

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 575.2+577.112.3]-0.53.2(571.13)

DOI: 10.17816/pmj36433-38

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА GCLC НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.Б. Павлинова¹, И.А. Киришина^{1}, Е.И. Курмашева¹, Н.Ю. Власенко¹,
А.Г. Мингаирова¹, О.А. Савченко¹, А.В. Индутный², Д.Г. Новиков³*

¹Омский государственный медицинский университет,

²Академический центр лабораторной диагностики Омского государственного
медицинского университета,

³Центральная научно-исследовательская лаборатория Омского государственного
медицинского университета, Россия

INFLUENCE OF POLYMORPHISM OF THE GENE GCLC ON ANTIOXIDANT DEFENSE STATUS IN HEALTHY CHILDREN OF OMSK REGION

E.B. Pavlinova¹, I.A. Kirshina^{1}, E.I. Kurmasheva¹, N.Yu. Vlasenko¹,
A.G. Mingairova¹, O.A. Savchenko¹, A.V. Indutnyi², D.G. Novikov³*

¹Omsk State Medical University,

²Academic Center of Laboratory Diagnosis "Omsk State Medical University",

³Central Research Laboratory "Omsk State Medical University", Russian Federation

Цель. Изучить состояние антиоксидантной защиты у здоровых детей, проживающих в Омской области, в зависимости от полиморфизма гена GCLC.

Материалы и методы. Обследовано 50 здоровых детей в возрасте от 3 до 17 лет, из них 54 % мальчиков. Определялись полиморфизм гена GCLC 129C/C, 129C/T, 129T/T и концентрация восстановлен-

© Павлинова Е.Б., Киришина И.А., Курмашева Е.И., Власенко Н.Ю., Мингаирова А.Г., Савченко О.А., Индутный А.В., Новиков Д.Г., 2019

тел.: +7 (3822) 36 28 35

e-mail: kirshina-irina@mail.ru

[Павлинова Е.Б. – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой госпитальной педиатрии; Киришина И.А. (*контактное лицо) – ассистент кафедры госпитальной педиатрии; Курмашева Е.И. – аспирант кафедры госпитальной педиатрии; Власенко Н.Ю. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной педиатрии; Мингаирова А.Г. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной педиатрии; Савченко О.А. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной педиатрии; Индутный А.В. – доктор медицинских наук, доцент, руководитель; Новиков Д.Г. – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий].

ного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона. Статистический анализ выполнялся в программах Statistica 6.0 и DoctorStat1.9.

Результаты. Полиморфизм гена GCLC был представлен генотипами 129C/C (43 ребенка, 86 %) и 129C/T (7 детей, 14 %). Концентрация GSH находилась в пределах 6,0 мкмоль/л [4,4; 7,0], концентрация GSSG – 3,0 мкмоль/л [2,3; 3,5], соотношение GSH:GSSG составило 2:1. Установлены слабые прямые взаимосвязи между возрастом детей и содержанием GSH ($r = 0,31$; $p = 0,028$) и GSSG ($r = 0,31$; $p = 0,031$), гендерных различий не выявлено. У лиц с генотипом 129C/T определялось снижение концентрации GSH ($p = 0,017$) и GSSG ($p = 0,016$) в плазме крови на 30 %.

Выводы. Концентрация глутатиона у детей зависит от полиморфизма гена GCLC.

Ключевые слова. Дети, глутатион, полиморфизм генов

Aim. To study the status of antioxidant defense in healthy children, living in Omsk Region, depending on polymorphism of the gene GCLC.

Materials and methods. There were examined 50 healthy children aged 3 to 17 years, including 54 % of boys. Polymorphism of the gene GCLC 129C/C, 129C/T, 129T/T and reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations were determined. Statistical analysis was implemented using the programs «Statistica 6.0 and DoctorStat1.9.

Results. Polymorphism of the gene GCLC was represented by the genotypes 129C/C (43 children, 86 %) and 129C/T (7 children, 14 %); GSH concentration was within 6.0 [4.4; 7.0] mcmol/l, GSSG concentration – 3.0 [2.3; 3.5] mcmol/l, GSH:GSSG ratio was 2:1. Weak direct correlation between the child age and GSH ($r = 0,31$; $p = 0.028$) and GSSG ($r = 0.31$; $p = 0.031$) content was established; no gender differences were revealed. Among the subjects with the genotype 129C/T, the blood plasma GSH ($p = 0.017$) and GSSG ($p = 0.016$) concentrations decreased by 30 %.

