SARS-COV-2 вирусын халдварын хүндрэл ба *GSTT1* ген

Б.Оюундарь[1], Ж.Тэмүүжин[2], Э.Солонго[2], Б.Очирхуяг[2], М.Наранхажид[1], Ж.Хулан[2]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Биологийн тэнхим
[2]Монгол Улсын Их Сургууль, ШУС, Биологийн тэнхим
Цахим шуудан: khulan@num.edu.mn, Утас: 96643003

Түлхүүр үг:

*GSTT*1
SARS-COV-2
“Null” мутаци
Глутатион S-трансфераза

Товч утга: Амьсгалын замын хүнд хэлбэрийн цочмог хам шинжийн коронавирус 2 (SARS-COV-2)-р үүсгэгдсэн Ковид 19 өвчин нь сүүлийн үед анагаахын шинжлэх ухааны шинэ сорилт болж байна. Генетик, биохимичидийн судалгааны ажлын үр дүнд шинэ коронавирусийн геномийг тодорхойлж, оношлогоо болон оношлуур бүтээгдсэн, SARS-COV-2 вирусийн генетик өвөрмөц байдал нь халдварлах процесс болон өвчиний хүндрэлд хэрхэн нөлөөлж буйг тогтоосон байна. Тухайлбал SARS-COV-2 вирусээр халдварласан өвчтөнүүдийн генетик өвөрмөц байдал өвчний явц, хүндрэл, эндэгдэлд нөлөөлдөг талаар судалгаанууд хийгдсэн байна. SARS-COV-2 нь цитокины үүсэлт, үрэвсэл болон эмгэг физиологийн бусад идэвхийг нөхцөлдүүлдэг исэлдэлтийн стресстэй холбоотой. Исэлдэлтийн стресс нь биологийн систем дэх антиоксидант болон прооксидантын тэнцвэрт байдлын алдагдлаар тодорхойлогдоно. Исэлдэлтийн стрессийн үед гидроксил, супероксид анион, азотын исэл, нитрозил анион зэрэг хүчилтөрөгч/азотын өндөр идэвхтэй хэлбэр үүсгэн янз бүрийн эсийг онилж ДНХ, ууураг, липидийг гэмтээж SARS-COV-2-ын халдварыг оруулаад амьсгалын замын вирусын халдварын эмгэг жамыг нөхцөлдүүлдэг. SARS-COV-2 вирусын халдварын үед исэлдэлтийн стресстд орсоноор цитокинууд болон үрэвслийн бусад патофизиологийн процесс явагдана. Энэ үед GST ферментүүд глутатионы (GSH) электрофилтай холбогдох процессыг катализжуулж эсийг исэлдэн гэмтэхээс хамгаална. Үүнээс гадна уушгийг антиоксидант механизмаар хамгаалдаг байна. Бид судалгаагаараа COVID-19-ийн халдварын үед эрсдэлд оруулж байгаа GSTT1 генийн “Null” мутацийг тодорхойлов.

Үндэслэл: Хүний организм хүрээлэн буй орчноос сөргөөр нөлөөлөх бодисоос (ксенобиотик) хамгаалах нэг систем нь *GSTT*1 генээр кодлогдог глутатион-S-трансфераза энзимийн бүлэг юм[11]. GST энзим нь электрофиллик, ксенобиотикууд ялангуяа хавдрын эсрэг агент, химийн карценогенүүд, хүрээлэн буй орчныг бохирдуулагч зарим нэгдлүүдийг хоргүйжүүлэх, исэлдэлтийн стрессээс үүссэн хортой хоёрдогч метаболитууд (эндогенийн α, β- ханаагүй альдегид, хинон, эпоксид, устөрөгчийн хэт исэл) –ийг модификацид оруулан эсээс гадагшлуулах, лейкотриен ба простагландиний синтез, модификацид оролцох, арахидоны хүчлийн хэд хэдэн уламжлалууд, стеройдуудын метаболизмд гол үүрэгтэй оролцдог байна[5,6]. Дэлхийн хүн амд GSTT1+ (+/+) хэв шинж ойролцоогоор 60% харин хасах (-/-) хэв шинж 40% тархсан байдаг. SARS-CoV-2-ийн халдварын үед исэлдэлтийн стресстд орсоноор цитокинууд болон үрэвслийн бусад патофизиологийн процесс явагдана. Иймээс манай хүн амын GSTT1 генийн мутацийн түвшинг тодорхойлж COVID-19 халдварын нөлөөнөөс үүсэх эрсдлийг үнэлэх зорилгоор судалгааг гүйцэтгэв.

