

Любовь Ильинична Колесникова, Игорь Юрьевич Урыбин, Владимир Анатольевич Шенин, Владимир Валентинович Долгих, Елена Владимировна Беляева

ПОЛИМОРФИЗМЫ APOB3' VNTR, B1AR A145G, ACE I/D И ЭССЕНЦИАЛЬНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

ГУ Научный центр медицинской экологии ВШНЦ СО РАМН

664003 Иркутск, ул. Тимирязева. 16

Проведено исследование распределения аллелей и генотипов полиморфных локусов ACE, B1AR и APOB. Установлено, что в группе детей и подростков с эссенциальной артериальной гипертензией повышенная частота встречаемости аллелей APOB 3g VNTR полиморфизма с меньшим количеством tandemных повторов (HVE \leq 35), аллеля ACE с делецией и гомозиготного 145GG B1AR генотипа выше чем в контрольной группе.

Ключевые слова: эссенциальная артериальная гипертензия, APOB3' VNTR, ACE, B1AR, предрасположенность

Артериальная гипертензия является мультифакторным, полигенным заболеванием. Генетическими факторами риска могут быть гены, кодирующие белковые продукты, участвующие в регуляции сердечного выброса и тонуса сосудов, связанные с транспортом и метаболизмом липидов, солей и др.

В регуляции тонуса сосудов участвует ренин-ангиотензиновая система. Ангиотензин-конвертирующий фермент ACE трансформирует ангиотензин I в регуляторный пептид ангиотензин II, который действует как сильный вазоконстриктор. В гене ACE (хромосомная локализация 17g23) обнаружен инсерционно-делеционный полиморфизм – наличие-отсутствие Alu-повтора 287 п.н. в 16-м интроне гена [1]. Данный полиморфизм не изменяет функцию фермента, но влияет на степень экспрессии гена. Наличие D-аллеля ассоциировано с более высоким уровнем циркулирующего ACE (от 14 до 50 %) и более высокой активностью тканевого фермента. Отмечено повышение частоты генотипа DD у больных гипертензией [2].

Ген β 1-адренергического рецептора (B1AR) расположен на 10-й хромосоме (10 g 23-25), содержит 1434 п.н. и кодирует полипептид из 477 аминокислотных остатков. В кодирующей части гена обнаружено два полиморфизма: замены оснований A145G и G1165C [3]. Замена основания A145G вызывает появление Ser49Gly полиморфизма в полипептиде и влияет на связывание катехоламинов с рецептором. β 1-адренергический рецептор экспрессируется в ми-

оцитах сердца и в ответ на стимуляцию вызывает увеличение сердечного выброса через повышение частоты и силы сокращений миокарда. Показана ассоциация Ser49Gly полиморфизма с частотой сокращений сердца в состоянии покоя [10].

APOB ген расположен на 2p24-p23, состоит из 29 экзонов и 28 интронов и имеет протяженность, равную 43 тысячи пар оснований. Ген кодирует крупнейший полипептид APOB, являющийся основным белковым компонентом липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Повышенная плазматическая концентрация APOB-100 и ЛПНП является определяющим фактором атеросклероза сосудов. На 3g конце гена обнаружен гипервариабельный район (HVR), состоящий из варьирующего количества tandemных повторов (VNTR) [5]. В некоторых работах показана ассоциация отдельных аллелей с уровнем ЛПНП, сердечно-сосудистыми заболеваниями, эссенциальной гипертензией [6-10]. В различных популяциях индекс гетерозиготности данного полиморфизма варьирует от 55 до 84 %.

Материалы и методы

Комплексное обследование было проведено у 169 детей, разделенных на группы согласно показателям уровня артериального давления.

Основная группа (дети с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ)) - 129 детей русской национальности, имеющие повышенное артериальное давление (АД), превышающее значение 95 пер-

Колесникова Л.И. – д-р. мед. наук, проф., чл.-кор. РАМН, директор, iphr@sbamsr.irk.ru

Урыбин И.Ю. – н. с. лаборатории генетико-биохимических проблем онтогенеза

Шенин В.А. – д-р. биол. наук, заведующий лабораторией генетико-биохимических проблем онтогенеза

Долгих В.В. – д-р. мед. наук, проф., зам. директора

Беляева Е.В. – м. н. с. лаборатории генетико-биохимических проблем онтогенеза

центильного коридора согласно региональным стандартам уровня АД. Для исследования были выбраны подростки 12-18 лет, проживающие на территории Иркутской области. Все дети находились на стационарном обследовании и лечении в клинике ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН. Контрольная группа – 40 детей с нормальными показателями уровня артериального давления. Исследования на здоровых испытуемых выполнены с информационного согласия родителей и соответствуют этическим нормам Хельсинкской декларации (2000).

Основным критерием отбора являлось отсутствие родства между индивидами, а также отсутствие острых и сопутствующих хронических патологических процессов.

Включение детей в первую группу проводилось по результатам многократного измерения АД, а также холтеровского мониторирования. Всем подросткам проводилось измерение роста и веса с вычислением индекса массы тела. Наличие хронических очагов инфекции, хронических патологических процессов выявлялось на основании анамнеза, клинического осмотра и анализа амбулаторной карты.

Диагноз ЭАГ верифицировался методом исключения заболеваний и состояний, которые могли обусловить вторичное повышение уровня АД. С этой целью всем подросткам, имеющим уровень АД, превышающий значение 95 перцентильного коридора регионального норматива распределения уровня АД, применялся комплекс клинко-биохимических исследований. Проведены следующие диагностические мероприятия: общий анализ крови и мочи, проба по Нечипоренко; ультразвуковое исследование почек и мочевыводящих путей, надпочечников; консультации эндокринолога, невропатолога, окулиста; рентгенография шейного отдела позвоночника в двух проекциях, эхоэнцефалоскопия, электроэнцефалография. В результате были исключены заболевания почек, эндокринные заболевания и нарушения обмена веществ, заболевания центральной нервной системы и сердечно-сосудистой системы.

Ядра лейкоцитов получали сахарозным лизисом из 0,2-0,5 мл венозной крови. Выделение ДНК проводили используя наборы реагентов DIATOM DNA Prep100 с гуанидинтиоционатом и нуклеосорбентом. ПЦР амплификацию ApoB 3' VNTR выполняли с использованием набора реактивов ГНЦ РФ «ГосНИИ генетика», ACE и B1AR – с использованием наборов производства Института цитологии и генетики (г. Новосибирск) в условиях, предложенных производителями. Продукты реакции разгоняли в 2 % агарозных гелях, содержащих 0,5 мкг/мл этидиума бромид. Для

типирования ApoB аллелей применяли аллельный маркер, ACE и B1AR аллели определяли с использованием 100 п.н. маркера.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы «Statistica v. 6.0». Относительный риск (OR) рассчитывался по формуле $OR = a/b*d/c$, где a – количество аллелей ApoB < 35 tandemных повторов в группе детей с ