Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 4, с. 349-353.

©Коллектив авторов

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА G894T ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА

В.В. Зинчук*, Д.Д. Жадько, И.Э. Гуляй

Гродненский государственный медицинский университет,
Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80; эл. почта: zinchuk@grsmu.by

Исследовали прооксидантно-антиоксидантный баланс в зависимости от полиморфизма G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота. Определяли распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма G894T, содержание общих нитритов, сероводорода, продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид), антиоксидантов (восстановленный глутатион, каталаза, церулоплазмин, ретинол) в венозной крови здоровых лиц мужского пола. Встречаемость генотипа GG составила 49,1%, GT – 44,2%, TT – 6,7%. Уровень малонового диальдегида в эритроцитах при генотипе GG на 16,8% ниже, чем при генотипе GT. Концентрация сероводорода в крови при генотипе GG составила 27,5 [18,2; 32,5] мкМ, GT – 28,6 [22,9; 33,8] мкМ, TT – 36,3 [33,8; 42,5] мкМ. Содержание общих нитритов в плазме при генотипе GG составило 10,4 [9,0; 12,5] мМ, GT – 10,4 [8,9; 11,8] мМ, TT – 9,4 [8,8; 9,8] мМ. Генотип GG обусловливает более низкий уровень малонового диальдегида в сравнении с гетерозиготным генотипом. Аллель T полиморфизма G894T ассоциирован с низким содержанием общих нитритов в плазме и высокой концентрацией сероводорода. Полученные данные дают основание считать, что при нарушении кислородного обеспечения организма полиморфизм G894T гена эндотелиальной синтазы монооксида азота может иметь значение для развития окислительного стресса.

Ключевые слова: оксид азота; сероводород; перекисное окисление липидов; антиоксиданты; полиморфизм G894T

DOI: 10.18097/PBMC20186404349

ВВЕДЕНИЕ

Монооксид азота (NO) является сигнальной молекулой, обеспечивающей в организме протекание ряда физиологических процессов и обладающей как свободнорадикальными, так и антиоксидантными свойствами [1]. Свободнорадикальный эффект оксида азота проявляется в форме генерации пероксинитрита и гидроксил-анион радикала, а антиоксидантное действие заключается в способности динитрозильных комплексов железа выступать в качестве “ловушки” свободных радикалов [2].

Ген эндотелиальной синтазы оксида азота размером около 21 т.п.н., расположенный в участке q35-36 хромосомы 7, содержит 26 экзонов, 25 интронов; его полиморфный участок G894T (Glu298Asp, rs1799983) во многом определяет активность фермента эндотелиальный синтазы оксида азота [3]. В литературе представлены несколько противоречивые сведения о взаимосвязи распределения аллелей полиморфизма G894T и содержанием NO в крови. По данным Sakar и соавт. [4], при генотипе TT наблюдается более низкая концентрация NO в плазме в сравнении с лицами, имеющими аллель G. Dias и соавт. [3] выявили ассоциацию аллеля T с нарушением ферментативной активности эндотелиальной синтазы оксида азота. В то же время в работе Mackawy и соавт. [5] сообщается, что аллель T полиморфизма G894T ассоциирован с повышенным уровнем нитратов в плазме крови: содержание нитратов в плазме у здоровых лиц (n=40) с генотипами GG, GT и TT составило 9,92±1,65 мкмоль/мл, 12,11±1,04 мкмоль/мл, 14,55±2,18 мкмоль/мл, соответственно. Вызывает интерес изучение уровня базального NO с учётом полиморфизма G894T, а также участие данного полиморфного локуса в формировании процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты.

В связи с этим, целью исследования была оценка прооксидантно-антиоксидантного баланса в зависимости от полиморфизма G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

МЕТОДИКА

В исследовании приняли участие 165 лиц мужского пола 18-24 лет. В состоянии покоя натощак забирали венозную кровь. Данная работа одобрена региональным комитетом по биомедицинской этике. Все участники дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Определение полиморфизма G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота проводили методом полимеразной цепной реакции на амплификаторе Rotor Gene-Q (“Qiagen”, Германия). Дискриминацию аллелей осуществляли средствами программного обеспечения амплификатора, в основе которых лежит зависимость интенсивности флуоресценции соответствующего красителя от количества копий исследуемого участка гена.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) оценивали в плазме и эритроцитах по интенсивности УФ-поглощения при длине волны 233 нм на спектрофлуориметре СМ2203 (“Солар”, Беларусь) [6]. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в плазме и эритроцитах оценивали по взаимодействию с 2′-тиобарбитуровой кислотой

* - адресат для переписки

Репозиторий ГрГМУ

на спектрофотометре PV1251C (“Солар”) [6]. Уровни α-токоферола и ретинола в плазме определяли по интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 286 нм и испускания 350 нм (для α-токоферола) и при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 470 нм (для ретинола) на спектрофлуориметре СМ2203 [7]. Активность каталазы оценивали в эритроцитах спектрофотометрическим методом по способности пероксида водорода (H_2O_2) образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс при длине волны 410 нм [8]. Для определения содержания церулоплазмина в плазме крови использовали метод, основанный на окислении *n*-фенилендиамина при участии церулоплазмина [6]. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах изучали по реакции взаимодействия SH-групп глутатиона с 5,5′-дитиобис(2-нитробензойной кислотой), способной поглощать свет при длине волны 412 нм [9]. Уровень общих нитритов в плазме оценивали спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм с реактивом Грисса [10]. Содержание сероводорода (H_2S) в плазме определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором N,N-диметил-парафенилендиамина в присутствии хлорного железа (III) при длине волны 670 нм [11].

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0 (“StatSoft”, США). Распределение генотипов полиморфизма G894T проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга по критерию χ^2 Пирсона. При нормальном распределении количественных признаков статистическую значимость различий оценивали по t-критерию для независимых выборок. При распределении, отличающемся от нормального, статистическую значимость различий определяли по критерию Манна-Уитни. Результаты представляли в виде: медиана [25 процентиль; 75 процентиль]. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлено распределение генотипов изучаемого полиморфизма. Встречаемость

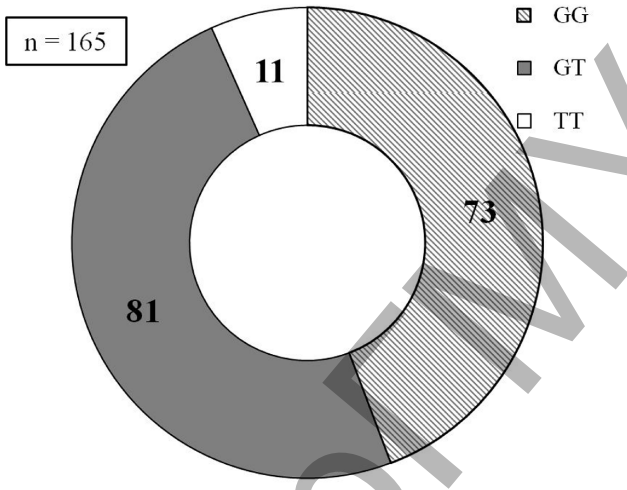

Рисунок 1. Встречаемость генотипов полиморфизма G894T у лиц мужского пола

генотипа GG составила 49,1%, GT – 44,2%, TT – 6,7%, соответственно. Распределение генотипов полиморфного варианта G894T в данной выборке не отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга (χ^2=1,031, p=0,310), что свидетельствует об отсутствии сторонних влияний (мутации, дрейф генов, не случайное скрещивание) на генетическую структуру данной выборки. Из 165 исследуемых у 154 в генотипе присутствует аллель G, у 84 человек – аллель T, частота аллелей G/T составила 0,71/0,29.

На рисунке 2 представлены параметры активности процессов перекисного окисления липидов. Уровень МДА в эритроцитарной массе при генотипе GG на 16,8% ниже, чем при генотипе GT, в то время как различий в содержании ДК в эритроцитах не обнаружено. Сравнение по рецессивной модели (GG vs. GT + TT) показало, что наличие аллеля T в генотипе обусловливает более высокое содержание МДА (на 13,3%). В плазме крови статистически значимых различий ДК и МДА зависимости от генотипа не наблюдалось. Также не было выявлено различий со стороны факторов антиоксидантной защиты (таблица).

Концентрация сероводорода в плазме (рис. 3) при генотипе TT на 21,2% выше, чем у лиц с генотипом GT и на 23,7% – при наличии

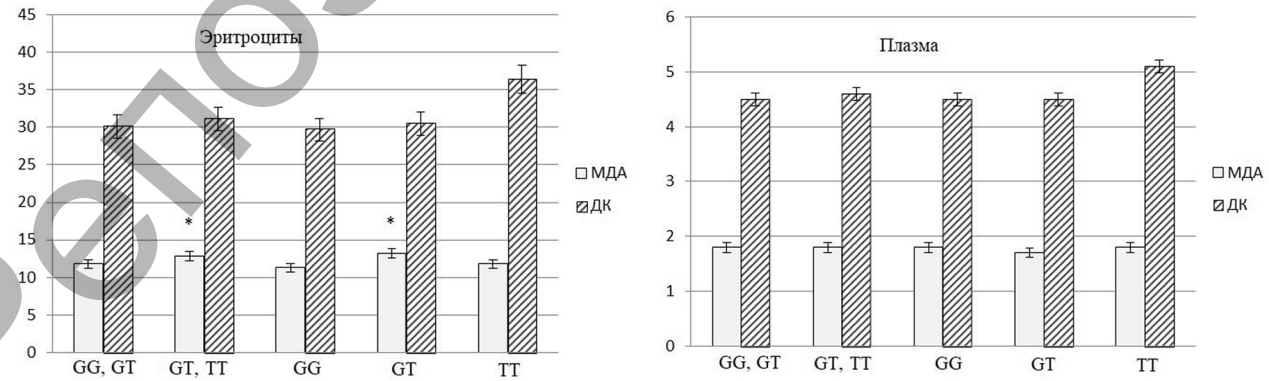

Рисунок 2. Показатели перекисного окисления липидов: диеновые конъюгаты (ΔD233/мл), малоновый диальдегид (мкМ) в крови в зависимости от полиморфизма G894T гена эндотелиальный синтазы оксида азота у лиц мужского пола. * - различия статистически значимы по отношению к генотипу “GG”.

Репозиторий ГрГМУ

Таблица. Факторы антиоксидантной защиты у лиц мужского пола в зависимости от полиморфизма G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота

Показатель	Общее кол-во n=165	GG, GT n=154	GT, TT n=84	GG n=81	GT n=73	TT n=11
Восстановленный глутатион, мкмоль/г Hb	28,2 [23,7; 32,4]	28,2 [23,5; 32,7]	28,9 [23,4; 32,8]	28,0 [24,4; 32,3]	28,8 [22,7; 32,9]	29,1 [26,4; 32,4]
Каталаза, ммоль H_2O_2/мин/г Hb	26,6 [23,8; 28,5]	26,5 [23,6; 28,5]	26,6 [23,9; 28,3]	26,6 [23,8; 28,5]	26,3 [23,5; 28,2]	27,3 [26,6; 29,2]
Церулоплазмин, мг/мл	249,0 [200,0; 316,0]	249,0 [200,0; 325,0]	246,5 [197,5; 287,0]	254,0 [210,0; 329,0]	245,0 [199,0; 289,0]	248,0 [196,0; 283,0]
α-токоферол, мкМ	13,9 [10,4; 16,4]	13,9 [10,5; 16,4]	13,8 [10,0; 16,8]	13,8 [10,9; 16,3]	14,0 [10,0; 16,6]	13,3 [9,7; 17,4]
Ретинол, мкМ	1,0 [0,8; 1,1]	1,0 [0,8; 1,1]	1,0 [0,8; 1,1]	1,0 [0,8; 1,2]	1,0 [0,8; 1,1]	1,0 [0,7;1,1]

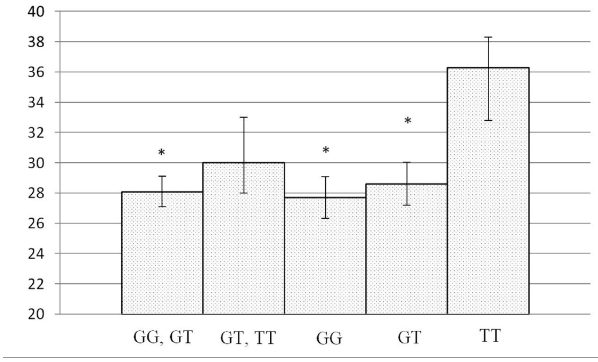

Рисунок 3. Содержание сероводорода (мкМ) у лиц мужского пола в зависимости от полиморфизма G894T. * - различия статистически значимы по отношению к генотипу TT.

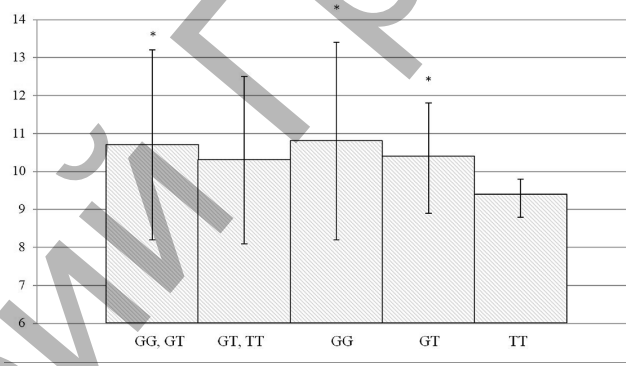

Рисунок 4. Уровень общих нитритов (мМ) у лиц мужского пола в зависимости от полиморфизма G894T. * - различия статистически значимы по отношению к генотипу TT.

генотипа GG. Сравнение по рецессивной модели (GG + GT vs. TT) отражает на 22,6% более высокие значения уровня сероводорода у испытуемых, имеющих аллель T. Содержание общих нитритов в плазме крови (рис. 4) при гомозиготном рецессивном генотипе на 10,6% ниже, чем у лиц с гетерозиготным генотипом, и на 14,9% ниже при доминантном генотипе. Сравнение по доминантной модели GG+GT vs. TT показало на 13,8% более высокую концентрацию общих нитритов в сравнении с рецессивным генотипом.

В нашем исследовании отсутствуют значимые изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса за исключением МДА. Повышенные значения этого показателя у лиц, имеющих аллель T, в сравнении с испытуемыми с гомозиготным доминантным генотипом, по-видимому, отражают несколько более высокий уровень образования активных форм кислорода в их организме. В то же время отсутствие различий среди других показателей перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной защиты свидетельствует об относительном балансе генерации свободных радикалов и их нейтрализации при любом варианте генотипа.

Количество синтезируемого NO зависит от множества факторов, включая доступность субстрата и кофакторов. Посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование или доступность тетрагидробиоптерина (BH_4), могут влиять на скорость образования NO. Например, дефицит BH_4 может привести к нарушению активности фермента и способствовать генерации супероксид-анион радикала [12]. L-аргинин обычно не является ограничивающим субстратом, однако другие ферменты, такие как аргиназа, могут конкурировать с эндотелиальной синтазой оксида азота за его доступность. В условиях, когда имеется достаточное количество субстрата и кофакторов, наиболее значимым аспектом, определяющим синтез NO, является локальная концентрация кислорода. Скорость образования NO, опосредованная активностью фермента, пропорциональна содержанию O_2 и линейно возрастает по мере увеличения его концентрации [13]. Результаты наших предыдущих исследований показывают, что NO относится к факторам, участвующим в регуляции кислородтранспортной функции крови. В частности, S-нитрозосоединения проявляют себя как факторы, повышающие сродство гемоглобина к кислороду, реализуя свой эффект через образование окисленной формы гемоглобина, присутствие которой оказывает влияние на способность гемоглобина связывать и удерживать кислород [14]. Образование различных модификаций гемоглобина

Репозиторий ГрГМУ

в результате взаимодействия с NO зависит от условий оксигенированности; при этом характер модификации NO кислородсвязывающих свойств крови определяется условиями кислородного режима [15]. Очевидно, более низкий уровень общих нитритов, наблюдаемый у лиц с генотипом TT в сравнении с испытуемыми, в полиморфизме которых присутствует аллель G, может быть связан с NO-опосредованными различиями концентрации молекулярного кислорода в плазме крови.

Развитие окислительного стресса часто ассоциировано с изменениями функционирования системы L-аргинин – NO [16]. В то же время, другой газотрансмиттер, H_2S, являясь мощным восстановителем, может взаимодействовать с активными формами кислорода [17]. В ряде исследований показано, что H_2S проявляет антиоксидантную активность при окислительном стрессе [18]. Так, введение донора H_2S гидросульфида натрия у мышей уменьшает индуцированное метионином образование свободных радикалов в эндотелиальных клетках мозга и усиливает действие восстановленного глутатиона, каталазы, супероксиддисмутазы и неселективного блокатора эндотелиальной синтазы оксида азота N^{ω}-нитро-L-аргинин-метилового эфира на образование активных форм кислорода [19]. Также установлено, что H_2S замедляет старение эндотелиальных клеток за счёт ослабления окислительного стресса [20]. Газотрансмиттеры H_2S и NO могут оказывать влияние на активность свободнорадикальных процессов и, в целом, на антиоксидантный потенциал организма, влияя на адаптивные механизмы, обеспечивающие снижение проявлений окислительного стресса [21].

В нашем исследовании у лиц с генотипом TT наблюдается более низкий уровень NO и высокий уровень H_2S в сравнении с испытуемыми, имеющими аллель G. Известно, что H_2S и NO взаимодействуют друг с другом. В частности, нитриты, являясь продуктом окисления NO, эффективно превращаются в S-нитрозотиолы, которые реагируют с H_2S, образуя S/N-гибридные комплексы, включая тионитрит (SNO^-) и нитрозоперсульфид ($SSNO^-$). Предполагается, что сероводород может восстанавливать нитриты до NO самостоятельно и/или способствует их восстановлению путём модуляции ферментативной активности ксантиноксидоредуктазы или порфиринов [22]. При многих заболеваниях гомеостаз NO и H_2S одновременно нарушается, также эти соединения часто осуществляют кооперативные эффекты, например, в процессах ангиогенеза и вазодилатации [23]. Взаимодействие NO и H_2S имеет определённую физиологическую значимость, поскольку NO увеличивает экспрессию фермента цистатионин-γ-лиазы, но ингибирует его активность и клеточное высвобождение цистеина, ведёт к образованию новых молекул S-нитрозотиолов, в свою очередь H_2S при ацидозе индуцирует образование NO из нитритов и других производных NO [24, 25]. Учитывая определённую взаимосодружественность механизмов генерации H_2S и NO, а также эффектов их действия, можно предположить, что повышенная продукция H_2S при аллеле T направлена на компенсацию сниженного синтеза NO, что приобретает важное значение в условиях кислородного дефицита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полиморфный вариант G894T гена эндотелиальной синтазы оксида азота участвует в формировании прооксидантно-антиоксидантного баланса. Генотип GG обусловливает более низкий уровень малонового диальдегида в сравнении с гетерозиготным генотипом. Аллель T полиморфизма G894T ассоциирован с низким содержанием общих нитритов в плазме и высокой концентрацией сероводорода. Полученные данные дают основание считать, что при нарушении кислородного обеспечения организма полиморфизм G894T гена эндотелиальной синтазы монооксида азота может иметь значение для развития окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленникова Е.И., Ванин А.Ф., Рууге Э.К.* (2007) Биофизика, **52**(3), 503-508.
2. *Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Ванин А.Ф.* (2015) Биофизика, **60**(2), 348-354.
3. *Dias R.G., Gowdak M.M., Pereira A.C.* (2011) Genes Nutr., **6**, 55-62.
4. *Sakar M.N., Atay A.E., Demir S., Bakir V.L., Demir B., Balsak D., Akay E., Ulusoy A.I., Verit F.F.* (2015) J. Matern. Fetal. Neonatal Med., **28**(16), 1907-1911.
5. *Mackawy A.M., Khan A.A., Badawy M.S.* (2014) Meta Gene, **2**, 392-402.
6. *Камышников В.С.* (2009) Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. МЕДпресс-информ, Москва.
7. *Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L.* (1976) Lipids, **11**(7), 530-538.
8. *Королюк М.А., Иванов Л.И., Масторова И.Г.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
9. *Sedlak J., Lindsay R.H.* (1968) Anal. Biochem., **25**, 192-205.
10. *Bryan N.S., Grisham M.B.* (2007) Free Radic. Biol. Med., **43**(5), 645-657.
11. *Norris E.J., Culberson C.R., Narasimhan S.* (2011) Shock, **36**(3), 242-250.
12. *Tejero J., Stuehr D.* (2013) IUBMB Life, **65**(4), 358-365.
13. *Thomas D.D.* (2015) Redox Biol., **5**, 225-233.
14. *Зинчук В.В., Глуткина Н.В.* (2013) Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, **99**(5), 537-554.
15. *Степуро Т.Л., Зинчук В.В.* (2013) Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, **99**(1), 111-119.
16. *Rafikov R., Fonseca F.V., Kumar S., Pardo D., Darragh C., Elms S., Fulton D., Black S.M.* (2011) J. Endocrinol., **210**(3), 271-284.
17. *Wang R.* (2012) Physiol. Rev., **92**(2), 791-896.
18. *Jia J., Xiao Y., Wang W., Qing L., Xu Y., Song H., Zhen X., Ao G., Alkayed N., Cheng J.* (2013) Neurochem. Int., **62**(8), 1072-1078.
19. *Tyagi N., Moshal K.S., Sen U., Vacek T.P., Kumar M., Hughes W.M., Kundu S., Tyagi S.C.* (2009) Antioxid. Redox Signal., **11**(1), 25-33.

