

М.А.Солодилова¹, В.П.Иванов¹, А.В.Полоников¹, И.В.Хорошая¹, М.А.Кожухов², В.И.Панфилов²

Влияние полиморфизма Pro198Leu гена глутатионпероксидазы 1-го типа на риск развития аллергической бронхиальной астмы у мужчин

1 — кафедра медицинской биологии, генетики и экологии Курского государственного медицинского университета

2 — Курская областная клиническая больница

M.A.Solodilova, V.P.Ivanov, A.V.Polonikov, I.V.Khoroshaya, M.A.Kozhukhov, V.I.Panfilov

The impact of Pro198Leu polymorphism in the glutathione peroxidase-1 gene on risk of atopic asthma in males

Summary

The purpose of our pilot study was to investigate the association between Pro198Leu polymorphism in the glutathione peroxidase-1 gene (GPX1) and susceptibility to atopic and non-atopic asthma in Russian residents of the Central region of Russia. Blood samples from 213 asthmatics and 205 healthy controls matched on gender and age were analyzed for P198L polymorphism of the GPX1 gene using PCR-RFLP methods. The association of 198Pro/Leu GPX1 genotype (OR = 1,53; $p = 0,05$) with susceptibility to atopic BA was found. However, the 198Pro/Leu genotype of the glutathione peroxidase-1 gene was found to be associated with atopic BA in males only (OR = 2,21; $p = 0,01$).

Резюме

Впервые изучена связь полиморфизма Pro198Leu гена глутатионпероксидазы-1 (GPX1) с развитием аллергической и неаллергической форм бронхиальной астмы (БА). Материалом для исследования послужила популяционная выборка русских жителей Центрально-Черноземного региона России (213 больных БА и 205 здоровых добровольцев). Генотипирование полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и посредством анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Установлено, что частота гетерозигот 198L/P была выше среди больных аллергической БА, чем среди здоровых индивидов (OR = 1,53; $p = 0,05$). Однако обнаруженная нами впервые ассоциация полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 с аллергической БА была характерна только для мужчин (OR = 2,21, $p = 0,01$).

Введение

В последнее время значительно возросло число публикаций о вкладе окислительного стресса в этиологию и патогенез бронхиальной астмы (БА) [1–5]. Изучение полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы, контролирующих активность свободнорадикального окисления и предотвращающих окислительный стресс (ОС), все чаще становится объектом исследований молекулярно-генетических механизмов развития различных мультифакториальных заболеваний [6–8]. Однако работ, в которых описана генетическая изменчивость ферментов антиоксидантной защиты при БА, пока немного. Среди ферментов антиоксидантной системы при БА наиболее изучен полиморфизм генов семейства глутатион-S-трансфераз, обеспечивающих резистентность клеток и тканей к токсическим веществам и продуктам перекисного окисления липидов [9–11]. При этом генетическая изменчивость ключевых антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы и др.) при различных клинко-патогенетических вариантах БА по-прежнему находится на периферии основного направления исследований. В данной работе нами впервые изучена связь распространенного полиморфизма Pro198Leu гена глутатионпероксидазы 1-го

типа (GPX1) с подверженностью аллергической и неаллергической формам БА.

Материалы и методы

Исследование проводили на материале популяционной выборки русских жителей Центрально-Черноземного района России. Обследованы 213 больных БА, находившихся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Курской областной клинической больницы в период 2003–2004 гг. Контрольная группа включала 205 здоровых добровольцев и не отличалась от группы больных БА по полу и возрасту ($p > 0,05$). Диагноз БА верифицировали согласно критериям ВОЗ: наличие характерного анамнеза, типичных клинических симптомов астмы, атопии (аллергический анамнез, положительные скарификационные аллергопробы) [12]. Кожные аллергопробы выполняли по стандартным методикам с помощью наборов аллергенов ОАО "Биомед" им. И.И.Мечникова. Для молекулярно-генетических исследований у всех обследуемых осуществляли забор венозной крови в сухие пластиковые пробирки объемом 5 мл с 0,5 мл 0,5 М ЭДТА, после чего образцы замораживали при -20°C . Геномную ДНК

