1800566*) of NAD(F)N quinone oxidoreductase-1 in the development of acute pancreatitis. Ross z gastroenterol gepatol koloproktol 2018; 28(1):20-25 DOI: 10.22416/1382-4376-2018-28-1-20-25

Введение

В основе развития *острого панкреатита* (ОП) лежат процессы аутоферментативного некролиза с возможным эндогенным инфицированием и вовлечением в патологический процесс тканей брюшинного пространства, брюшной полости и систем органов внебрюшинной локализации [1].

Согласно современным представлениям об этиологии и патогенезе, ОП — это мультифакториальное заболевание, развитие которого определяется сложным взаимодействием множества генов и различных факторов внешней среды [2]. Несмотря на то что исследователи в разных странах изучают гены, отвечающие за экзокринную функцию поджелудочной железы [3–6], гены биотрансформации ксенобиотиков [2, 7], цитокинов [8, 9], антиоксидантной системы [10], вопросы, касающиеся генетических механизмов развития ОП и его осложнений, изучены недостаточно [2].

Несомненно, важную роль в развитии ОП играют действие токсичных веществ и нарушение регуляции процессов про- и антиоксидантной защиты. Так, в ходе 1-й фазы окислительно-восстановительного или гидролитического превращения токсичного вещества молекула обогащается полярными функциональными группами, что делает ее реакционноспособной и легче растворяющейся в воде [10–12]. В этом принимают участие ферменты классов оксидаз, редуктаз и дегидрогеназ.

НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктаза 1 (*NQO1*) — цитозольный фермент, который катализирует

двухэлектронное восстановление соединений хинона и предотвращает образование свободных радикалов семихинона и активных кислородных молекул, защищая таким образом клетку от окислительного стресса [13]. В то же время *NQO1* метаболически активирует некоторые канцерогены, такие как нитрозамины и гетероциклические амины, которые присутствуют в табачном дыме и пище [14]. Активность фермента находится в прямой зависимости от присутствия того или иного полиморфного варианта гена.

Ген *NQO1* локализован на 16-й хромосоме в локусе 16q22.1. Замена (609C>T, rs1800566, Pro187Ser) выражается тремя фенотипами: фенотип (Pro/Pro) характеризуется полной, или нормальной, активностью фермента, гетерозиготный фенотип (Pro/Ser) — трехкратным снижением активности энзима, а гомозиготный фенотип (Ser/Ser) — отсутствием ферментативной активности [14]. Согласно результатам мета-анализов, установлена взаимосвязь данного SNP с риском развития заболеваний органов пищеварительной системы [15].

До настоящего времени ген *NQO1* не рассматривали в качестве возможного фактора предрасположенности к развитию ОП, хотя патогенетическая значимость его в отношении ОП представляется возможной.

Цель настоящего исследования — изучение ассоциации полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* с риском развития ОП у жителей Курской области.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные от 349 неродственных больных ОП (105 женщин и 244 мужчины) русской национальности, находившихся на стационарном лечении в хирургических отделениях стационаров г. Курска в период с 2012 по 2015 г., и 329 неродственных индивидов русской национальности без заболеваний *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ) (115 женщин и 214 мужчин). Средний возраст больных $48,9 \pm 13,1$, здоровых лиц $47,8 \pm 12,1$.

Диагноз ОП устанавливали с использованием современной классификации ОП, разработанной Российским обществом хирургов в 2014 г. с учётом классификации Атланта-92 и её модификаций, предложенных в 2011 г. (г. Кочин) Международной ассоциацией панкреатологов (International Association of Pancreatology) и Международной рабочей группой по классификации острого панкреатита (Acute Pancreatitis Classification Working Group) в 2012 г., а также общеклинических, лабораторных (общих и биохимический анализы крови) и инструментальных (ультразвуковое исследование и магнитно-резонансная томография поджелудочной железы, эзофагогастродуоденоскопия) методов исследования.

У всех обследованных проводили забор венозной крови для проведения молекулярно-генетического анализа и биохимических исследований. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. С целью генотипирования полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* проводили ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96Bio-Rad Laboratories (США) с использованием коммерческих наборов реактивов TaqMan SNP Genotyping Assays фирмы «Applied Biosystems» (США).

Повторное генотипирование 10% исследованных образцов, отобранных по случайному принципу и при отсутствии информации о статусе болезни, показало 100% воспроизводимость оригинальных результатов. Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов гена *NQO1* с риском раз-

вития ОП использовали критерий χ^2 и *отношение шансов* (OR) с 95% *доверительными интервалами* (CI). Статистический анализ осуществляли с использованием программы Statistica 6.0 («StatSoft», США).