Conclusions. Glutathione concentration in children depends on polymorphism of the gene GCLC.

Key words. Children, glutathione, gene polymorphism.

ВВЕДЕНИЕ

Глутатион является одним из основных антиоксидантов, обеспечивающих защиту организма от свободных радикалов. Нейтрализуя активные формы кислорода, две молекулы восстановленного глутатиона (GSH) отдают по одному электрону каждая и превращаются в окисленный глутатион (GSSG) [7].

Значительная часть работ, освещающих особенности гомеостаза глутатиона у здоровых лиц, выполнена более 20 лет назад на взрослых добровольцах, единичные публикации затрагивают данную проблему у детей [8, 9, 14]. Установлено, что концентрация GSH в органах и тканях существенно варьируется, в плазме крови она находится в пределах 2–20 мкмоль/л [10]. Содержание GSSG поддерживается на существенно более низких значениях [7].

Соотношение GSH:GSSG рассматривается как первичный маркер оксидативного стресса: его повышение до 3–4 порядков свидетельствует о снижении антиоксидантного потенциала организма и повышении риска окислительного повреждения клетки [2, 13], что может служить предрасполагающим фактором к развитию ряда заболеваний. Описан дисбаланс уровня глутатиона у лиц с болезнью Паркинсона, злокачественными новообразованиями, патологией легких, печени, а также при старении [15].

Ведущим ферментом, регулирующим скорость образования и концентрацию глутатиона в организме, является глутатионцистеинлигаза [12, 13, 16]. Она состоит из каталитической (GCLC) и регуляторной (GCLM) субъединиц. Имеются немногочисленные данные о зависимости продукции глутатиона от экспрессии гена GCLC [12].

В связи с совершенствованием подходов к персонализированной терапии актуальной задачей является идентификация генотипов однонуклеотидных полиморфных маркеров у здоровых лиц и при различных заболеваниях [1, 3, 4, 6]. Частота встречаемости полиморфизма GCLC у детей требует дальнейшего изучения.

Цель исследования – изучить состояние антиоксидантной защиты у здоровых детей, проживающих в Омской области, в зависимости от полиморфизма гена GCLC.

Задачи исследования:

- определить частоту встречаемости полиморфизма гена GCLC у здоровых детей с учетом их возраста и пола;
- установить особенности изменения концентрации GSH и GSSG и их отношения у здоровых детей с учетом возраста и пола;
- выявить изменения концентрации GSH и GSSG в зависимости от полиморфизма гена GCLC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнено одномоментное исследование методом поперечного среза.

Критерии включения: возраст от 3 до 17 лет, наличие информированного согласия родителей. Критерии исключения: наличие острых заболеваний, хроническая соматическая патология. Минимальное количество наблюдений определено с помощью номограммы Альтмана.

Забор крови у детей проводился утром натощак путем пункции локтевой вены.

Концентрация GSH и GSSG в плазме крови определялась с помощью диагностического набора Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical Company, США) на планшетном фотометре iMark (BIORAD, США). Количес-

венная оценка GSH проводилась методом ферментативной рециркуляции с использованием глутатионредуктазы, концентрация GSSG определялась согласно альтернативному протоколу. Итоговые значения молярности GSH и GSSG рассчитывались с помощью компьютерной программы.

Материал для проведения генетического анализа был получен из лейкоцитов венозной крови с использованием комплекса реагентов «SNP-экспресс» («Литех», Россия). Посредством полимеразной цепной реакции в термоциклире Gradient Palm Cycler (Corbett Life Science, Австралия) определялся полиморфизм гена GCLC: 129C/C, 129C/T и 129T/T. Детекция результатов проводилась путем электрофореза в 3%-ном агарозном геле на приборе BioVision (Vilber Lourmat, Франция).

Обработка данных выполнялась в лицензионном программном обеспечении Statistica 6.0 и свободном программном обеспечении DoctorStat 1.9. Оценка соответствия распределения признаков нормальному проводилась посредством критерия Шапиро – Уилка. При распределении количественных признаков, отличных от нормального, данные обрабатывались с помощью критерия Манна – Уитни для двух независимых переменных и критерия Краскела – Уоллиса для трех независимых переменных; результаты представлялись в виде $Me [QL; QU]$, где Me – медиана, QL – нижний квартиль, QU – верхний квартиль. Корреляция Спирмена применялась для изучения взаимосвязей. Анализ качественных признаков проводился посредством критерия Фишера. Критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Работа одобрена этическим комитетом Омского государственного медицинского университета (протокол № 105 от 14.06.2018 г.).

Информированное согласие родителей на участие в исследовании получено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обследовано 50 здоровых детей, из них 27 (54 %) мальчиков и 23 (46 %) девочки. Распределение по возрасту отражало преобладание пациентов младше 6 лет (Шапиро – Уилка, $p = 0,00001$), в связи с этим были сформированы три подгруппы. В 1-ю подгруппу вошло 26 человек в возрасте 4 лет [3,0; 5,0], во 2 подгруппу – 11 детей в возрасте 8 лет [8,0; 11,0], 3 подгруппу составили 13 подростков в возрасте 15 лет [15,0; 17,0]. Подгруппы были сопоставимы между собой по гендерному признаку (Фишера, $p = 0,090$).

Идентификация генотипов однонуклеотидных полиморфных маркеров пока-

зала, что среди обследованных детей доминировал GCLC 129C/C – 43 (86 %) ребенка; в 7 (14 %) случаях диагностирован генотип 129C/T и ни в одном наблюдении не было зафиксировано носительства 129T/T. Не установлено значимых гендерных (Фишера, $p = 0,225$) и возрастных (Фишера, $p = 0,198$) особенностей частоты встречаемости генотипа 129C/T среди обследованных детей.

У наблюдаемых пациентов концентрации GSH (Шапиро – Уилка, $p = 0,00003$) и GSSG (Шапиро – Уилка, $p = 0,00003$) не соответствовали нормальному распределению, определяясь в пределах 6,0 [4,4; 7,0] и 3,0 [2,3; 3,5] мкмоль/л соответственно. Результаты иммуноферментного анализа представлены в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация окисленной и восстановленной форм глутатиона у здоровых детей в зависимости от возраста, Me [QL; QU]

Показатель	Подгруппа			Критерий	p
	1-я ($n = 26$)	2-я ($n = 11$)	3-я ($n = 13$)		
Восстановленный глутатион (GSH), мкмоль/л	5,4 [4,2; 6,9]	6,6 [4,2; 7,2]	6,5 [5,3; 9,2]	Краскела – Уоллиса	0,287
Окисленный глутатион (GSSG), мкмоль/л	2,7 [2,2; 3,5]	3,3 [2,1; 3,6]	3,26 [2,7; 4,6]	Краскела – Уоллиса	0,303
Соотношение GSH:GSSG	2:1	2:1	2:1	Фишера	1,000

Во всех анализируемых случаях соотношение GSH:GSSG было 2:1, что отражало физиологический баланс форм глутатиона в организме. Дополнительно к этому не отмечено значимых различий содержания GSH (Манна – Уитни, $p = 0,419$) и GSSG (Манна – Уитни, $p = 0,397$) в плазме крови у мальчиков и девочек.

Отмечены слабые положительные взаимосвязи между возрастом обследованных детей и молярностью GSH (Спирмена, $r =$

0,31; $p = 0,028$) и GSSG (Спирмена, $r = 0,31$; $p = 0,031$). Анализируя гендерные особенности, стоит отметить тенденцию к повышению концентрации GSH (Спирмена, $r = 0,35$; $p = 0,075$) и GSSG (Спирмена, $r = 0,32$; $p = 0,098$) у мальчиков по мере взросления.

Учитывая полученные результаты, была оценена концентрация GSH и GSSG в зависимости от полиморфизма GCLC. При носительстве полиморфизма 129C/T содержание GSH и GSSG в плазме крови было на 30 %

ниже, чем у детей, имевших генотип 129C/C (Манна – Уитни, $p = 0,017$ и $p = 0,016$ соответственно).

Оценка концентрации GSH и GSSG была проведена с учетом данных, полученных от 43 детей с генотипом GCLC 129C/C (табл. 2).

Таблица 2

Перцентильное распределение концентрации окисленной и восстановленной форм глутатиона у здоровых детей с генотипом GCLC 129C/C

Показатель	Перцентиль				
	10-й	25-й	50-й	75-й	90-й
Восстановленный глутатион (GSH), мкмоль/л	4,0	5,0	6,2	7,6	9,2
Окисленный глутатион (GSSG), мкмоль/л	2,0	2,5	3,1	3,8	4,6

Полученные в настоящем исследовании результаты частично описаны в научной литературе. Так, генотип GCLC 129C/C определялся у 83–92 % здоровых лиц [10, 11], в том числе и у детей [5]. Согласно S. Koide et al. [12], при носительстве аллеля T гена GCLC регистрировалась сниженная на 40–50 % активность промотора, что могло способствовать меньшей продукции глутатиона.