выделяли стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции с последующей преципитацией ДНК 96%-ным этанолом. Генотипирование полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 проводилось методами ПЦР-ПДРФ. Для амплификации интересующего участка гена GPX1 использовали пары праймеров:

F: 5'-TGTGCCCCCTACGGTACA-3'

и R: 5'-CCAAATGACAATGACACAGG-3' [7].

После амплификации продукты ПЦР размером 337 пар нуклеотидов подвергали гидролизу 5 ед. эндонуклеазы AраI (ООО "Сибэнзим", г. Новосибирск) и инкубировали в течение 16 часов при температуре 37 °С. Продукты гидролиза фракционировали в 2%-ном агарозном геле с этидиумбромидом и визуализировали в проходящем УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе GDS-8000 (UVP, США). Распределение частот генотипов на соответствие равновесию Харди–Вайнберга в изучаемых группах тестировали с помощью критерия χ^2 . Различия в распределении частот аллелей и генотипов GPX1 между группами здоровых и больных БА оценивали посредством критерия χ^2 . Для анализа ассоциации аллелей и генотипов GPX1 с риском развития БА рассчитывали отношения шансов (OR) с 95%-ными доверительными интервалами (CI). Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программ *Statistica 6.0* и *Excel 2002*.

Результаты

Частоты генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 соответствовали равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$) в группах больных БА и здоровых индивидов. Частоты вариантных аллелей 198Leu в общей группе больных БА и контроля составили 0,343 и 0,300 соответственно. Как видно из табл. 1, статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов гена GPX1 между группами здоровых и

больных БА не установлено ($p > 0,05$). Однако среди последних наблюдалась явная тенденция к увеличению частоты гетерозиготного генотипа 198L/P и снижению частоты генотипа дикого типа 198P/P гена GPX1 в сравнении с группой контроля ($\chi^2 = 3,02$; $df = 1$; $p = 0,08$). Была проанализирована частота аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена глутатионпероксидазы-1 отдельно у больных аллергической и неаллергической формами БА (табл. 1). Частота вариантного аллеля 198Leu была несколько выше у больных аллергической БА (0,361), чем у здоровых (0,300), хотя различия не достигали 95%-ного статистического уровня значимости ($p = 0,08$). Частота гомозигот 198P/P дикого типа в группе больных аллергической БА была ниже, чем в контрольной группе ($\chi^2 = 4,60$; $p = 0,03$; OR = 1,59; 95 % CI 1,04–2,42). Кроме того, установлена ассоциация гетерозиготного генотипа 198L/P с предрасположенностью к аллергической форме БА ($\chi^2 = 3,97$; $p = 0,05$; OR = 1,53; 95 % CI 1,01–2,34). Как видно, значения величин отношений шансов были выше 1, следовательно, мутантный аллель 198Leu гена глутатионпероксидазы-1 ассоциирован с повышенным риском развития аллергической БА ($p < 0,05$). При этом статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 между группами здоровых и больных неаллергической формой БА не установлено ($p > 0,05$).

Как известно, в формировании предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям большее значение имеет половой диморфизм, который может проявляться существенными различиями в характере генетической детерминации той или иной патологии у мужчин и женщин. В этой связи представлялось важным изучить особенности распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 при двух клинико-патогенетических вариантах БА отдельно у мужчин и женщин. В табл. 2 представлены частоты аллелей и генотипов

Таблица 1
Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 в группах больных БА и здоровых индивидов

