

Функциональная значимость полиморфизма генов *ApoE* и *SOD2*

в формировании хронической HCV-инфекции

Семёнова Н.А.¹, Рязанцева Н.В.¹, Новицкий В.В.¹, Дмитриева А.И.¹,
Чечина О.Е.¹, Бычков В.А.¹, Моисеенко И.П.²

Functional significance of polymorphism of *ApoE* and *SOD2* genes in formation of chronic HCV infection

*Semyonova N.A., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Dmitriyeva A.I.,
Chechina O.Ye., Vyckov V.A., Moiseyenko I.P.*

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Клиническая больница № 81 Федерального медико-биологического агентства, г. Северск

© Семёнова Н.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др.

Анализ полиморфизма генов играет важную роль в оценке предрасположенности к инфекционным заболеваниям на популяционном и индивидуальном уровне. В настоящей работе проведено определение частот аллельных вариантов генов аполипопротеина E и супероксиддисмутазы 2-го типа и соответствующих генотипов у здоровых и больных хроническим вирусным гепатитом C представителей европеоидной популяции Томской области. Для анализа полиморфизма данных генов использовали современные генетические методы исследования: полимеразную цепную реакцию и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов. Для изученной популяций выявлена связь полиморфизма гена аполипопротеина E и супероксиддисмутазы 2-го типа с развитием хронического вирусного гепатита C и процессом фиброгенеза.

Ключевые слова: аполипопротеин E, супероксиддисмутазы 2-го типа, хронический вирусный гепатит C.

The analysis of gene polymorphism plays an important role in assessment of disposition to infectious diseases at the population and individual level. In this paper, the frequencies of allelic versions of apolipoprotein E and 2nd type superoxide dismutase genes and the corresponding genotypes were determined in healthy persons and chronic viral hepatitis type C patients of the Europeoid population of the Tomsk Region. For the analysis of polymorphism of these genes, we used modern genetic methods: polymerase chain reaction and polymorphism of lengths of restriction fragments. For the studied population, it was revealed that the polymorphism of apolipoprotein E and 2nd type superoxide dismutase genes correlates with the development of chronic viral hepatitis type C and with the fibrogenesis process.

Key words: apolipoprotein E, superoxide dismutase of 2nd type, chronic viral hepatitis type C.

УДК 616.9-036.12-021.2:575.174.015.3

Введение

Хронический вирусный гепатит C (ХВГС) является одной из наиболее актуальных проблем современной медико-биологической науки в связи с широким распространением среди трудоспособного населения, прогрессирующим течением и недостаточной эффективностью современных методов профилактики и противовирусной терапии.

В последние годы внимание исследователей сконцентрировано на причинах, определяющих характер взаимодействия возбудителя и макроорганизма и, соответственно, исход инфекционного заболевания. Особое внимание уделяется изучению генетических факторов, способных влиять на хронизацию HCV-инфекции и модифицировать скорость фиброгенеза при хроническом вирусном гепатите. Среди них особая роль принадлежит полиморфизму генов

метаболизма аполипопротеина E (*ApoE*) и супероксиддисмутазы 2-го типа (*SOD2*).

Ген *ApoE* активно изучается как один из генов-кандидатов, полиморфизм которого оказывает влияние на течение вирусного гепатита С. Возможное влияние объясняется тем, что в плазме вирус циркулирует в комплексе с липопротеинами очень низкой плотности (ЛПОНП), в состав которых входит *ApoE*. Исследователям удалось выделить из клеток гепатомы человека особые мембранные везикулы, в которых идет репликация вируса. Помимо всех основных компонентов репликативного комплекса везикулы содержали и комплекс белков, необходимых для сборки ЛПОНП, включая *ApoE*. Экспериментальное введение в культуру клеток гепатомы ингибиторов сборки данного типа липопротеинов подавляло вирусную репликацию [8]. Кроме того, дальнейшее проникновение вируса внутрь гепатоцита связывают со взаимодействием оболочечных белков (E_1 , E_2) вируса с рецепторами липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности [4]. На сегодняшний день существуют лишь единичные данные о роли полиморфизма *ApoE* в развитии ХВГС. Так, выявлен факт персистенции вируса гепатита С у лиц, имеющих в генотипе аллель E_2 , тогда как носители аллелей E_3 и E_4 имеют меньшую предрасположенность к хронизации процесса. Аллель E_4 даже считают протективным по отношению к развитию гепатита [9].

