

# Вклад полиморфизма (rs55754655) гена альдегидоксидазы в развитие острого панкреатита

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

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации  
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава РФ, 305041, Курск, Россия, e-mail: tass@list.ru  
Кафедра биологии, медицинской генетики и экологии;  
Кафедра хирургических болезней №2;  
Кафедра хирургических болезней ФПО

Острый панкреатит (ОП) представляет собой мультифакториальное заболевание, развитие которого определяется сложным взаимодействием множества генов и различных факторов внешней среды. Вопросы, касающиеся генетических механизмов ОП и его осложнений, изучены пока недостаточно. Важная роль в развитии острого панкреатита отводится действию токсических веществ и нарушению регуляции процессов про- и антиоксидантной защиты. Одним из прооксидантных ферментов является альдегидоксидаза (АОХ1), которая играет ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков, лекарственных средств и продуктов распада этанола. До настоящего времени ген альдегидоксидазы не рассматривался в качестве возможного кандидата предрасположенности к ОП, хотя патогенетическая значимость гена *AOX1* в отношении ОП представляется очевидной.

Целью исследования было изучение связи полиморфизма (rs55754655) гена *AOX1* с развитием ОП в русской популяции. Образцы цельной крови были собраны у 311 больных ОП и 238 здоровых. Генотипирование полиморфизма (rs55754655) гена *AOX1* выполнено методом ПЦР с дискриминацией аллелей с помощью TaqMan-зондов. Обнаружена ассоциация генотипа А/Г с развитием ОП (OR = 1,83 95% CI 1,06–3,17 p = 0,03). Проведенный стратифицированный анализ по полу показал, что генотип А/Г ассоциирован с развитием ОП у женщин (OR = 3,36 95% CI 1,25–9,01 p = 0,01). Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма в группах курящих и некурящих не установлено. Также было обнаружено, что объем и частота приема алкогольных напитков не меняли общей картины ассоциации генотипов с риском развития ОП. Однако пациенты с генотипом А/Г при употреблении алкогольных напитков в течение 10 ≥ лет имеют высокий риск развития панкреатита (OR = 2,63 95% CI 1,21–5,7, p = 0,01).

**Ключевые слова:** острый панкреатит, наследственная предрасположенность, полиморфизм (rs55754655) гена *AOX1*.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## Contribution polymorphism (rs55754655) aldehyde oxidase gene in the development of acute pancreatitis

Samgina T.A., Bushueva O.Y., Kanischev Y.V., Grigorjev S.N., Nazarenko P.M., Polonikov A.V.

Kursk State Medical University, 305000, Kursk, Russian Federation

Samgina Tatyana Alexandrovna, associate professor of the department of surgical diseases №2, e-mail: tass@list.ru

Acute pancreatitis (AP) is a multifactorial disease, the development of which is determined by a complex interaction of multiple genes and various environmental factors, questions relating to genetic mechanisms of AP and its complications have been studied are not enough. An important role in the development of acute pancreatitis is given the action of toxic substances and disruption of the regulation of pro- and antioxidant protection. One of prooxidant enzymes is aldehyde oxidase (*AOX1*), which plays a substantial role in the metabolism of xenobiotics, drugs and ethanol degradation products. Aldehyde oxidase gene was not considered as a possible candidate susceptibility to acute pancreatitis, although the pathogenetic significance of *AOX1* gene against acute pancreatitis is obvious. The aim of this study was to investigate the relationship between polymorphism (rs55754655) *AOX1* gene and risk of acute pancreatitis in Russian population. Whole blood samples were obtained from 311 AP patients and 238 healthy controls. Genotyping of polymorphisms (rs55754655) *AOX1* gene was performed through a TaqMan assay. Genotype A/G (OR = 1.83 95% CI 1.06–3.17 p = 0.03) was significantly associated with the risk of AP. Stratified analysis showed that the genotype A / G was associated with development of acute pancreatitis in women (OR = 3.36 95% CI 1.25–9.01 p = 0.01). Statistically significant differences in the frequencies of alleles and genotypes of polymorphism in groups of smokers and non-smokers are not installed. It was found that the amount and frequency of administration of alcohol did not change the overall picture of genotype associations with the risk of acute pancreatitis. However, patients with genotype A/G with a history of alcohol drinking 10 or more years have the highest risk to the developing pancreatitis (OR = 2.63 95% CI 1.21–5.7, p = 0.01).