Исследуемые группы	Частоты аллелей Pro198Leu GPX1		Частоты генотипов Pro198Leu GPX1		
	198P	198L	198P / P	198L / P	198L / L
Общая выборка больных БА					
Больные БА (n = 213)	0,657	0,343	90 (42,3)	100 (46,9)	23 (10,8)
Здоровые (n = 205)	0,700	0,300	104 (50,7)	79 (38,5)	22 (10,7)
Критерий различий, χ^2 (p)	1,75 (0,19)	3,02 (0,08)	3,02 (0,08)	0,00 (0,98)	
Выборка больных аллергической БА (аБА)					
Больные аБА (n = 155)	0,639	0,361	61 (39,4)	76 (49,0)	18 (11,6)
Здоровые (n = 205)	0,700	0,300	104 (50,7)	79 (38,5)	22 (10,7)
Критерий различий, χ^2 (p)	3,02 (0,08)	4,60 (0,03)*	3,97 (0,05)*	0,07 (0,79)	
Выборка больных неаллергической БА (нБА)					
Больные нБА (n = 55)	0,691	0,309	26 (47,3)	24 (43,6)	5 (9,1)
Здоровые (n = 205)	0,700	0,300	104 (50,7)	79 (38,5)	22 (10,7)
Критерий различий, χ^2 (p)	0,03 (0,85)	0,21 (0,65)	0,47 (0,49)	0,01 (0,92)	

Примечание: * — статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$.

полиморфизма Pro198Leu гена глутатионпероксидазы-1 в группах здоровых и больных БА мужчин. В общей выборке больных БА мужчин отмечена тенденция к увеличению частоты гетерозиготных носителей генотипа 198L/P GPX1 ($\chi^2 = 2,90$; $df = 1$; $p = 0,09$). Частота гетерозиготного генотипа 198L/P GPX1 была более чем в два раза выше у больных аллергической БА, чем у здоровых мужчин ($\chi^2 = 6,04$; $p = 0,01$; OR = 2,21; 95 % CI 1,17–4,19). Гомозиготных носителей генотипа 198P / P в группе больных аллергической БА было в два раза меньше, чем в контроле ($\chi^2 = 4,57$; $p = 0,03$; OR = 2,01; 95 % CI 1,06–3,81). Частоты аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 в группах здоровых и больных неаллергической БА не различались ($p > 0,05$). Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 между группами женщин, здоровых и больных различными клинико-патогенетическими вариантами БА, не выявлено.

Обсуждение

Селен-зависимая глутатионпероксидаза — один из главных внутриклеточных антиоксидантных ферментов, экспрессирующихся во всех тканях, в том числе в бронхиальном дереве и легких [13]. Основной функцией фермента является защита биологических мембран и внутриклеточных органелл от окислительного повреждения перекисями водорода, органическими гидроперекисями, гидроперекисями жирных кислот и фосфатидилхолина [14]. Генетическая изменчивость глутатионпероксидаз лежит в основе межиндивидуальной вариативности метаболизма высокотоксичных продуктов свободнорадикального окисления. Установлено, что ферментативная активность мутантного аллеля 198Leu гена GPX1 (наличие лейцина в 198 положении полипептидной цепи фермента) на 40 % меньше, чем у аллеля дикого типа

198Pro (пролин в 198 положении) [6]. В этой связи можно полагать, что выявленную нами у мужчин, больных аллергической БА, высокую частоту аллеля 198Leu с пониженной функциональной активностью GPX1 можно рассматривать как причину недостаточного обезвреживания накапливающихся в результате ОС гидроперекисей — основных субстратов глутатионпероксидаз. Когда продукция реактивных форм кислорода превышает способность пораженной ткани нейтрализовать их влияние, истощение внутриклеточного содержания глутатиона приводит к формированию ОС [15], а реактивные метаболиты становятся причиной повреждения тканевых структур бронхиального дерева и легких с последующим развитием воспалительного процесса. Недавно были описаны механизмы вовлечения бронхиального дерева в патологический процесс. Так, в протеомных исследованиях белков-маркеров ОС выявили, что под влиянием прооксидантов макрофаги и эпителиальные клетки демонстрируют три уровня проявления ОС (рисунок) [15]. Данная иерархическая модель показывает, каким образом усиливается проявление ОС от защитного (1-й уровень) до повреждающего (3-й уровень) эффектов. Как видно из рисунка, на 1-м уровне ОС клетки отвечают увеличением экспрессии антиоксидантных ферментов и ферментов биотрансформации ксенобиотиков (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы, НАДФ-Н-квинаноксидоредуктазы, гемоксигеназы-1) посредством транскрипционной активации ядерного регуляторного фактора 2 (Nrf2). Активация этого пути защищает клетки от повреждающего и провоспалительного эффектов токсических веществ, а ослабление системы антиоксидантной защиты, связанное с наличием полиморфных аллелей их генов, может лежать в основе индивидуальной подверженности отдельных групп людей действию химических агентов, вызывающих ОС. На 2-м уровне при

