

УДК 616.36–002.2–022–057

ГЕНЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ CAT, GSTP1, GPX4 У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

Кривцов А. В.¹, Улитина П. В.²

¹ ФБНУ «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (614000, г. Пермь, Россия)

² ФГБОУ ВО Пермский Государственный медицинский университет имени ак. Е. А. Вагнера Минздрава РФ (614990, г. Пермь, Россия)

GENES OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF CAT, GSTP1, GPX4 AT PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

Kravtsov A.V.¹, Ulitina P.V.²

¹ Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies (614990, Perm, Russia)

² E.A. Vagner Perm State Medical University (614990, Perm, Russia)

Для цитирования: Кривцов А. В., Улитина П. В. Гены антиоксидантной системы CAT, GSTP1, GPX4 у больных хроническим вирусным гепатитом С. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;156(8): 73–77. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-73-77

For citation: Kravtsov A. V., Ulitina P. V. Genes of the antioxidant system of CAT, GSTP1, GPX4 at patients with chronic viral hepatitis C. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;156(8): 73–77. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-73-77

Кривцов Александр Владимирович — к.м.н., зав. лаб. Иммуногенетики

Улитина Полина Владимировна — аспирант кафедры патологической физиологии

Kravtsov Alexander V.— Head of Immunogenetics Laboratory, PhD in Medicine

Ulitina Polina V.— postgraduate student of the Department of pathological physiology

**Кривцов
Александр Владимирович**
Kravtsov Alexander V.
kravtsov@mail.ru

Резюме

Цель исследования: изучить полиморфизм генов AOC CAT, GSTP1, GPX4 у больных хроническим гепатитом С.

Материалы и методы: обследовано 83 больных с хроническим вирусным гепатитом С в фазе реактивации в возрасте от 18 до 70 лет и 30 здоровых лиц. Для исследования полиморфных вариантов изучаемых генов использовали методику ПЦР в реальном времени, в качестве праймеров использовали участок ДНК генов каталазы CAT (rs1001179), глутатион-S-трансферазы GSTP1 (rs1695), глутатионпероксидазы-4 GPX4 (rs713041).

Результаты: обнаружены коррелятивные между отдельными полиморфизмами генов и показателями биохимического анализа крови. Так полиморфный вариант гена GPX4 ассоциирован с наиболее низким уровнем активности глутатионредуктазы у гетерозигот, активность щелочной фосфатазы ассоциирована с полиморфизмом гена GSTP1, уровень активности каталазы в сыворотке крови коррелирует с наличием полиморфного варианта гена каталазы CAT.

Заключение: Определение кандидатных генов у пациентов с ХГС имеет предиктивное значение для изменения активности ряда ферментов АОС (ГР, каталазы) и ферментов, характеризующих токсическое поражение печени (АСТ, гамма-ГП), а следовательно, позволяет прогнозировать течение ХГС у этих больных.

Ключевые слова: Оксислительный стресс, малоновый диальдегид, глутатионтрансфераза, каталаза, ГР, ГП, хронический гепатит С

Summary

Aims. The paper studies the polymorphism of antioxidant system genes, CAT, GSTP1, GPX4, in patients with chronic hepatitis C.

Materials and methods. The paper examines 83 patients in the age from 18 to 70 with chronic hepatitis C in the reactivation phase and 30 healthy individuals. Real-time PCR methods are used to analyze polymorphic types of the studied genes, the DNA sequence of catalase genes CAT (rs1001179), glutathione-S-transferase GSTP1 (rs1695), glutathione peroxidase-4 GPX4 (rs713041) was used as the primers.

Results. Correlative relationships between separate polymorphisms of genes and indicators of biochemical analysis of blood were found. For example, a polymorphic type of the gene GPX4 is associated with the lowest level of activity of glutathione reductase in heterozygotes, the activity of alkaline phosphatase is linked with the GSTP1 gene

polymorphism, the level of catalase activity in blood serum correlates with the presence of a polymorphic type of the gene catalase CAT.