**Keywords:** acute pancreatitis, genetic susceptibility, aldehyde oxidase, genetic polymorphism (rs55754655), reactive oxygen species.

### Введение

Острый панкреатит (ОП) представляет собой деструктивно-воспалительное поражение поджелудочной железы, в основе развития которого лежат процессы аутоферментативного некробиоза с возможным эндогенным инфицированием и вовлечением в патологический процесс тканей забрюшинного пространства, брюшной полости и систем органов внебрюшинной локализации [1]. Согласно современным представлениям об этиопатогенезе, ОП представляет собой мультифакториальное заболевание, развитие которого определяется сложным взаимодействием множества генов и различных факторов внешней среды [2]. Несмотря на то, что авторами разных стран уже установлены гены-кандидаты ОП, отвечающие за экзокринную функцию поджелудочной железы [3–6], контролирующие воспалительные процессы [8, 9], осуществляющие биотрансформацию ксенобиотиков [2, 7], тем не менее, окончательные механизмы реализации генетической предрасположенности к болезни еще остаются недостаточно изученными. Важная роль в развитии ОП отводится цитотоксическому действию свободных радикалов, повышенная генерация которых происходит вследствие нарушения регуляции процессов про- и антиоксидантной защиты, контролирующихся ферментами редокс-гомеостаза [10]. Одним из прооксидантных ферментов является альдегидоксидаза (АОХ1), которая играет ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков и лекарственных средств, содержащих ароматические азаетероциклические заместители. Фермент является представителем молибдофлавоэнзимов и участвует в процессе окисления альдегидов в соответствующие карбоновые кислоты, а также пуринов, витаминов, различных токсических веществ и фармакологических препаратов, в том числе и ацетальдегида — токсического продукта распада этанола [11]. Тот факт, что фермент экспрессируется в достаточном большом количестве в клетках поджелудочной железы, свидетельствует о его потенциальной вовлеченности в важнейшие физиологические и патологические процессы в данном органе [12]. Примечательно, что одним из субстратов АОХ1 является иммунодепрессант азатиоприн — лекарственный препарат, способный провоцировать развитие ОП [13, 14].

По всей видимости, АОХ1 вовлечен в метаболизм, имеющий важное патогенетическое значение для развития панкреатита. До настоящего времени ген альдегидоксидазы не рассматривался в качестве возможного кандидата предрасположенности к ОП, хотя его патогенетическая значимость представляется возможной.

*Целью настоящего исследования* было изучение ассоциации частого полиморфизма (rs55754655) гена *АОХ1* с риском развития ОП у жителей Курской области. Выбор данного гена для исследования был обусловлен, во-первых, его достаточно высокой экспрессией в тканях поджелудочной железы, что указывает на его важную биологическую роль в метаболизме ор-

гана, во-вторых, вовлеченностью в окисление широкого спектра эндо- и экзогенных альдегидов и панкреатического препарата азатиоприн и, в-третьих, потенциальным участием фермента в детоксикации реактивных форм кислорода, обладающих повреждающим действием на органы и ткани [15]. Полиморфизм rs55754655 представляет собой миссенс-мутацию Asn1135Ser, которая может оказывать влияние на активность фермента.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные от 311 неродственных больных острым небилиарным панкреатитом (87 женщин и 224 мужчины), находившихся на стационарном лечении в хирургических отделениях городской больницы №4 и областной клинической больницы города Курска в период с 2012 по 2015 гг. и 238 неродственных индивидов русской национальности без заболеваний ЖКТ (83 женщины и 155 мужчин). По степени тяжести болезни распределены следующим образом: легкая — 27,9%, средняя — 39%, тяжелая — 33,1%. Контрольная группа формировалась в ходе профилактических осмотров на предприятиях и государственных учреждениях, а также в стационарах ЛПУ г. Курска. Средний возраст больных составил  $48,9 \pm 13,1$  года, здоровых лиц —  $47,8 \pm 12,1$  года. Диагноз ОП устанавливался в соответствии с критериями Атланта-92 и их модификациями, предложенными в г.Кочин в 2011 г. Международной ассоциацией панкреатологов (International Association of Pancreatology) и в 2012 г. Международной рабочей группой по классификации острого панкреатита (Acute Pancreatitis Classification Working Group), с использованием общеклинических, лабораторных (общий и биохимический анализ крови) и инструментальных (УЗИ и МРТ поджелудочной железы, ЭФГДС) методов исследования [16]. Проводилось анкетирование пациентов для выяснения статуса курения, объема, частоты и длительности употребления алкогольных напитков, с последующим перерасчетом в граммы этанола и формированием в группы: курящие (275 чел.) и некурящие (274 чел.), употребляющие менее (375 чел.) и 200 г и более этанола в неделю (174 чел.), пьющие реже 1 дня в неделю (317 чел.) и 1 раз в неделю или чаще (232 чел.), употребляющие алкоголь менее 10 лет (226 чел.), 10 лет и более (323 чел.) [17].

У всех обследуемых проводили забор венозной крови для поведения молекулярно-генетического анализа и биохимических исследований. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма (rs55754655) гена *АОХ1* проводили методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) с использовани-

ем коммерческих наборов реактивов TaqMan SNP Genotyping Assays фирмы Applied Biosystems (США). Контроль качества генотипирования 10% исследованных образцов, отобранных по случайному принципу при отсутствии информации о статусе болезни, показал 100% совпадение с первоначальными данными генотипирования. Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов гена *AOXI* с риском развития ОП использовали критерий  $\chi^2$  и отношение шансов (OR) с 95% доверительными интервалами (CI). Статистический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 6.0 («StatSoft», США).

### Результаты и обсуждение

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма (rs55754655) гена *AOXI* представлены в табл. 1. Генотипы исследуемого полиморфизма находились в соответствии с распределением Харди—Вайнберга в обеих исследованных группах ( $p > 0,05$ ). Как видно из табл. 1, носительство аллеля G (OR = 1,72 95% CI 1,03—2,86  $p = 0,03$ ) и генотипа A/G ассоциировалось с повышенным риском развития ОП (OR = 1,79 95% CI 1,04—3,10  $p = 0,03$ ).

Проведенный стратифицированный анализ по полу (табл. 2) показал, что генотип A/G был ассоциирован с развитием ОП только у женщин (OR = 3,36 95% CI 1,25—9,01  $p = 0,01$ ).

Затем мы проанализировали совместное влияние генотипов изучаемого полиморфизма и факторов риска ОП (курение, частота, объем и длительность употребления алкогольных напитков) на развитие заболевания (табл. 3). Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма в группах курящих и некурящих не установлено. Также было обнаружено, что объем и частота приема алкогольных напитков не меняла общей картины ассоциации генотипов с риском развития ОП. Однако пациенты с генотипом A/G при употреблении алкогольных напитков в течение 10 и более лет имеют высокий риск развития панкреатита (OR = 2,63 95% CI 1,21—5,7,  $p = 0,01$ ).

### Обсуждение

В рамках настоящего исследования впервые обнаружена ассоциация полиморфизма (rs55754655) гена *AOXI* с повышенным риском развития ОП. Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма в группах курящих и некурящих не установлено. Также было обнаружено, что объем и частота приема алкогольных напитков не меняла общей картины ассоциации генотипов с риском развития ОП. Однако пациенты с генотипом A/G при употреблении алкогольных напитков в течение 10 и более лет имеют высокий риск развития панкреатита (OR = 2,63 95% CI 1,21—5,7,  $p = 0,01$ ).

Изучению полиморфизмов гена *AOXI* посвящено небольшое количество исследований. В частности, полиморфизм (rs55754655) гена *AOXI* изучался у 156 пациентов, перенесших трансплантацию почки и получавших в послеоперационном периоде азатиоприн [18]. Авторы исследования обнаружили, что пациенты-носители вариантного генотипа G/G нуждаются в более высоких дозах азатиоприна, что косвенно свидетельствует об увеличенной активности фермента в отношении метаболизма лекарственного препарата у носителей данного генетического варианта. Дополнительным подтверждением данного факта стали результаты другого исследования, в котором обнаружено отсутствие эффекта от лечения стандартными дозами азатиоприна пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника у носителей вариантного генотипа *AOXI* [19].