Результаты исследования

Данные о частоте выявления аллелей и генотипов полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* представлены в табл. 1. Генотипы исследуемого полиморфизма находились в соответствии с распределением Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Как видно из табл. 1, нами была установлена ассоциация генотипа Т/Т с развитием ОП (OR=4,20; 95% CI 1,19–14,89; $p=0,02$).

При изучении ассоциации полиморфизма с *острым небилиарным панкреатитом* (ОНП) определяется усиление связи с генотипом Т/Т (OR=4,79; 95% CI 1,34–17,16; $p=0,01$) (табл. 2).

Проведенный стратифицированный анализ по полу показал, что у пациентов мужского пола с генотипом более вероятно развитие ОНП (OR=3,32; 95% CI 0,91–12,06; $p=0,05$) (табл. 3).

Поскольку среди факторов риска развития ОП особое место занимает злоупотребление алкогольными напитками, нами было изучено влияние объема выпитого (менее 199 г и более 200 г чистого этанола в неделю), частоты употребления алкоголя (2 раза и менее в месяц и более 1 раза в неделю) и его длительности, т.е. алкогольного анамнеза (до 10 лет и более 10 лет), и курения на развитие ОП (табл. 4).

Изучение ассоциации генотипов полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* с риском развития ОНП показало, что риск развития заболевания повышен у пациентов с генотипом ТТ независимо от объема употребляемого алкоголя и длительности алкогольного анамнеза, а также у курящих и пациентов с генотипом СТ при употреблении алкоголя более 10 лет, даже пьющих менее 199 г этанола в неделю. У пациентов с генотипом СС при употреблении алкогольных напитков 2 раза и менее в месяц независимо от объема выпитого редко развивается ОНП.

Таблица 1

Частоты выявления аллелей и генотипов полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* в группах больных острым панкреатитом и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОП (n=349)		Здоровые лица (n=329)		χ^2 (p)	OR (95%CI)
	абс. число	%	абс. число	%		
609С/С	227	65,0	228	69,3	1,39 (0,24)	1,21 (0,88–1,67)
609С/Т	109	31,2	98	29,8	0,17 (0,68)	1,07 (0,77–0,48)
609Т/Т	13	3,7	3	0,9	5,82 (0,02)	4,20 (1,19–14,89)
609С	0,807		0,842		2,92 (0,09)	1,28 (0,96–1,69)
609Т	0,193		0,158			

Таблица 2

Частота выявления аллелей и генотипов полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* в группах больных острым небилиарным панкреатитом и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОНП (n=284)		Здоровые лица (n=329)		χ^2 (p)	OR (95%CI)
	абс. число	%	абс. число	%		
609C/C	177	62,3	228	69,3	3,31 (0,07)	1,36 (0,98–1,91)
609C/T	95	33,5	98	29,8	0,95 (0,33)	1,18 (0,84–1,67)
609T/T	12	4,2	3	0,9	7,01 (0,01)	4,79 (1,34–17,16)
609C	0,790		0,842		5,42 (0,02)	3,32 (1,06–1,89)
609T	0,210		0,158			

Таблица 3

Частота выявления аллелей и генотипов полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* в группах мужчин, больных острым небилиарным панкреатитом, и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОНП (n=244)		Здоровые лица (n=214)		χ^2 (p)	OR (95%CI)
	абс. число	%	абс. число	%		
609C/C	151	61,9	154	72,0	5,20 (0,02)	1,58 (1,07–2,35)
609C/T	82	33,6	57	26,6	2,62 (0,11)	1,39 (0,93–2,09)
609T/T	11	4,5	3	1,4	3,71 (0,05)	3,32 (0,91–12,06)
609C	0,787		0,853		6,65 (0,01)	1,57 (1,11–2,21)
609T	0,213		0,147			

Таблица 4

Анализ влияния курения, длительности, объема и частоты употребления алкогольных напитков, полиморфизма (rs1800566) гена *NQO1* на развитие острого небилиарного панкреатита