Таблица 2
Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма Pro198Leu гена GPX1 в группах мужчин, больных БА, и здоровых мужчин

Исследуемые группы	Частоты аллелей Pro198Leu GPX1		Частоты генотипов Pro198Leu GPX1		
	198P	198L	198P / P	198L / P	198L / L
Общая выборка мужчин больных БА					
Больные БА (n = 93)	0,656	0,344	39 (41,9)	44 (47,3)	10 (10,8)
Здоровые (n = 102)	0,706	0,294	54 (52,9)	36 (35,3)	12 (11,8)
Критерий различий, χ^2 (p)	1,12 (0,29)	2,36 (0,12)	2,90 (0,09)	0,05 (0,82)	
Выборка мужчин больных аллергической БА					
Больные аБА (n = 64)	0,633	0,367	23 (35,9)	35 (54,7)	6 (9,4)
Здоровые (n = 102)	0,706	0,294	54 (52,9)	36 (35,3)	12 (11,8)
Критерий различий, χ^2 (p)	1,92 (0,17)	4,57 (0,03)*	6,04 (0,01)*	0,05 (0,82)	
Выборка мужчин больных неаллергической БА					
Больные нБА (n = 28)	0,696	0,304	15 (53,6)	9 (32,1)	4 (14,3)
Здоровые (n = 102)	0,706	0,294	54 (52,9)	36 (35,3)	12 (11,8)
Критерий различий, χ^2 (p)	0,02 (0,89)	0,00 (0,95)	0,01 (0,93)	0,00 (0,97)	

Примечание: * — обозначены статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$.

усилении ОС происходит активация некоторых внутриклеточных сигнальных каскадов (в частности, трех главных митоген-активирующих протеинкиназных путей), приводящих к транскрипционной активации генов провоспалительных цитокинов, для многих из которых вовлеченность в патогенез БА уже доказана. Таким образом, усиливается продукция фактора некроза опухоли- α , IL-6, 8, сосудистого эндотелиального ростового фактора и др., вызывающих воспаление дыхательных путей и потенцирующих иммунопатологические эффекты классических Th2-цитокинов (IL-4, 5 и 13), индукция которых может быть напрямую вызвана сочетанным воздействием токсикантов и аллергенов на эпителиальные клетки бронхияльного дерева. По-видимому, последняя особенность может лишь частично объяснять природу ассоциации полиморфизма L198P гена GPX1 преимущественно с аллергической формой БА. Третий уровень ОС вовлекает в патологический процесс митохондрии, вызывая их структурное повреждение и приводя к формированию супероксидных анионов, апоптозу и некрозу клеток. Эта модель ОС наглядно демонстрирует важнейшую защитную роль индукции ферментов антиоксидантной системы (в том числе и глутатионпероксидазы) в предупреждении деструктивно-воспалительных изменений дыхательных путей, занимающих важное место в патогенезе БА [1–3].