В литературе опубликованы результаты функционального исследования полиморфизмов гена *AOXI*. Было показано, что нуклеотидная замена сопровождается аминокислотной заменой Asn на Ser в 1135 положении полипептида (Asn1135Ser или 3404AG), которая расположена близко к домену димеризации и может оказывать влияние на стабильность фермента [20]. Вариантный генотип (1135AsnSer или 3404AG) связан с увеличением активности фермента за счет повышения его стабильности [20]. Можно предположить, что повышенная активность фермента у носителей генотипа 3404AG может способствовать усиленной генерации супероксидного анионного радикала, развитию окислительного стресса, повреждению митохондрий и, таким образом, способствовать запуску каскада деструктивных изменений в поджелудочной железе, вызванных высвобождением пищеварительных ферментов. Подобный механизм развития ОП предполагается на фоне лечения азатиоприном [14]. В то же время ассоциация генотипа 3404AG с повышенным риском развития ОП нами обнаружена только у женщин. Из литературы известен факт, что активность альдегидоксидазы может ингибироваться под влиянием женского полового гормона эстрадиола [21], что противоречит нашему суждению о связи повышенной активности фермента и развитием болезни. Однако можно сделать предварительный вывод о том, что ген *AOXI* можно рассматривать в качестве нового кандидатного гена предрасположенности к ОП.

Следует продолжить дальнейшее исследование по оценке вовлеченности других полиморфизмов гена *AOXI* в развитие ОП. В случае независимого подтверждения выявленной в нашей работе ассоциации в других популяциях мира, данный маркер может претендовать на роль потенциальной мишени для генетического тестирования наследственной предрасположенности к острому панкреатиту с целью выявления формирования среди населения группы повышенного риска развития болезни.

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма (rs55754655) гена AOX1  
в группах больных ОП и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОП		Здоровые лица		$\chi^2$ (p)	OR (95%CI)
	n	%	n	%		
Сравнение групп больных ОП (n = 311) и здоровых лиц (n = 238)						
A/A	263	84,6	216	90,8	—	—
A/G	46	14,8	21	8,8	<b>4,48 (0,03)</b>	1,79 (1,04-3,10)
G/G	2	0,6	1	0,4	0,12 (0,73)	1,53 (0,14-17,02)
A	0,920		0,952		<b>4,47 (0,03)</b>	1,72 (1,03-2,86)
G	0,080		0,048			

Частоты аллелей и генотипов полиморфизма (rs55754655) гена AOX1  
среди женщин и мужчин, больных ОП, и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОП		Здоровые лица		$\chi^2$ (p)	OR (95%CI)
	n	%	n	%		
Сравнение групп больных ОП (n = 87) и здоровых лиц (n = 83) среди женщин						
A/A	69	79,3	77	92,8	—	—
A/G	18	20,7	6	7,2	<b>6,35 (0,01)</b>	3,35 (1,26-8,91)
G/G	0	0,0	0	0,0		
A	0,897		0,964		<b>5,87 (0,02)</b>	3,08 (1,19-7,96)
G	0,103		0,036			
Сравнение групп больных ОП (n = 224) и здоровых лиц (n = 155) среди мужчин						
A/A	194	86,6	139	89,7	0,81 (0,37)	1,34 (0,71-2,56)
A/G	28	12,5	15	9,7	0,73 (0,39)	1,33 (0,69-2,59)
G/G	2	0,9	1	0,6	0,07 (0,79)	1,39 (0,12-15,4)
A	0,929		0,945		0,83 (0,36)	1,33 (0,72-2,43)
G	0,071		0,055			

Совместное влияние генотипов и факторов риска (длительность употребления алкогольных напитков)  
на развитие ОП