Фермент *SOD2* относится к группе антиоксидантных ферментов, который защищает организм человека от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов. В литературе описаны изменения в гепатоцитах при гепатитах: в основе морфологических изменений, развивающихся в печени при вирусном гепатите, лежит цитолиз гепатоцитов, инициирующий процесс прогрессирующего некробиоза печеночных клеток [3]. Одним из универсальных механизмов повреждения и даже гибели клеток является чрезмерная пероксидация мембранных и внутриклеточных структур, обусловленная усиленной выработкой активных форм кислорода [2]. На вторичную структуру *SOD2* влияет полиморфизм $A1a(-9)Val$ в последовательности сигнального пептида. На-

личие полиморфного варианта Val приводит к дестабилизации α -спирального участка *SOD2*, в результате которой нарушается перенос энзима из цитоплазмы в митохондриальный матрикс и его задержка во внутренней митохондриальной мембране [10]. В результате данный полиморфизм, по мнению ряда авторов, приводит к абсолютному или относительному локальному дефициту фермента и снижению его активности в митохондриях, оказывая неблагоприятное влияние на структурно-функциональное состояние гепатоцитов, вызывая их аутолиз [7].

На сегодняшний день убедительные данные об ассоциации однонуклеотидных замен с особенностями течения ХВГС получены только для малого числа полиморфизмов. Особо следует отметить крайнюю немногочисленность отечественных работ по изучению генетического полиморфизма при заболеваниях печени, которые представлены исследованиями по установлению генетических маркеров быстрого развития цирроза печени у пациентов с *hcv*-инфекцией.

Цель настоящего исследования – оценить функциональную значимость полиморфизма генов *ApoE* и *SOD2* в формировании хронической *hcv*-инфекции у представителей европеоидной популяции (жители Томской области).

Материал и методы

Работа основана на материалах комплексного клинико-лабораторного обследования 51 пациента с диагнозом хронического вирусного гепатита С, находящегося на стационарном лечении и диспансерном учете в отделении гастроэнтерологии Томской областной клинической больницы и клинической больницы № 81 г. Северска, представителей европеоидной расы, в возрасте от 18 до 56 лет ($(30,4 \pm 10,6)$ года) (из них 30 (59%) мужчин и 21 (42%) женщина). Также в исследовании участвовал 171 здоровый донор, сопоставимый по возрасту и расе, из них 98 (57,3%) мужчин и 73 (42,7%) женщины.

Диагноз устанавливали на основании данных клинико-эпидемиологического, инструментального (сцинтиграфическое и ультразвуковое

исследования печени) и морфологического исследования биоптата печени, серологического (определяли анти-HCVcor IgG и антитела (АТ) к NS3, NS5 HCV методом иммуноферментного анализа) и генетического (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) методов исследования.

Для гистологического исследования печени использовали биопсийный фрагмент печеночной паренхимы. Оценка стадии фиброза проводилась согласно системе METAVIR по шкале: 0 — нет фиброза, 1 — перипортальный фиброз, 2 — портальный фиброз, 3 — портальный фиброз, 4 — цирроз печени [5].

Образцы крови собирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА. Геномную ДНК выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Для исследования ДНК на наличие полиморфизмов в изучаемых генах использовали методику ПЦР с последующей обработкой специфическими рестриктазами и определением длин фрагментов рестрикции.

Аmplификацию осуществляли методом ПЦР, используя структуру праймеров, стандартные компоненты («СибЭнзим», г. Новосибирск) и параметры температурных циклов, описанных в литературе, а также применение амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия).

Для амплификации фрагмента гена *ApoE* (174 bp) использовали следующие праймеры: 5'-ACA-GAA-TTC-GCC-CCG-GCC-TGG-TAC-AC-3' (прямой) в концентрации 1,56 мкмоль и 5'-TAA-GCT-TGG-CAC-GGC-TGT-CCA-AGG-A-3' (обратный) в концентрации 2,5 мкмоль. Реакционная смесь содержала 15–20 нг геномной ДНК, 0,2 ммоль смеси dNTP-mix, 1,6 ммоль хлорида магния и 1 ед.а. Taq-полимеразы в общем объеме 25 мкл. Реакция проводилась при следующих условиях: денатурация при температуре 95 °С в течение 5 мин, 35 циклов амплификации (90 с при 95 °С, 60 с при 60 °С и 60 с при 70 °С) с последующей 10-минутной элонгацией при 72 °С.

