

УДК 579.252.5:57.21:578.85/86

А.К. ХАНСЕИТОВА, В.Г. НИГМАТОВА, А.П. ЧИРКИН,
Т.Н. МИРОШНИК, Н.А. АЙТХОЖИНА

ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РАССЕЯННОМУ СКЛЕРОЗУ И ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНА ПАРАОКСОНАЗЫ 1 В КАЗАХСТАНЕ

(Институт молекулярной биологии и биохимии им.М.А. Айтхожина)

Был изучен полиморфизм гена PON 1 в двух локусах (M55L и Q192R) в казахской и русской группе пациентов с рассеянным склерозом (РС) и в контрольной группе с помощью ПЦР-RFLP. Распределение частот аллелей и генотипов оценивалось с использованием теста χ^2 . Статистический анализ не показал связи полиморфизма M55L с рассеянным склерозом, как в казахской, так и в русской группе больных РС. Выявлена ассоциация Q192R полиморфизма гена PON 1 с рассеянным склерозом в казахской этнической группе ($\chi^2=5.63$). Относительный риск развития рассеянного склероза по полиморфизму Q192R гена PON1 составляет 3.64.

Рассеянный склероз (РС) это воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы с аутоиммунной этиологией, развивающееся на фоне определенного сочетания полиморфных вариантов множества генов. Эпидемиологические, семейные исследования и исследования близнецов указывают на то, что генетические факторы играют важную роль в патогенезе РС. Исследование генов-кандидатов предрасположенности к РС и полное геномное сканирование показали сцепление данного заболевания с генами, расположенными как минимум на 16 хромосомах [1]. Тем не менее, клиническое разнообразие форм РС («западный» и «азиатский» тип), семейное и спорадическое проявление, генетическая гетерогенность исследуемых популяций осложняют выявление генов, играющих главную роль в возникновении и развитии заболевания.

Литературные данные по оксидативному стрессу, ведущему к появлению активных форм кислорода и перекисному окислению липидов, и повышенному уровню продуктов гликолиза в нейронах центральной нервной системы, могут играть ведущую роль в патогенезе большого числа болезней, в том числе и в нейродегенеративного плана (например, РС). Таким образом, полиморфизмы генов, кодирующих эндогенную систему очистки от свободных радикалов, таких как параоксоназа 1 (PON1), могут влиять на чувствительность к РС. Для определения влияния вариативности гена параоксоназы 1 на предрасположенность к РС, нами были исследованы два однонуклеотидных полиморфизма гена параок-

соназы 1, rs662 и rs854560 в группе больных РС и в контрольной группе.

Методы исследований

Проведен сбор образцов крови здоровых доноров на Республиканской станции переливания крови. 146 образцов крови здоровых доноров и 103 образцов крови больных рассеянным склерозом собрано для последующего выделения из них ДНК. Средний возраст группы здоровых доноров 37.0 ± 8.86 , соответствует среднему возрасту группы больных, где составляет 39.13 ± 6.84 , соотношение мужчин и женщин 1:2 в обеих выборках. Средний возраст больных женщин 40.7, здоровых 39.2; мужчин 36.9 и 36.1, соответственно.

Сбор образцов крови больных РС Астана и классификация пациентов по мировым критериям (шкала EDSS и критерии Позера) осуществлялся на базе Казахской Государственной Медицинской Академии (кафедра нейрохирургии и неврологии) г. Астана.

Выделение ДНК осуществлялось методом фенольно-хлороформной депротеинизации по Маниатису. Концентрация выделенной ДНК измерялась спектрофотометрически и приводилась к стандартной 10нг/мкл.

Последовательности праймеров к каждому исследуемому участку подбирались при помощи программы Primer-Express, согласно последовательностям, полученным из геномных баз данных ENSEMBL и NCBI.

Анализ вариативных участков генов проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Визуализацию результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 12% ПААГ.

Наблюдаемое распределение частот генотипов исследуемых популяций проверяли соответствию распределения Харди-Вайнберга. Достоверность различий в частотах встречаемости аллелей и генотипов оценивали с помощью критерия χ^2 и p-value. Для обработки данных и получения графического изображения использовали программу Microsoft Excel, Statistic.

Результаты исследований

Ранее полученные данные показывают, что оксидативный стресс и последующий процесс перекисного окисления липидов играет огромную роль в патогенезе РС. Активные формы кислорода (АФК), в избытке генерируемые преимущественно макрофагами, вовлечены как медиаторы демиелинизации и повреждения аксонов при РС. АФК также повреждают важнейшие клеточные компоненты, такие как липиды, белки и нуклеиновые кислоты, приводя к клеточной смерти путем некроза или апоптоза.