Фактор риска, генотипы	Генотипы				OR (95% CI) P-value <sup>2</sup>	
	Больные ОП		Здоровые лица		без фактора риска	с фактором риска
	без фактора риска	с фактором риска	без фактора риска	с фактором риска		
Употребление алкогольных напитков более 10 лет						
A/A	126 (84,6)	137 (84,6)	65 (84,4)	151 (93,8)	n = 226 1,04 (0,48-2,27) 0,92	n = 323 2,63 (1,21-5,7) <b>0,01</b>
A/G	22 (14,8)	24 (14,8)	11 (14,3)	10 (6,2)		
G/G	1 (0,7)	1 (0,6)	1 (1,3)	—		

## Список литературы

1. Горский ВА, Ковальчук ЛВ, Агапов МА. Антимедиаторная терапия в комплексном лечении острого деструктивного панкреатита. Хирургия.- 2010.- №3.- С.54-61.
2. LaRusch J, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis. *Curr.Opin.Gastroenterol.*- 2011.-№27.- С.467-474.
3. Cho SM, Shin S, Lee KA. 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 XT, Weng XL. et al. Comprehensive screening for PRSS1, SPINK1, CFTR, CTRC and CLDN2 gene mutations in Chinese paediatric patients with idiopathic chronic pancreatitis: a cohort study. *BMJ Open* 2013;3: e003150.
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 ТА, Бушуева ОЮ, Назаренко ПМ, Полоников АВ. Связь полиморфизма HindIII гена липопротеинлипазы с развитием острого небилиарного панкреатита: пилотное исследование. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.2016-№1.-С.92-96.
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 YW, Sun QQ, Feng JQ et al. Influence of interleukin gene polymorphisms on development of acute pancreatitis: asystematic review and meta-analysis /*Mol. Biol. Rep.*- 2013 Oct;40(10):5931-5941.
9. Самгина ТА, Бушуева ОЮ, Назаренко ПМ, Полоников АВ. Связь промоторного полиморфизма -308 G>A гена фактора некроза опухоли с тяжестью течения острого панкреатита у русской популяции жителей курской области// Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2014. — № 9. — С. 17-20.
10. Баранов ВС, Баранова ЕВ, Ивашенко ТЕ. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. — 272 с.
11. Enrico Garattini, Maddalena Fratelli, Mineko Terao. The mammalian aldehyde oxidase gene family -*HumGenomics.* 2009; 4(2): 119-130.
12. GeneAtlas U133A, gcrma
13. Floyd A, Pedersen L, Nielsen GL et al. Risk of acute pancreatitis in users of azathioprine: a population-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2003 Jun;98(6):1305-8.
14. Teich N, Mohl W, Bokemeyer B. et al. German IBD Study Group. Azathioprine-induced Acute Pancreatitis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases-A Prospective Study on Incidence and Severity.-*J Crohns Colitis.* 2016 Jan;10(1):61-8.
15. Fu C, Di L, Han X et al. Aldehyde oxidase 1 (AOX1) in human liver cytosols: quantitative characterization of AOX1 expression level and activity relationship. *Drug Metab Dispos.* 2013 Oct;41(10):1797-804.
16. Banks P.A., Bollen T.L., Dervenis C., Gooszen H.G. et al. Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus // *Gut.* 2013. Vol.62, N 1. P. 102-111.
17. Furtwaengler NA, de Visser RO. Lack of international consensus in low-risk drinking guidelines. *Drug Alcohol Rev.* 2013;32:11-18.
18. Mateusz Kurzawski, Krzysztof Dziewanowski, Krzysztof Safranow and Marek Drozdziak-The Polymorphism of Genes Involved in Purine Metabolism (XDH, AOX1, MOCOS) in Kidney Transplant Recipients Receiving Azathioprine. *Drug Monit* 2012;34:266-274.
19. Smith MA, Marinaki AM, Arenas M. et al. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.*30, P.375-384.
20. Tobias Hartmann, Mineko Terao, Enrico Garattini et al. The Impact of Single Nucleotide Polymorphisms on Human Aldehyde Oxidase. *Drug Metab Dispos.* 2012 May; 40(5): 856-864.
21. Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol.* 2004 Jan;44(1):7-19.