Фактор риска/ генотипы	Больные ОНП, абс. число (%)		Здоровые лица, абс. число (%)		OR (95% CI) <i>P</i> -value ²	
	без фактора риска	с фактором риска	без фактора риска	с фактором риска	без фактора риска	с фактором риска
Курение						
609C/C	4 (57,1)	132 (63,5)	11 (73,3)	84 (72,4)	<i>n</i> =22 2,06 (0,31–13,57)	<i>n</i> =324 12,32 (0,72–212,28) 0,02
609C/T	3 (42,9)	66 (31,7)	4 (26,7)	32 (27,6)		
609T/T	–	10 (4,8)	–	–		
Употребление алкогольных напитков по частоте						
609C/C	55 (55)	95 (66,9)	53 (81,5)	62 (69,7)	<i>n</i> =165 3,61 (1,72–7,58) 0,0005	<i>n</i> =142+89 3,21 (0,37–27,95) 0,26
609C/T	39 (39)	42 (29,6)	11 (16,9)	26 (29,2)		
609T/T	6 (6)	5 (3,5)	1 (1,6)	1 (1,1)		
Употребление алкогольных напитков более 10 лет						
609C/C	83 (63,4)	67 (60,4)	69 (74,2)	46 (74,2)	<i>n</i> =224 14,5 (8,83–252,36) 0,01	<i>n</i> =173 2,09 (1,03–4,24) 0,04
609C/T	39 (29,8)	42 (37,8)	24 (25,8)	14 (22,6)		
609T/T	9 (6,9)	2 (1,8)	–	2 (3,2)		
Употребление алкогольных напитков объемом более 200 г per week						
609C/C	65 (58,6)	85 (64,4)	75 (76,5)	40 (70,2)	<i>n</i> =209 7,53 (0,93–61,36) 0,03	<i>n</i> =189 1,3 (0,13–12,8) 0,82
609C/T	38 (34,2)	44 (33,3)	22 (22,5)	16 (28,1)		
609T/T	8 (7,2)	3 (2,3)	1 (1)	1 (1,8)		

Обсуждение результатов исследования

Изучение полиморфизмов генов антиоксидантной системы — одно из направлений интенсивных исследований, проводимых с целью раскрытия патогенетических механизмов развития и течения заболеваний органов ЖКТ, в том числе поджелудочной железы [10–14].

Так, J. Chen и соавт. [16] обнаружили ассоциацию аллеля Ser с высоким риском развития колоректального рака среди кавказцев. Xian-E Peng и соавт. [17] установили, что среди китайцев риск развития колоректального рака выше у курящих и ниже у пациентов, употребляющих в пищу чай, свежие фрукты и овощи. Также отмечено, что генотипы 609СТ и ТТ гена *NQO1* связаны с повышенным риском развития колоректального рака у китайцев, эта ассоциация усиливается при употреблении алкоголя и курении. В исследовании с участием европейцев чешского происхождения не установлено значимой ассоциации полиморфизма 609С>Т гена *NQO1* с риском развития рака поджелудочной железы [18]. Основные неблагоприятные факторы образа жизни, такие как курение, употребление алкоголя, кофе и чая, также не повлияли на риск развития заболевания. Однако среди японцев обнаружена связь аллеля С с развитием хронического алкогольного панкреатита [10], высокий уровень экспрессии *NQO1* был обнаружен у курящих пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы, хотя ассоциации генотипов и аллелей с развитием заболевания не выявлено [11].

В рамках настоящего исследования впервые выявлена ассоциация полиморфизма (rs1800566) генотипа Т/Т гена *NQO1* с повышенным риском развития ОП, в большей степени ОНП, у мужчин. Также установлено, что риск развития заболевания повышен у пациентов с генотипом ТТ независимо от объема употребляемого алкоголя и длительности алкогольного анамнеза, а также у курящих и пациентов с генотипом СТ при употреблении алкоголя более 10 лет, даже пьющих менее 199 г этанола в неделю. У пациентов с генотипом СС при употреблении алкогольных напитков 2 раза и менее в месяц независимо от объема выпитого редко развивается ОНП.

Активность фермента находится в прямой зависимости от присутствия того или иного полиморфного варианта гена. Замена (609С>Т, rs1800566, Pro187Ser) выражается тремя фенотипами: фенотип (Pro/Pro) характеризуется полной, или нормальной, активностью фермента, гетерозиготный фенотип (Pro/Ser) — трехкратным снижением активности энзима, гомозиготный фенотип (Ser/Ser) — отсутствием ферментативной активности [14].