Целью настоящего исследования было проанализировать связь аллельных вариантов гена параоксоназы 1 с риском РС. Параоксоназа 1 (PON 1), это полиморфный фермент многих тканей, также как и плазмы крови, который ассоциирован с липопротеинами высокой плотности (HDL). Вначале фермент был охарактеризован как гидролаза органофосфатов, и получил название по общему субстрату, параоксону. Позже было показано, что PON играет важнейшую роль в метаболизме липидов как молекула-антиоксидант посредством:

- гидролиза активных окисленных фосфолипидов;

- разрушения липидных гидропероксидов и H_2O_2 (пероксидазо-подобная активность);
- сохранения чистоты и функции HDL;
- предотвращения окисления LDL (липопротеинов низкой плотности).

В недавних исследованиях, показавших связь активности PON1 плазмы и воспалительным процессом, сообщалось, что тяжесть болезни снижает роль параоксоназной активности у пациентов с ревматоидным артритом. Два наиболее известных полиморфизма были описаны в кодирующем регионе PON1 человека, которые ведут к замене глутамина на аргинин в позиции 192 (Q192R) и замене лейцин-метионин в позиции 55 (L55M). Эти полиморфизмы, чья частота широко варьирует в различных популяциях, составляют молекулярный базис для межиндивидуальной вариабельности активности PON1, и, как следствие, защиты от перекисного повреждения липидов в мембранах [2]. Несмотря на это, очень небольшое количество исследований посвящено связи обоих полиморфизмов PON1 и риска развития патологий нейродегенеративного происхождения. Кроме того, многие из этих исследований не подтверждают ассоциации с нейродегенеративными заболеваниями, или показывают противоречивые наблюдения у пациентов различных популяций, и практически никто не исследует ассоциацию с риском РС.

На рис. 1 показана аминокислотная последовательность параоксоназы 1, там же отмечены полиморфные варианты, приводящие (или не приводящие) к замене аминокислоты в кодирующей последовательности.

```

1  MAKLIALTLLGMGLALFRNHQSSYQTRLNALREVQPVELPNCNLVKGIETGSEDLEILPN
61  GLAFISSGLKYPGIKSFNPNSPGKILLMDLNEEDPTVLELGITGSKFDVSSFNPHGISTF
121 TDEDNAMYLLVNVNHPDAKSTVELFKFQEEKSLHLKTIHKLLPNLNDIVAVGPEHFYQ
181 TNDHYFLDPYLSWEMYLGLAWSYVVYSPSEVRVVAEGFDFANGINISPDGKYVYIAEL
241 LAHKIHVYEKHANDWTLTPLKSLDFNTLVDNISVDPETGDLWVGCHPNGMKIFFYDSENPP
301 ASEVLRIQNILTEEPKVTQVYAENGTVLQGSTVASVYKGLLIGTVFHKALYCEL
    
```

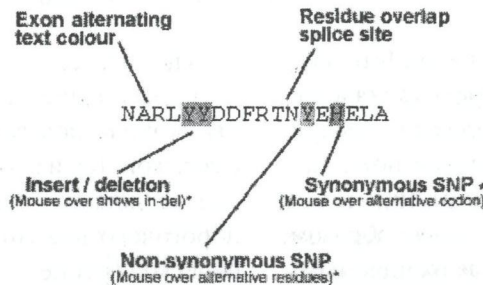


Рис. 1. Аминокислотная последовательность параоксоназы 1. Полиморфные варианты выделены цветом (по материалам базы данных ENSEMBL)

Для последующего исследования нами были отобраны два наиболее общих полиморфных варианта гена PON1: M55L и Q192R (ранее они встречались в литературе как M54L и Q191R, поскольку в двух вариантах секвенирования, проведенных альтернативно, оказалась разная нумерация аминокислот). В некоторых зарубежных исследованиях указывалось на взаимосвязь данных типов полиморфизма с различными патологиями центральной нервной системы, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз [2].

На рисунке 2 и 3 показано электрофоретическое распределение продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента гена PON1: M55L и Q192R соответственно.

В результате проведенного нами исследования полиморфизма M55L (rs 854560, reference NCBI) были получены следующие результаты (табл. 1-4).