Зорилго: Улаанбаатар хотын хүний популяцид *GSTT*1 генийн “Null” мутаци хэрхэн илэрч байгааг судлах

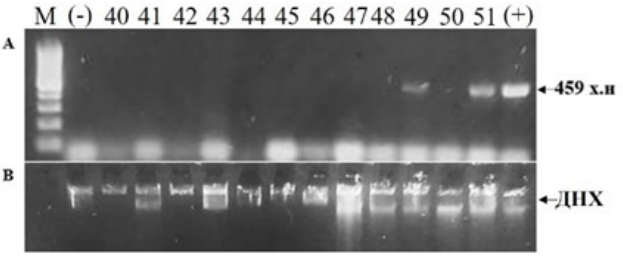
Зорилт:

1. Геномын ДНХ-г фенол-хлороформын аргаар ялгах
2. *GSTT*1 генийн “Null” мутацийг ПГУ-ыг ашиглан илрүүлэх

Арга, аргачлал: Улаанбаатарт оршин суугчдаас сайн дурын үндсэн дээр, таниулсан зөвшөөрлийн хуудастай танилцуулж зөвшөөрөл авсны дараа 100 хүн судалгаанд хамрагдсан ба насны ангиллын хувьд 18-78 насны хооронд байв. Геномын ДНХ-г фенол-хлороформын аргаар ялгав. ДНХ-ийн концентрац ба цэвэршилтийг спектрофотометрээр шалгахад OD 260/280, 260/230 байгааг цаашдын судалгаанд ашиглав. *GSTT*1 генийн “Null” мутацийг Allocati (2018) онд зохиосон праймер ашиглан Кэри Мюллисийн зохиосон ПГУ-ын арга зүйгээр тодорхойлов.

Бид Apex компанийн 2.0xTaq RED (1.5mM $MgCl_2$) цомгийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу ашигласан. Урвалын нийт эзлэхүүн 20 мклд: мастер микс 10 мкл, праймер (10 пмоль) тус бүрээс 1 мкл, ДНХ 1.5 мкл, үлдсэнд нь нэрмэл ус хийн уусгаж явуулав. ПГУ-ын урвалын нөхцөлийг преденатураци 94^0C-д 4мин, 32 цикл: 95^0C-д 1 мин, 58^0C-д 1 мин, 72^0C-д 10 мин, сүүлийн уртсах шат 72^0C-д 6 минутанд тохируулан (ArktikTM Thermal Cycler., Thermo fisher) олшруулаа. ПГУ бүтээгдэхүүнийг 1.6%-ийн агарозын гель-электрофорезоор 1xTBE ашиглан 100В-д 20 минут гүйлгэж, гель электрофорезийн зургийг авч үр дүнг баталгаажуулав.

Үр дүн: Судалгаанд нийт хамрагдсан хүмүүсийн 40% хувьд нь GSTT1 генийн делеци-тодорхойлогдсон (Зураг 1 А).



Зураг 1. А: М - Маркер, 40-51-р дээж, (–) сөрөг хяналт, (+) эерэг хяналт, В: геномын ДНХ

Судалгаагаар *GSTT*1 генийн делеци 40% байв. Генотип ба алеллийн давтамжийг хүснэгт 1-т харуулав. Бид GATT1 полиморфизмын аллелийн давтамжийг Харди-Вайнбергийн тэгшитгэлээр тооцоолов. Харди-Вайнбергийн тэгшитгэлээр аллелийн тээгчийн давтамжийг тооцоолоход: Улаанбаатар хотын оршин суугчдын GSTT1 генийн аллелийн давтамж (мажор) p= 0.6 (минор) q= 0.16 ба GSTT1 “Null” генотипын давтамж 0.400 байв. Хүлээгдэж буй аллелийг таамаглаж буй аллельтай харьцуулан хи-квадратын р утга нь 0.0177 тэнцүү байв (Хүснэгт 1). Энэ нь “Null” аллелийн давтамж өндөр байгааг харуулж байна.