Conclusions. Identification of candidate genes in patients with HCV is predictive for changes in the activity of several enzymes of the antioxidant system (GR, catalase) and enzymes that characterize toxic liver damage (AST, gamma-GTP), and therefore allows to predict the course of HCV in these patients.

Keywords: Oxidative stress, malondialdehyde, glutathione transferase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, chronic hepatitis C

Введение

Серьезной проблемой современного здравоохранения в настоящее время остается хронический вирусный гепатит С (ХГС). Основной механизм перsistенции вируса связан с образованием мутантных штаммов, а также несостоительностью механизмов борьбы с вирусной инфекцией [1]. В процессе образования и выхода вирусных частиц липиды клеток подвергаются химической модификации, образуются активные формы кислорода (АФК). В сыворотке крови больных ХГС наблюдается накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) связанное также и со снижением активности антиоксидантной защиты (АОЗ). При нормальных физиологических условиях небольшое количество кислорода регулярно конвертируется в супероксид-анионы, перекись водорода, гидроксильные радикалы, при вирусной же инфекции в роли повреждающего фактора выступает избыточная продукция АФК, при этом антиоксидантная система организма, являясь компенсаторным механизмом, не в состоянии обеспечить полноценную защиту клеток. Нарушение защитной функции клеток, может сопровождаться увеличением вирусной экспрессии увеличением риска онкологических заболеваний [2, 5].

Основные ферменты АОЗ: супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1), глутатионпероксидаза (GPX, КФ 1.11.1.9), глутатион-s-трансфераза (КФ 2.5.1.18), каталаза (КФ 1.11.1.6). Для поддержания баланса окислительных процессов активность ферментов АОЗ генетически запрограммирована и регулируется на уровне экспрессии генов этих ферментов. Например, каталаза является ферментом, который в процессе биологического окисления разлагает перекись водорода на воду и молекулы кислорода, а также окисляет низкомолекулярные спирты

и нитриты. Активность этого фермента генетически детерминирована и при дефектах структуры гена каталазы возникает снижение её активности. По данным многих исследователей ген каталазы располагается на 11-й хромосоме (11p13) и состоит из 13 экзонов. Известно и описано 755 полиморфизмов гена CAT. Интерес ученых вызывает полиморфизм -262 C/T (rs1001179) в промоторной области гена, который детерминирует вариативность экспрессии гена каталазы с последующим изменением активности фермента. Глутатионпероксидаза способствует вступлению в реакцию перекисных радикалов, происходит образование H_2O и O_2 . Выделено 8 изоформ глутатионпероксидазы, отличающихся по локализации в клетке и субстратной специфичности (GPX1-GPX8). Генетическая изменчивость глутатионпероксидазы лежит в основе межиндивидуальной вариабельности метаболизма высокотоксичных продуктов свободно-радикального окисления. Ученые M. Nemoto и соавт. исследовали значение полиморфизма гена GPX-1 для кальцификации коронарных артерий при сахарном диабете 2 типа, и установили влияние генотипа больных сахарным диабетом на активность глутатионпероксидазы и повышенную кальцификацию коронарных артерий у больных [3]. В. П. Иванов и соавт. [4] впервые обнаружили ассоциацию полиморфизма гена GPX1 с аллергической бронхиальной астмой.

Перспективы молекулярно-генетических исследований представляются актуальной задачей по оценке полиморфизма генов АОС и ее генетических особенностей у больных ХГС.

Цель исследования: изучить полиморфизм генов АОС CAT, GSTP1, GPX4 у больных хроническим гепатитом С.

Материал и методы исследования

Проведено клинико-лабораторное обследование 83 больных с хроническим вирусным гепатитом С в фазе реактивации в возрасте от 18 до 70 лет. На основании комплекса данных клинико-лабораторного и инструментального обследования устанавливали диагноз ХГС. Образцы крови пациентов забирали из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом (6%-й раствор этилендиаминетрауксусной кислоты, ГОСТ 10652-73). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в крови у пациентов для выявления РНК HCV, также проводилось исследование серологических маркеров.