Таблица 1. Распределение частот генотипов L55M полиморфизма гена параоксоназы 1 в казахской этнической группе

частоты генотипов	больные РС	Здоровые	HWE exp.	
			больные РС	Здоровые
LL	0,706	0,786	0,728	0,789
LM	0,294	0,204	0,251	0,198
MM	0,000	0,010	0,022	0,012
			$P=$	0,281037685
				0,979061326

Таблица 2. Распределение частот генотипов L55M полиморфизма гена параоксоназы 1 в русской этнической группе

частоты генотипов	больные РС	здоровые	HWE exp.	
			больные РС	здоровые
LL	0,583	0,545	0,563	0,563
LM	0,333	0,409	0,375	0,375
MM	0,083	0,045	0,063	0,063
			$p=$	0,748040666
				0,801082022

Для проверки распределения Харди-Вайнберга, исходя из фактического распределения аллелей, нами было вычислено ожидаемое распределение генотипов. Значение p -value показало, что ожидаемое распределение не отличается от полученного в результате опыта. Таким образом, различия между фактическими и ожидаемыми частотами генотипов носят статистический характер и не позволяют отклонить нулевую гипотезу.

При сравнении распределения аллелей и генотипов в группе больных РС и контрольной группы не было показано значимых различий, как в казахской, так и в русской этнической группе. Это подтверждается значением χ^2 , не превышающим порогового значения (0,199769 – в казахской этнической группе, 0,207391 – в русской этнической группе). Таким образом, мы можем заявить, что данный полиморфизм не принимает принципиаль-

1 2 3 4 5 6 7

Рис. 2. Электрофорез продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента гена PON1: M55L

Дорожки 1, 4, 5, 6 – генотип LL, 2, 3 – генотип LM, 7 – генотип MM.



ного участия в формировании предрасположенности к развитию рассеянного склероза, как в казахской, так и в русской этнической группе.

Тем не менее, нами обнаружены значительные различия в распределении частот аллелей и генотипов данного полиморфизма между исследованными нами этническими группами. То, что данные различия являются статистически значимыми, подтверждается величиной χ^2 , составляющей 4.59 для генотипов и 5.9 для аллелей. В таблице 5 приведены значения частот аллелей и

генотипов нескольких исследований, включая наше исследование. Данные проекта HarMap в сравнении с данными нашего исследования показывают, что казахская этническая группа по распределению частот аллелей и генотипов более сходна с азиатскими этническими группами (японцы и китайцы), см. табл. 5, и близка к группе африканцев. Группа русских, рассмотренная в нашем исследовании, занимает промежуточное положение, близкое, тем не менее, к европейской группе.

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов Q192R полиморфизма гена параоксоназы 1 в различных этнических группах*

Источник	Этн. группа	A/A	A/T	T/T	A	T
HarMap-CEU (NCBI) [3]	Европейцы	0.362	0.483	0.155	0.603	0.397
HarMap-HCB (NCBI) [3]	Азиаты (китайцы Хан)	0.933	0.067	-	0.967	0.033
HarMap-JPT (NCBI) [3]	Азиаты (японцы)	0.841	0.159	-	0.920	0.080
HarMap-YRI (NCBI) [3]	Африканцы (Юж. Сахара)	0.746	0.237	0.017	0.864	0.136
(данн. иссл.)	Казахи	0.786	0.204	0.010	0.853	0.147
(данн. иссл.)	Русские	0.545	0.409	0.045	0.750	0.250
Sidoti et al. 2007, [2]	Итальянцы	0.860	0.040	0.100	0.880	0.120
Ueno et al. 2003 [4]	Японцы	0.925	0.075	-	0.880	0.120
Huang et al. 2006 [5]	Китайцы	0.940	0.060	-	0.970	0.030

*Примечание. Обозначение A/A соответствует гомозиготе по нуклеотиду А в позиции 94784020 хромосомы 7 и, как следствие гомозиготе по L/L (лейцину) в аминокислотной последовательности фермента (A/T соответствует L/M, а T/T - M/M, где М – метионин).

Вариант Q192R гена параоксоназы 1 также является функционально значимым, поскольку приводит к изменению аминокислотной последовательности гена, и, как следствие, к изменению его активности. Данный вариант расположен в 5 экзоне гена параоксоназы 1 и обуславливает замену аргинин-глицин.