Хүснэгт 1: GSTT1 генийн делецийн аллеллийн давтамж

Популяци	Сорьцийн хэмжээ	+/+	+/0	0/0	+	0	X^2
Улаанбаатар	100	0.13509	0.46491	0.4	0.36754	0.6325	0.0177

Хэлцэмж: Дэлхийн хүмүүсийн Glutathione S-transferase theta 1-тэй холболт үүсгэх чадвартай (GSTT1+) чадваргүй (GSTT1) гэж хувааж болно (8). GSTT1+ нь ойролцоогоор 60% харин хасах нь 40% байдаг. Ойролцоогоор европчуучын 20%, Азиудын 80% GSTT1-1 уургийн дутагдалтай байдаг ба энэ нь давсаг, ходоод-гэдэс, уушги гэх мэт хорт хавар үүсэх эрсдэлийг нэмдэг байна (9,10). SARS-COV-2 халдварын үед үүсэж байгаа прооксидант микро-орчин нь үрэвсэл болон дархлаа тогтолцоог идэвхижүүлж цитокины шуургыг үүсгэсэнээр эд эрхтэн гэмтэж байна гэж эрдэмтэд үзэж байна. de la Cruz-Enríquez, J (2021) нар SARS-COV-2-ийн халдварын үед исэлдэлтийн стрессийн, үрэвсэлийн болон митохондрийн дисфункцийн маркерийн түвшин нэмэгдэж байсан тухай мэдээлжээ[7].

Глутатион-S-трансфераза (GST) нь чухал Км (Km-ферментийн урвалын Михаэлсийн константт) фермен юм. GST ферментүүд глутатионы (GSH) электрофилтай холбогдох процессыг катализжуулж эсийг исэлдэн гэмтэхээс хамгаална. Ийм маягаар уушгийг антиоксидант механизмаар хамгаална. Mohammad Abbas (2021) нар COVID-19-ийн халдвар батлагдсан 269 өвчтөн дээр GSTM1, GSTT1 генийн полиморфизмын судалгааг хийсэн байна. Судалгаанд хамрагдсан 269 өвчтөний n=149 хөнгөн явцтай, n=120 хүнд явцтай байжээ. Судалгааны дүгнэлтээс харахад Cox hazard model-оор GSTT1-/-генотиптай COVID-19-ийн халдвартай өвчтөнүүдийн эндэгдэл 2,28 дахин их (p=0,047) байсан[3] бидний судалгааны үр дүнтэй дүйж байна .

Дүгнэлт:

1. Улаанбаатар хотын хүн амын дунд ксенобиотикийг хоргүйжүүлдэг глутатион-S-трансфераза-Т энзимийг кодолдог GSTT1 генийн “Null” мутаци 40% тодорхойлогдож байна.
2. SARS-COV-2 вирусийн халдварын хүндэрч байгаа өвчтөнүүдийн дунд GSTT1 генийн “Null” мутаци илэрч байгаа нь өвчлөлийн эрсдэлийн загварчлал гаргахад уг генийн делецийн давтамжийг тодорхойлох нь чухал шаардлагатай байна.

Ном зүй:

1. Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R., Groot, R.J.D., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, B.L., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W. and Penzar, D., 2020. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses–a statement of the Coronavirus Study Group. doi: https://doi.

org/10.1101/2020.02.07.93786
2. Karki, R., Sharma, B.R., Tuladhar, S., Williams, E.P., Zalduondo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banoth, B., Malireddi, R.S. and Schreiner, P., 2021. Synergism of TNF-α and IFN-γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. Cell, 184(1), pp.149-168.
3. Abbas, M., Verma, S., Verma, S., Siddiqui, S., Khan, F.H., Raza, S.T., Siddiqi, Z., Eba, A. and Mahdi, F., 2021. Association of GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms with COVID-19 susceptibility and its outcome. Journal of medical virology, 93(9), pp.5446-5451.
4. ПАНДЕМИЯ COVID-19. Под редакцией А.В. Торкунова, С.В. Рязанцева В.К. Левашовав Вызовы, последствия, противодействие. https://genetics-info.ru/interview/pandemiya-covid-19-vyzovy-i-posledstviya-dlya-genetiki/ **стр.**
5. Hayes, J.D. and Strange, R.C. "Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences" 2000. Pharmacology, 61, 154-166.
6. T.Bruning et all "Influence of polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 for risk of renal cell cancer in workers with long-term high occupational exposure to trichloroethene" SpringerLink Arch Toxicol. 1997;71(9):596-9. doi: 10.1007/s002040050432.
7. J. De la Cruz-Enríquez et al., "SARS-CoV-2 induces mitochondrial dysfunction and cell death by oxidative stress/ inflammation in leukocytes of COVID-19 patients" (IF4.148), Pub Date : 2021-12-05, DOI: 10.1080/10715762.2021.2005247 10.1021/acsami.1c06204 or Chem. Rev., 2007, 107, 2411-2502
8. Thier R et al., "Species differences in the glutathione transferase GSTT1-1 activity towards the model substrates methyl chloride and dichloromethane in liver and kidney" Arch Toxicol. 1998 Oct;72(10):622-9. [PMID: 9851677]
9. «Proposition 65 List of Chemicals» (PDF). Office of Environmental Health Hazard Assessment. 1,4-Dioxane cancer 123-91-1 January 1, 1988
10. Landi S. "Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review" Mutat Res. 2000 Oct;463(3):247-83. Review. [PMID: 11018744]
11. C.Zhao et all "DNA adducts of 1,3-butadiene in humans: relationships to exposure, GST genotypes, single-strand breaks, and cytogenetic end points" Wiley Environ Mol Mutagen 2001;37(3):226-30. doi: 10.1002/em.1031. PMID: **11317340**
12. GAVI-The Vaccine Alliance https://www.gavi.org

Association of *GSTT1* gene with COVID-19 susceptibility and its outcome

Ouyndari B[1], Temuujin J[2], Solongo E[2], Ochirkhuyag B[2], Narankhajid M[1], Khulan J[2]

[1]Department of Biology, School of Bio-medicine, Mongolian National University of Medical Sciences
[2]Department of Biology, School of Sciences and Art - Biotechnology laboratory, National University of Mongolia
E-mail: khulan@num.edu.mn, Tel: 96643003

Background: The pandemic of the new coronavirus infection not only showed all the flaws of health systems and gaps in medical science, but also catalyzed many processes. Coronavirus develops into a broad range of illnesses from asymptomatic to fatal diseases. One such problem is COVID-19 caused by oxidative stress. Oxidative stress is defined as a violation of the balance of antioxidants and prooxidants in the biological system. During oxidative stress, highly reactive oxygen/ nitrogen compounds are formed such as hydroxyl, superoxide anion, nitric oxide and nitrosyl anion, which damage DNA, proteins and lipids leading to cell death. COVID-19 infection is associated with oxidative stress that triggers cytokine production, inflammation, and other pathophysiological processes. In this process GST enzyme that catalyzes the conjugation of glutathione (GSH) with electrophiles to protect the cell from oxidative damage.

Materials and Methods: At the time of this study, 80 people were enrolled. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by using a Commercially Available Kit (Apex) and the quality/quantity of DNA was assessed by using a spectrophotometer and gel electrophoresis checked on 1% agarose gel and quantified in a biophotometer. *GSTT*1 null genotypes were detected by using polymerase chain reaction.

Results: In the study, the deletion of the *GSTT*1 gene was 40%. We calculated the allele frequency of the *GSTT*1 polymorphism using the Hardy-Weinberg equation. To calculate the allele frequency using Hardy-Weinberg equation: the allele frequency (major) of GSTT1 gene in Ulaanbaatar residents was p=0.6 (minor) q=0.16 and the frequency of GSTT1 "Null" genotype was 0.400. p-value of Chi-square was 0.0177 compared to expected allele and predicted allele.

Conclusion: Furthermore participates in the antioxidant defense mechanism in the lungs. In this study, we revealed *GSTT*1 gene Null mutation with COVID-19 susceptibility.

Keywords: GSTT1, SARS-COV-2, Null mutation, glutathione S-transferase