Критериями исключения из исследования явились острые и хронические заболевания любой этиологии (сердечно-сосудистой, эндокринной, мочеполовой системы, заболевания желудочно-кишечного тракта, ревматические болезни, сочетанная патология печени, вирусные заболевания другой этиологии). Контрольная группа включала 30 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с больными ХГС. Для обработки полученных данных исследований применялись методы математической статистики в программе Statistica 10.0. Для описания полученных

количественных признаков, которые имеют нормальное распределение, использовали среднее арифметическое (M) и среднеквадратичное отклонение (SD). Для показателей, не имеющих нормальное распределение, использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Количествоенную оценку линейной связи между двумя случайными величинами определяли с использованием ранговых коэффициентов корреляции Спирмена. Различия между выборками считали достоверными ($p < 0,05$).

Для исследования полиморфных вариантов изучаемых генов использовали методику ПЦР, в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени с помощью флуоресцентных меток на приборе CFX96 (BIORAD, USA), которыми предварительно помечают используемые для реакции амплификации праймеры. Для одновременной

детекции нескольких продуктов реакции используют разные флуоресцентные метки и зонды (мультиплексная ПЦР). В качестве праймеров использовали участок ДНК генов каталазы *CAT* (rs1001179), глутатион-S-трансферазы *GSTP1* (rs1695), глутатионпероксидазы-4 *GPX4* (rs713041).

Статистическая обработка данных генетического обследования осуществлялась по накопленным массивам данных отдельно по каждому гену для двух групп: опытная и контрольная. Использовались статистические методы для описания равновесия частот генотипов и аллелей генов по равновесию Харди-Вайнберга. Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) для различных моделей наследования: аддитивной, общей, мультиплективной, доминантной и рецессивной и считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

При анализе группы наблюдения и сравнении её с контрольной группой нами были выявлены показатели, статистически отличающиеся в этих двух группах, они приведены в таблице 1.

Так у больных ХГС активность АЛТ в 4,5 раза выше, чем у здоровых, содержание гамма-ГТП в 4,2 раза, ГР в 3,4 раза, АСТ в 2 раза, глутатион-S-трансферазы в 1,9 раза, СОД в 1,5 раза выше аналогичных показателей контрольной группы. Другие показатели у больных были ниже, чем в группе здоровых, так активность каталазы – в 3,2 раза и ГП – в 2,8 раза ниже. Содержание МДА выше у больных в 2 раза по сравнению с контрольной группой.

При сравнении распространенности изучаемых генов по обеим группам нами не было выявлено достоверных изменений в частотах генотипов и аллелей, хотя в изученных популяциях наблюдалось равновесие Харди-Вайнберга.

Далее нами было проведено коррелятивное изучение биохимических показателей у носителей различных аллелей и генотипов.

В результате проведенного статистического анализа нами обнаружены статистически значимые коррелятивные связи между отдельными полиморфизмами генов и показателями биохимического анализа крови. Так полиморфный вариант гена

GPX4 ассоциирован с наиболее низким уровнем активности глутатионредуктазы у гетерозигот (27,16 мкмоль/л/мин), в овердоминантной модели наследования эта ассоциация имеет величину OR = -6,69 (ДИ -11,880 – -1,50) при $p=0,025$.

Также активность щелочной фосфатазы ассоциирована с полиморфизмом гена *GSTP1*, в овердоминантной модели наследования OR = 10,14 (ДИ 1,14–19,14) при $p = 0,031$.

Кроме того, уровень активности каталазы в сыворотке крови, как и предполагалось, имеет обратную коррелятивную связь с наличием полиморфного варианта гена каталазы *CAT* (OR = -2.18 (ДИ -4,06 – -0,29, $p = 0,028$).

Нами был проведен анализ взаимосвязи между наличием полиморфизмов сразу по трем генам (анализ гаплотипов) и биохимическими показателями крови. Выявлены ассоциации между генотипами изученных генов и следующими показателями: общий белок, СОЭ, активность АСТ, глутатионредуктазы, каталазы, гамма-глутатионпероксидазы, концентрации общего билирубина (результаты представлены в таблице 2).

Таким образом, наиболее неблагоприятным вариантом для протекания хронического вирусного гепатита является наличие у пациента одновременно трех аллелей (*GSTP1* – G, *GPX4* – C, *CAT* – A).

Биохимический показатель	Здоровые (M±s)	Больные ХГС (M±s)	P
Общее кол-во, N	26	83	
АЛТ, Е/л	17,09±8,42	78,00±55,00	<0,01
АСТ, Е/л	21,19±6,91	50,00±34,00	<0,01
МДА, мкмоль/л	20,0±12,3	39,0±26,0	<0,01
Гамма-ГТП, Е/л	1,42±0,58	6,00±3,00	<0,01
СОД, Ед/мг белка	27,80±7,68	41,00±13,00	<0,01
Каталаза, мккат/л	30,00±11,00	9,34±3,57	<0,01
Глутатионпероксидаза, мкмоль/л/мин	25,30±5,23	9,00±5,00	<0,01
Глутатионредуктаза, мкмоль/л/мин	8,00±4,00	27,38±6,19	<0,01
Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/л/мин	10,89±1,81	20,59±5,39	<0,01

Таблица 1.
Биохимические показатели крови больных ХГС в сравнении с группой здоровых (M±s)

Таблица 2.

Анализ гаплотипов при изменении биохимических показателей у больных ХГС

Показатель	GSTP1	GPX4	CAT	OR (ДИ)	p
Общий белок	G	C	A	8,1 (2,07–14,3)	0,01
СОЭ	G	C	A	18,99 (9,78–28,2)	0,00012
АСТ	G	T	A	54,02 (17,88–90,16)	0,0042
Общий билирубин	G	C	A	10,22 (0,06–20,37)	0,051
Гамма-ГТП	G	T	A	-4,98 (-9,58– -0,39)	0,036
ГлР	A	C	A	11,15 (2,63–19,66)	0,012
катализы	A	T	A	-3,96 (-7,48– -0,44)	0,03

Обсуждение полученных результатов

Повышение активности антиокислительных ферментов – СОД и ГР является адаптивной реакцией организма, направленной на уменьшение интенсивности окислительного стресса при ХГС, степень повышения также взаимосвязана с интенсивностью цитолиза гепатоцитов.

Уменьшение активности КАТ и ГП указывает на частичное истощение АОС у больных в фазе реактивации ХГС, при этом активность КАТ снижается по мере нарастания цитолиза и активации ПОЛ, ГП также демонстрирует обратную взаимосвязь с уровнем МДА.

Усиление пероксидации липидов не сопровождается адекватным ростом активности ферментов АОС, что свидетельствует о дисбалансе и в целом о неэффективности антиоксидантной защиты на фоне окислительного стресса при ХГС.

Изменение биохимических показателей, отражающих состояние антиоксидантной системы и характеризующих степень повреждения гепатоцитов, говорит о дезадаптивном нарушении антиоксидантной системы (снижение активности катализы и ГП) и повышении продуктов перекисного

окисления липидов (повышение МДА), а также увеличении на этом фоне токсического поражения печени (повышение активности АЛТ, АСТ, гамма-ГТП). Эти же изменения описываются в известных источниках [2, 6].

Нами впервые проведен корреляционный анализ между содержанием отдельных биохимических показателей и генотипом. Этот анализ показал закономерные взаимосвязи между активностью фермента каталазы и полиморфными вариантами гена CAT, что также описано в литературе.

Проведенный нами анализ гаплотипов, выявил интересные взаимосвязи между отдельными генетическими вариантами, устойчиво существующими в популяции и биохимическими изменениями у индивидуумов, их несущими. Нами выявлен наиболее неблагоприятный вариант генотипа для протекания хронического вирусного гепатита (GSTP1 – G, GPX4 – C, CAT – A). У пациентов с этим гаплотипом наиболее высокие показатели токсического поражения печени, снижение антиоксидантной защиты.