Репозиторий ГрГМУ

20. *Qi H.N., Cui J., Liu L., Lu F.F., Song C.J., Shi Y., Yan C.D.* (2012) Sheng Li Xue Bao, **64**(4), 425-432.
21. *Зинчук В.В., Фираго М.Э.* (2017) Биомед. химия, **63**, 520-526. DOI: 10.18097/PBMC20176306520.
22. *Cortese-Krott M.M., Fernandez B.O., Kelm M., Butler A.R., Feelisch M*. (2015) Nitric Oxide, **46**, 14-24.
23. *Szabo C., Papapetropoulos A*. (2017) Pharmacol. Revs., **69**, 497-564.
24. *Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Ковалев И.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Реутов В.П.* (2017) Успехи физиологических наук, **48**(1), 24-52.
25. *Wang R., Szabo C., Ichinose F., Ahmed A., Whiteman M., Papapetropoulos A.* (2015) Trends Pharmacol. Sci., **36**, 568-578.

Поступила: 03. 04. 2018.
Принята к печати: 31. 05. 2018.

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE DEPENDING ON ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE G894T POLYMORPHISM

V.V. Zinchuk, D.D. Zhadko, I.E. Gulyai

Grodno State Medical University,
80 Gorky str., Grodno, 230009, Belarus; e-mail: zinchuk@grsmu.by

The aim of the study was to assess the prooxidant-antioxidant balance depending on endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism. The frequency distribution of alleles and genotypes of G894T polymorphism, nitrite concentration, hydrogen sulphide, lipid peroxidation products (diene conjugates, malonic dialdehyde), antioxidants (reduced glutathione, catalase, ceruloplasmin, retinol) were determined in venous blood of healthy males. The incidence of the GG genotype was 49.1%, GT – 44.2%, TT – 6.7%. The level of malonic dialdehyde in erythrocytes with the GG genotype is 16.8% lower than in the genotype GT. The concentration of hydrogen sulphide in the blood with the GG genotype was 27.5 [18,2; 32,5] μM, GT – 28.6 [22.9; 33.8] μM, TT – 36.3 [33.8; 42.5] μM. The content of total nitrites in plasma with the GG genotype was 10.4 [9,0; 12,5] mM, GT – 10.4 [8.9; 11.8] mM, TT – 9.4 [8.8; 9.8] mM. The genotype GG causes a lower level of malonic dialdehyde in comparison with the heterozygous genotype. The G894T polymorphism allele T is associated with a low content of total nitrites in the plasma and a high concentration of hydrogen sulfide. The data obtained suggest that if the oxygen supply of the organism is impaired, the endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism may be important for the oxidative stress development.

Key words: nitric oxide; hydrogen sulphide; lipid peroxidation; antioxidant; G894T polymorphism

Репозиторий ГрГМУ