Для амплификации фрагмента гена *SOD2* (338 bp), содержащего полиморфизм Ala(-9)Val, использовались следующие праймеры: 5'-CTG-ACC-GGG-CTG-TGC-TTT-CTC-G-3' (прямой) в концентрации 1,98 мкмоль и 5'-CTC-CCG-CCG-CTC-AGC-CTG-GAC-C-3' (обратный) в концентрации 1,54 мкмоль. Реак-

ционная смесь содержала 15–20 нг геномной ДНК, 0,2 ммоль смеси dNTP-mix, 3,2 ммоль хлорида магния и 1 ед.а. Taq-полимеразы в общем объеме 25 мкл. Реакция проводилась при следующих условиях: денатурация при температуре 95 °С в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (60 с при 94 °С, 60 с при 60 °С и 60 с при 72 °С) с последующей 10-минутной элонгацией при 72 °С.

Аликвоты продуктов ПЦР подвергали электрофорезу в 1%-м агарозном геле для подтверждения наличия ожидаемых фрагментов.

Продукты амплификации фрагмента гена *ApoE* подвергали рестрикции с использованием специфической эндонуклеазы BstHI 1 («СибЭнзим», г. Новосибирск) для выявления аллельных вариантов E₂, E₃, E₄. Аллель E₂ в 112-м и в 158-м положениях содержит цистеин, рестриктаза разрезает его на два фрагмента длиной 91 и 83 нуклетидных последовательностей (н.п.) Аллель E₃ в положении 112 содержит цистеин, а в 158-м аргинин и нарезается ферментом на три фрагмента длиной 91, 48 и 35 н.п. Аллель E₄ в положениях 112 и 158 содержит аргинин и нарезается на четыре фрагмента длиной 19, 72, 48 и 35 н.п.

Амплификат участка гена *SOD2* подвергали обработке специфической эндонуклеазой AsiGI 1 («СибЭнзим», г. Новосибирск) для выявления полиморфизма Ala(-9)Val. В результате рестрикции при отсутствии полиморфизма в полиморфном сайте C_{47T} образовывались следующие фрагменты: 210, 38, 33, 24, 23 и 10 bp, при наличии полиморфизма: 233, 38, 33, 24 и 10 bp. Продукты рестрикции фракционировали в 12%-м полиакриламидном геле посредством электрофореза.

В качестве маркера размера фрагментов ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («СибЭнзим», г. Новосибирск).

Имеющиеся данные типа случай — контроль относились к качественным, а выборки были независимы.

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использо-

вали критерий χ^2 Пирсона. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR с расчетом для него 95%-го доверительного интервала (ДИ).

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного анализа распределения частот встречаемости полиморфизма гена *ApoE* в группах здоровых доноров и больных ХВГС подтвердили достоверное различие частот генотипов и аллелей в исследуемых группах ($\chi^2 = 12,197$; $p < 0,05$). Так, в группе больных ХВГС частота встречаемости генотипа E_3/E_4 (1,9%) оказалась статистически значимо ниже таковой у здоровых доноров (16,4%), а частота встречаемости аллеля E_3 (91,1%) и генотипа E_3/E_3 (86,3%) была достоверно выше в группе больных гепатитом по сравнению с группой контроля. Результаты распределения частот генотипов *ApoE* в группах здоровых доноров и больных ХВГС представлены в табл. 1.

Таблица 1
Частота полиморфных генотипов и аллелей гена *ApoE* у больных ХВГС и здоровых доноров, % (абс.)

Генотип и аллели	Здоровые доноры	Больные ХВГС	χ^2	p
E_2/E_2	0,6 (1)	1,9 (1)	0,833	0,361
E_3/E_3	68,4 (117)	86,3 (44)	6,284	0,012
E_4/E_4	1,2 (2)	1,9 (1)	0,184	0,668
E_2/E_3	11,7 (20)	4,0 (2)	2,659	0,103
E_2/E_4	1,7 (3)	4,0 (2)	0,838	0,360
E_3/E_4	16,4 (28)	1,9 (1)	7,186	0,007
E_2	7,3 (12)	4,0 (2)		
E_3	82,5 (142)	91,1 (47)	2,644	0,267
E_4	10,2 (17)	4,9 (2)		

Полученные данные подтверждают предположение о том, что аллель E_3 является статистическим предиктором для персистенции вируса в организме, а аллели E_2 , E_4 , напротив, снижают вероятность хронизации инфекции. Существует предположение о том, что аллель E_4 проявляет протективные свойства при HCV-инфекции [9].