Ассоциация полиморфизма L198P гена глутатионпероксидазы-1 с аллергической БА у мужчин установлена впервые. В этой связи ген GPX1 можно рассматривать как новый кандидатный ген аллергической БА, по крайней мере, в русской популяции. С практической точки зрения, полученные данные о его вовлеченности в формирование астматического фенотипа могут быть полезны для разработки генотип-специфической терапии заболевания и, в частности, применения препаратов селена (биологический кофактор глутатионпероксидазы-1) у лиц с генетически детерминированной низкой активностью фермента [7]. Кроме того, изученный генетический маркер

имеет хороший потенциал в отношении прогноза риска развития аллергической БА у мужчин ($OR > 2$) и может применяться при формировании групп повышенного риска заболевания в практике медико-генетического консультирования.

Литература

1. Deaton C.M. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Rep.* 2006; 11 (2): 46–52.
2. Talati M., Meyrick B., Peebles R.S. Jr. et al. Oxidant stress modulates murine allergic airway responses. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40 (7): 1210–1219.
3. Rahman I., Biswas S.K., Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 533 (1–3): 222–239.
4. Mak J.C., Chan-Yeung M.M. Reactive oxidant species in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2006; 12 (1): 7–11.
5. Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005; 4 (4): 505–509.
6. Hamanishi T., Furuta H., Kato H. et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2004; 53: 2455–2460.
7. Hu Y.J., Diamond A.M. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res.* 2003; 63: 3347–3351.
8. Mitrinen K., Sillanpaa P., Kataja V. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2001; 22 (5): 827–829.
9. Вавилин В.А., Часовникова О., Ляхович В.В. и др. Генетический полиморфизм глутатион-S-трансферазы M1 и T1 у детей, больных бронхиальной астмой. *Вопр. мед. химии* 2000; 46 (4): 388–397.
10. Иващенко Т.Э., Сиделева О.Г., Петрова М.А. и др. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме. *Генетика* 2001; 37 (1): 107–111.
11. Иванов В.П., Полоников А.В., Солодилова М.А. и др. Анализ ассоциации делеционных полиморфизмов генов глутатион S-трансфераз GSTM1 и GSTT1 с предрасположенностью к бронхиальной астме и особенностями ее клинических проявлений в курской популяции. *Человек и его здоровье* 2005; 3: 49–55.
12. Бронхиальная астма. Глобальная стратегия: Совместный доклад Национального института Сердце, Легкие, Кровь и Всемирной организации здравоохранения. *Пульмонология* 1996; прил.: 1–166.
13. Arthur J.R. The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; 57: 1825–1835.
14. Flohe L. The selenoprotein glutathione peroxidase. In: *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. New York: Wiley; 1989. 643–732.
15. Gilmour M.I., Jaakkola M.S., London S.J. et al. How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. *Environ. Hlth Perspect.* 2006; 114 (4): 627–633.

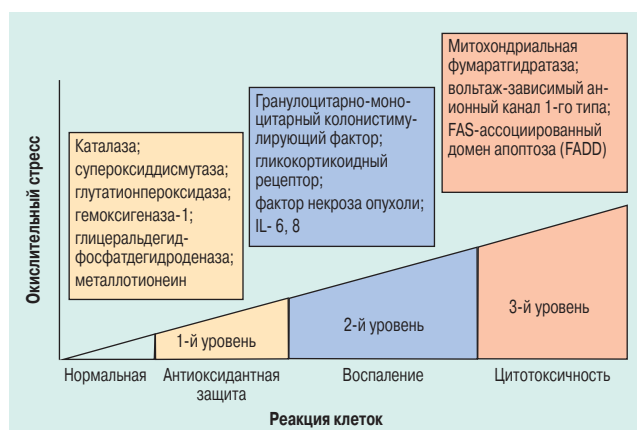


Рисунок. Иерархическая модель реакции клеток на ОС (по Li N. et al. 2003 и Xiao G.G. et al. 2003) [15]

Поступила 11.10.06

© Коллектив авторов, 2007

УДК 616.248-056.3-055.1-092