Выводы

Таким образом, у больных ХГС имеет место активация ПОЛ, сопровождающаяся увеличением образования МДА в сыворотке крови, что коррелирует с выраженной синдрома цитолиза (увеличение активности АЛТ, АСТ) и позволяет судить о тяжести поражения печени. Определение кандидатных

генов у пациентов с ХГС дает возможность предсказать изменение активности ряда ферментов АОС (ГР, каталазы) и ферментов, характеризующих токсическое поражение печени (АСТ, гамма-ГТП), а следовательно, прогнозировать течение ХГС у этих больных.

Литература | Reference

1. Пименов Н. Н., Чуланов В. П., Комарова С. В. и др. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора. // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012; 3:4–10.
Pimenov N.N., Chulanov V.P., Komarova S. V. Gepatit S v Rossii: ehpidemiologicheskaya harakteristika i puti sovershenstvovaniya diagnostiki i nadzora. [Hepatitis C in Russia: epidemiological characteristics and ways to improve diagnosis and supervision]. Ehpidemiologiya i infekcionnye bolezni – [Epidemiology and infectious diseases], 2012, no. 3, pp. 4–10.
2. Liu G, Zhou W, Wang LI, Park S, Miller DP, Xu LL, Wein JC, Lyneh TJ, Christiani DC. MPO and SOD2 polymorphisms gender and the risk of non-small cell lung carcinoma. // Cancer Lett. 2004; 214:69–79.
3. Nemoto M., Nishimura R., Sasaki T. et al. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. // Cardiovasc Diabetol. 2007 Sep 7; 6:23.
4. Иванов В. П., Полоников А. В., Солодилова М. А., Панфилов В. И. Ферменты антиоксидантной системы и мультифакториальные заболевания: роль гена селензависимой глутатионпероксидазы в формировании предрасположенности к аллергической форме бронхиальной астмы. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2006; 4: 39–45.
Ivanov V.P., Polonikov A. V., Solodilova M. A., Panfilov V. I. Fermenty antioksidantnoj sistemy i mul'tifaktori'nye zabolевaniya: rol' gena selenzavisimoj glutationperoksidazy v formirovaniy predraspolozhennosti

- k allergicheskoy forme bronhial'noj astmy. [Antioxidant enzymes and multifactorial diseases: the role of the gene of the antioxidant glutathione peroxidase in the formation of the allergic form of asthma]. Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik "Chelovek i ego zdorov'e" – [Kursk scientific and practical Bulletin "Man and his health"], 2006, no. 4, pp. 39–45.
5. Плахтий Л. Я., Нагоев Б. С., Отараева Б. И., Тадеевва А. К., Чховребов А. Ч. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у больных хроническим вирусным гепатитом С // Успехи современного естествознания.– 2010.– № 9.– с. 141–143.
 6. Булатова И. А., Щекотова А. П., Кривцов А. В. и др. Метаболические нарушения и полиморфизм генов β -2-адренергического рецептора и аполипопротеина В при хроническом гепатите С и неалкогольной жировой болезни печени. // Клиническая медицина.– 2015.– Т. 93, № 1.– С. 35–41.
- Plahtij L. YA., Nagoev B. S., Otaraeva B. I., Tadeeva A. K., Ckhovrebov A. CH. Perekisnoe okislenie lipidov i antioksidantnaya zashchita u bol'nyh hronicheskym virusnym hepatitom S. [Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with hronicheskiy hepatitis C].*
- Bulatova I. A., Shchekotova A. P., Krivcov A. V. Metabolicheskie narusheniya i polimorfizm genov ?-2-adrenergicheskogo receptora i apolipoproteina V pri hronicheskem hepatite S i nealkogol'noj zhirovoj bolezni pecheni. [Metabolic disorders and polymorphism of the genes of ?-2-adrenergic receptor and apolipoprotein B in chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease]. Klinicheskaya medicina – [Clinical medicine], 2015, v. 93, no. 1, pp. 35–41.*