Возможно, это связано с аминокислотной последовательностью аполипопротеина E: $ApoE_3$ в положении 112 имеет аминокислоту цистеин — единственный цистеин во всей аминокислотной последовательности. У $ApoE_4$ в этом

положении находится аргинин. Данное замещение нейтральной аминокислоты на основную являются причиной различий в заряде, который у $ApoE_2$ равен 0, у $ApoE_3$ +1 и у $ApoE_4$ +2. Изоэлектрические точки у этих форм соответственно равны 5,89; 6,02 и 6,18 [1]. Таким образом, можно предположить, что именно изоформа $ApoE_3$ легче проникает через мембрану клеток, имея более высокое сродство к рецепторам гепатоцитов, тем самым облегчая проникновение вируса внутрь клеток.

При изучении распределения полиморфных вариантов гена *ApoE* у больных гепатитом в зависимости от степени фиброза не было выявлено достоверных различий в распределении частот встречаемости изучаемых аллелей и генотипов среди пациентов с различной степенью фиброза печени ($p > 0,05$).

Оценка распределения частот аллелей и генотипов гена *SOD2* у больных ХВГС и здоровых доноров выявила существенные различия ($p < 0,05$). Так, частота встречаемости генотипа Ala/Ala в группе больных ХВГС (11,8%) была достоверно меньше относительно данного показателя в группе контроля (32,75%). Соответственно, частоты встречаемости генотипов Ala/Val и Val/Val были достоверно выше в группе пациентов с гепатитом С по сравнению с аналогичными частотами в группе контроля (табл. 2).

Выявлено, что аллель Val встречался чаще у больных ХВГС (55,9%), чем у здоровых доноров (42,1%), и имел рисковую значимость для развития данной патологии (OR = 1,74; ДИ 1,12—2,72). Частота встречаемости аллеля Ala в группе пациентов с гепатитом С (44,1%) была достоверно ниже данного параметра по сравнению с группой контроля (57,9%), что говорит о протективных свойствах данного аллеля в отношении развития ХВГС (OR = 0,57; ДИ 0,37—0,90).

Таблица 2
Частота полиморфных генотипов и аллелей полиморфизма $Ala(-9)Val$ гена *SOD2* у больных ХВГС и здоровых доноров, % (абс.)

Генотип и аллели	Здоровые доноры	Больные ХВГС	χ^2	p	OR (95%-й ДИ)
Ala/Ala	32,8 (56)	11,8 (6)	8,63	0,01	0,27 (0,11—0,68)
Val/Ala	50,3 (86)	64,7 (33)			1,81 (0,95—3,46)

Val/Val	16,9 (29)	23,5 (12)			1,51 (0,70—3,22)
Ala	57,9 (99)	44,1 (22)	6,02	0,01	0,57 (0,37—0,90)
Val	42,1 (72)	55,9 (29)			1,74 (1,12—2,72)

Примечание. *p* — уровень статистической значимости различий параметров между группами больных ХВГС и здоровыми донорами; χ^2 — стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR — критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95%-м доверительным интервалом.

При изучении значения полиморфизма Ala(-9)Val гена *SOD2* в развитии фиброза были получены достоверные различия частот встречаемости вариантных аллелей и генотипов изучаемого гена внутри группы больных гепатитом в зависимости от степени фиброза ($p < 0,05$). В подгруппе пациентов с умеренным фиброзом с портопортальными септами наблюдалось достоверное увеличение частоты встречаемости аллеля Val и генотипа Val/Val по сравнению с таковой у больных без фиброза и слабовыраженным перипортальным фиброзом (табл. 3).

Таблица 3
Частота полиморфных генотипов и аллелей полиморфизма Ala(-9)Val гена *SOD2* в зависимости от степени фиброза по данным биопсии у больных ХВГС, % (абс.)

Генотип и аллели	Степень фиброза			χ^2	<i>p</i>
	Нет фиброза	Слабовыраженный перипортальный фиброз	Умеренный фиброз с портопортальными септами		
Ala/Ala	18,7 (3)	14,3 (2)	4,8 (1)	11,661	0,02
Val/Ala	68,8 (11)	85,7 (12)	47,6 (10)		
Val/Val	12,5 (2)	0 (0)	47,6 (10)* **		
Ala	56,3 (9)	57,1 (8)	28,6 (6)		
Val	43,7 (7)	42,9 (6)	71,4 (15)* **		

Примечание. *p* — уровень статистической значимости различий параметров между подгруппами больных ХВГС с различной стадией фиброза; * — достоверность различий по сравнению с пациентами с отсутствием фиброза ($p < 0,05$); ** — достоверность различий по сравнению с пациентами со слабовыраженным фиброзом ($p < 0,05$).