Таким образом, отсутствие ферментативной активности НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазы 1 (*NQO1*) у пациентов приводит к тому, что образование свободных радикалов семихинона и активных кислородных молекул агрессивно воздействует на клетку, способствуя развитию окислительного стресса, вследствие чего повышается риск развития острого небилиарного панкреатита.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Список литературы/References

1. Горский В.А., Ковальчук Л.В., Агапов М.А. Анти-медиаторная терапия в комплексном лечении острого деструктивного панкреатита. Хирургия 2010; (3):54-61 [Gorsky V.A., Koval'chuk L.V., Agapov M.A. Anti-mediator therapy in complex treatment of acute destructive pancreatitis. Khirurgiya 2010; (3):54-61].
2. LaRusch J., Whitcomb D.C. Genetics of pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol 2011; (27): 467-74.
3. Cho S.M., Shin S., Lee K.A. PRSS1, SPINK1, CFTR, and CTRC Pathogenic Variants in Korean Patients With Idiopathic Pancreatitis. Ann Lab Med 2016 Nov; 36(6):555-60.
4. Wang W., Sun X.T., Weng X.L. et al. Comprehensive screening for PRSS1, SPINK1, CFTR, CTRC and CLDN2 gene mutations in Chinese paediatric patients with idiopathic chronic pancreatitis: a cohort study. Br Med J 2013; (3):003150.
5. Masamune A., Nakano E., Kume K. et al. PRSS1 c.623G>C (p.G208A) variant is associated with pancreatitis in Japan. Gut 2014; 63:366.
6. Самгина Т.А., Бушуева О.Ю., Назаренко П.М., Полоников А.В. Связь полиморфизма HindIII гена липопротеинлипазы с развитием острого небилиарного панкреатита: пилотное исследование. Бюл экспер биол и мед 2016;(1): 92-6 [Samgina T.A., Bushueva O.Yu., Nazarenko P.M., Polonikov A.V. Association of HindIII lipoproteinlipase genetic polymorphism with acute non-biliary pancreatitis: the pilot study. Byul eksper boil i med 2016; (1):92-6].
7. Ockenga J., Strunck S., Post C. et al. The role of epoxide hydrolase Y113H gene variant in pancreatic diseases. Pancreas 2009 May; 38(4):97-101.
8. Yin Y.W., Sun Q.Q., Feng J.Q. et al. Influence of interleukin gene polymorphisms on development of acute pancreatitis: asystematic review and meta-analysis. Mol Biol Rep 2013 Oct; 40(10):5931-41.
9. Самгина Т.А., Бушуева О.Ю., Назаренко П.М., Полоников А.В. Связь промоторного полиморфизма –308 G>A гена фактора некроза опухоли с тяжестью течения острого панкреатита у русской популяции жителей Курской области. Экспер и клин гастроэнтерол 2014; (9):17-20 [Samgina T.A., Bushueva O.Yu.,

- Nazarenko P.M., Polonikov A.V.* Association of -308 G>A tumor necrosis factor promotor genetic polymorphism with severity of acute pancreatitis in the Russian population of Kursk region. *Eksp i klin gastroenterol* 2014; (9):17-20].
10. *Maruyama K., Harada S., Yokoyama A., Mizukami S.* et al. Association analyses of genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1, NQO1, NAT2, LPL, PRSS1, PSTI, and CFTR with chronic alcoholic pancreatitis in Japan. *Alcohol Clin Exp Res* 2010 Feb;34:34-8.
 11. *Lyn-Cook B.D., Yan-Sanders Y., Moore S., Hammons G.J.* Increased levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: A potential biomarker of early damage in the pancreas. *Cell Biol Toxicol* 2006 Mar;22(2):73-80.
 12. *Bartsch H., Malaveille C., Lowenfels A.B.* et al. Genetic polymorphism of N-acetyl transferases, glutathione S-transferase M1 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase in relation to malignant and benign pancreatic disease risk. The International Pancreatic Disease Study Group. *Eur J Cancer Prev* 1998 Jun; 7(3):215-23.
 13. *Zhang J., Schulz W.A., Li Y., Wang R.* Association of NAD (P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *Carcinogenesis* 2003; 24(5):905-9.
 14. *Sunaga N., Kohno T., Yanagitani N.* et al. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:730-8.
 15. *Liu C.H., Lin X.C., Xie F., Shao F., Zhu C.L., Huang Q.* NAD (P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T gene polymorphism association with digestive tract cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(4): 2349-54.
 16. *Chen J., Lin Y., Zhang R.* et al. Contribution of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser Polymorphism and Risk of Colorectal Adenoma and Colorectal Cancer in Caucasians: A Meta-analysis. *Arch Med Res* 2012;43:58-66.
 17. *Xian-E Peng, Ying-Ying Jiang, Xi-Shun Shi, Zhi-Jian H.* NQO1609C>T polymorphism interaction with tobacco smoking and alcohol drinking increases colorectal cancer risk in a Chinese population. *Gene* 2013; 105-10.
 18. *Mohelnikova-Duchonova B.* Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas* 2011 Jan.; 40(1):72-8.