Представлены данные о возрастных и гендерных особенностях содержания глутатиона у взрослых и детей. В исследовании P.S. Samiec et al. [14] установлены более высокие концентрации GSH и GSSG у молодых лиц в сравнении с пациентами старше 60 лет, а E.W. Flagg et al. [9] было отмечено нарастание молярности общего глутатиона у мужчин с возрастом. Работа M. Erden-Inal et al. [8] затрагивала особенности антиоксидантного статуса у детей. У пациентов младше 2 лет содержание GSH определялось в значимо меньших концентрациях, а GSSG – в больших, чем у детей старше 2 лет и подростков. Авторами не установлено гендерных отличий молярности форм глутатиона у детей, однако наблюдалось повышение соотношения GSH:GSSG у мальчиков.

Выводы

1. Частота встречаемости генотипа GCLC 129C/C у здоровых детей, проживающих в Омской области, составила 86 % и не зависела от их возраста и пола.

2. Установлено наличие слабых положительных корреляционных связей между возрастом обследованных детей и концентрациями окисленного и восстановленного глутатиона.

3. У носителей генотипа GCLC 129C/T наблюдалось значимое снижение концентрации окисленного и восстановленного глутатиона.

Источники финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-015-00219 А.

Библиографический список

1. *Беляева Е.В., Еришова О.А., Астахова Т.А., Бугун О.В.* Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в этнических группах, проживающих на территории Восточной Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции 2017; 5: 576–580.

2. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д.* Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редоксзависимых процессов. *Успехи биологической химии* 2014; 54: 299–348.
3. *Кляритская И.Л., Работягова Ю.С.* Полиморфизм гена цитохрома CYP2C19 и клиническое значение его определения. *Крымский терапевтический журнал* 2013; 1 (20): 19–25.
4. *Колесникова Л.И., Баирова Т.А., Первушина О.А.* Распространенность полиморфизма ALA16VAL гена SOD2 в выборках монголоидов и европеоидов, проживающих на территории Восточной Сибири. *Бюллетень Восточно-сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук* 2014; 2 (96): 29–31.
5. *Павлинова Е.Б.* Обоснование системы этапной профилактики, диагностики и прогнозирования бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. М. 2012; 46.
6. *Понамарева М.С., Фурман Е.Г., Ярулина А.М., Кирьянова Т.И., Жданович Е.А.* Особенности состояния здоровья практически здоровых детей с полиморфизмом гена β_2 -адренорецептора. *Современные проблемы науки и образования* 2015; 5: 343.
7. *Толтыгина О.А.* Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор). *Acta Biomedica Scientifica* 2012; 2–2(84): 178–180.
8. *Erden-Inal M., Sunal E., Kanbak G.* Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochemistry and Function* 2002; 20: 61–66.
9. *Flagg E.W., Coates R.J., Jones D.P., Eley J.W., Gunter E.W., Jackson B., Greenberg R.S.* Plasma total glutathione in humans and its association with demographic and health-related factors. *British Journal of Nutrition* 1993; 70: 797–808.
10. *Giustarini D., Tsikas D., Colombo G., Milzani A., Dalle-Donne I., Fantì P., Rossi R.* Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2016; 1019:21–28.
11. *Hashemi M., Hoseini H., Yaghmaei P., Moazeni-Roodi A., Babari A., Hashemzahi N., Shafieipour S.* Association of Polymorphisms in Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit and Microsomal Triglyceride Transfer Protein Genes with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *DNA and Cell Biology* 2011; 30: 569–575.
12. *Koide S., Kugiyama K., Sugiyama S., Nakamura S., Fukushima H., Honda O., Yoshibura M., Ogawa H.* Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41: 539–545.
13. *Rebrin I., Sobal R. S.* Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60:1545–1552.
14. *Samiec P.S., Drews-Botsch C., Flagg E.W., Kurtz J.C., Sternberg P., Reed R.L., Jones D.P.* Glutathione in Human Plasma: Decline in Association with Aging, Age-Related Macular Degeneration, and Diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 24: 699–704.
15. *Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H.* The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2003; 57: 145–155.
16. *Zitka O., Skalickova S., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kruseova J., Eckschlagler T., Kizek R.* Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters* 2012; 4: 1247–1253.

Материал поступил в редакцию 25.05.2019