Таким образом, изучаемый полиморфизм гена *SOD2* играет роль в развитии фиброза печени при ХВГС, так как данный фермент является одним из главных факторов антиоксидантной защиты клеток. Повышение уровня продуктов липопероксидации в органах и тканях при ХВГС оказывает повреждающий эффект на структурно-функциональное состояние клеток, в

том числе гепатоцитов, вызывая аутолиз [6]. Хотя механизмы повреждающего действия вирусов на гепатоциты продолжают изучаться, начало поражения клеток связывают с развитием тканевой гипоксии и нарушениями окислительного фосфорилирования в митохондриях. Снижение или прекращение синтеза аденозинтрифосфата в гепатоцитах ведет к усиленной выработке гипоксантина с последующей активацией ксантиноксидазы и сопряженной с нею усиленной продукции супероксидных радикалов и H_2O_2 , повышенному расходу тканевых антиоксидантов и стимуляции пероксидации мембранных и внутриклеточных структур. Существуют данные о наличии зависимости тяжести вышеперечисленных нарушений от нозологического типа гепатита: в наибольшей степени нарушается функционирование системы антиперекисной защиты у больных тяжелыми формами нсV и микст-гепатитом В + С; по-видимому, это связано с более выраженными деструктивными процессами, которые непосредственно и опосредованно вызывает вирус гепатита С [3].

Выводы

Анализ оценки функциональной значимости полиморфизмов генов *ApoE* и *SOD2* в формировании хронической нсV-инфекции позволил сделать следующие выводы:

1. Для нсV-инфицированных пациентов европейской популяции Томской области частоты встречаемости аллеля E₃ и генотипа E₃/E₃ достоверно выше по сравнению с таковыми в контроле. При этом в группе пациентов с хроническим гепатитом С не выявлено взаимосвязи аллельного полиморфизма гена *ApoE* со степенью фиброза.
2. Частоты встречаемости аллеля Val гена *SOD2* и гомозигот с генотипом Val/Val достоверно выше у больных ХВГС по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.
3. Фиброз печеночной ткани у больных хроническим гепатитом С сопряжен с увеличением частоты встречаемости аллеля Val и генотипа Val/Val гена *SOD2*.

Литература

1. Коровайцева Г.И., Щербатых Т.В., Селезнёва Н.В.

Семёнова Н.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др. Функциональная значимость полиморфизма генов ApoE и SOD2...

- и др. Генетическая ассоциация между аллелями гена аполипопротеина E и различными формами болезни Альцгеймера // Генетика. 2001. Т. 37, № 4. С. 529—535.
2. **Логинов А.С., Матюшин Б.Н., Чебанов С.М., Решетняк В.И.** Оценка холестаза по активности антиоксидантных ферментов и составу липопротеинов плазмы крови больных с патологией печени // Терапевт. арх. 1998. № 4. С. 40—42.
 3. **Нагоев Б.С., Иванова М.Р.** Роль системы антиоксидантной защиты организма в патогенезе острых вирусных гепатитов // Терапевт. арх. 2003. № 11. С. 15—17.
 4. **Andre P., Komurian&Pradel F., Deforges S. et al.** Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles // J. Virol. 2002. V. 76. P. 6919—6928.
 5. **Bedossa P., Poynard T.** An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. 1996. V. 24289—24293.
 6. **Elchuri S., Oberley T.D., Qi W. et al.** CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life // Oncogene. 2005. V. 24, № 3. P. 367—80.
 7. **Ergen H.A., Narter F., Timirci O., Isbir T.** Effects of manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism on prostate cancer: a case-control study // Anticancer Res. 2007. V. 27, № 2. P. 1227—1230.
 8. **Huang H., Sun F., Owen D.M. et al.** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins // PNAS. 2007. V. 104, № 14. P. 5848—5853.
 9. **Sazci A., Akpinar G., Aygun C. et al.** Association of Apolipoprotein E Polymorphisms in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis // Dig. Dis. Sci. 2008. V. 53. P. 218—224.
 10. **Sobkowiak A., Lianeri M., Wudarski M. et al.** Manganese superoxide dismutase Ala-9Val mitochondrial targeting sequence polymorphism in systemic lupus erythematosus in Poland // Clin. Rheumatol. 2008. V. 27. P. 827—831.

Поступила в редакцию 08.06.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

Н.А. Семёнова — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Н.В. Рязанцева — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

А.И. Дмитриева — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

О.Е. Чечина — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

В.А. Бычков — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

И.П. Моисеенко — врач-инфекционист КДЦ № 1 КБ № 81 ФГУЗ ФМБА России (г. Северск).

Для корреспонденции

Семёнова Надежда Андреевна, тел. 8-906-947-6388, e-mail: nadfix@mail.ru