В таблицах 4, 5 показано распределение аллелей и генотипов полиморфизма Q192R гена параоксоназы 1 в казахской этнической группе. Здесь, в отличие от L55M сайта, найдены достоверные различия между группой больных рассеянным склерозом и контрольной группой ($\chi^2=5,6291$). Фактическая величина χ^2 превы-

шает критическое значение, следовательно, нулевая гипотеза может быть отвергнута на принятом уровне значимости ($\alpha=0.05$) Таким образом, несмотря на то, что оба исследованных нами полиморфизма расположены в одном гене, один из них, в данном случае Q192R, может быть фактором риска рассеянного склероза в казахской этнической группе. В русской этнической группе достоверных различий в распределении аллелей и генотипов между группами больных и здоровых найдено не было. Найдены достоверные этнические различия по данному полиморфизму между исследованными группами.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

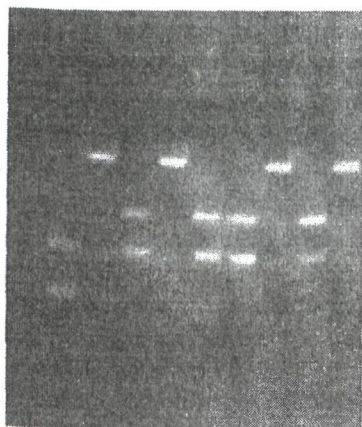


Рис.3 Электрофорез продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента гена PON1: Q192R
Дорожки 2, 4, 7, 9 – амплификация, 1 – генотип RR, 3, 6, 8 – генотип QQ, 5 – генотип QR.

Достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов Q192R полиморфизма гена PON1 в казахской этнической группе показывают возможность использования данного полиморфизма в качестве предиктивного признака рассеянного склероза. Относительный риск развития рассеянного склероза по полиморфизму Q192R гена PON1 в казахской этнической группе составляет 3.64.

Таблица 4. Распределение генотипов полиморфизма Q192R (rs662) гена параоксоназы I в казахской этнической группе

частоты генотипов			HWE exp.	
	Больные РС	контроль	Больные РС	контроль
QQ	0,273	0,452	0,228	0,443
QR	0,409	0,426	0,499	0,445
RR	0,318	0,122	0,273	0,112
		p=	0,441649655	0,954486065

Таблица 5. Распределение аллелей полиморфизма Q192R гена параоксоназы I в казахской этнической группе

частоты аллелей	Больные РС	контроль	χ^2	p-value
Q	0,4773	0,6652	0,7592 (по генотипам)	0,3836 (по генотипам)
R	0,5227	0,3348	5,6291 (по аллелям)	0,0177 (по аллелям)

ЛИТЕРАТУРА

1. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. // N. Engl. J. Med. 2007. 357.
2. Sidoti A., Antognelli C., Rinaldi C. et al. Glyoxalase I A111E, paraoxonase I Q192R and L55M polymorphisms: susceptibility factors of multiple sclerosis? // Mult. Scler. 2007. V.13. P.446-453.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
4. Ueno T., Shimazaki E., Matsumoto T. et al. Paraoxonase I polymorphism Leu-Met55 is associated with cerebral infarction in Japanese population. // Med. Sci. Monit. 2003. V.9(6). P.208-212/
5. Huang Q., Liu Y.H., Yang Q.D. et al. Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population. // Neurol. Res. V.28(5). P.549-554.

Резюме

Шашыраңқы склероз (ШС) ауруымен ауыратын казак және орыс пациенттер топтары мен бақылаулық топ ара-

сында PCR-RFLP көмегімен екі локустағы (M55L Q192R) PON1 геннің полиморфизмі зерттелді. Аллелдер мен генотиптердің таралу жиілігі χ^2 тест көмегімен бағаланды. Статистикалық талдау M55L полиморфизмі мен шашыраңқы склероз арасында ешқандай байланысты көрсетпеді. Ол екі топ үшін де бірдей болды. Қазақ тобы ішінде Q192R локусының PON1 гені полиморфизмі мен шашыраңқы склероз арасында байланыс табылды ($\chi^2=5,63$). Шашыраңқы склерозбен ауырудың салыстырмалы тәуекелі Q192R локусының PON1 гені полиморфизмі бойынша 3,64-ке тең.

Summary

Polymorphism of the PON 1 genes M55L and Q192R loci in Kazakh and Russian groups of MS patients in comparison with control group was studied by PCR-RFLP method. Alleles and genotypes frequencies distribution was estimated using χ^2 test. Statistical analysis didn't show M55L polymorphism's association with multiple sclerosis in both Kazakh and Russian groups of MS patients. The association of PON 1 gene's Q192R polymorphism with MS in Kazakh ethnic group was revealed ($\chi^2=5,63$). The relative risk of MS manifestation corresponding to PON1 gene's Q192R polymorphism is 3,64.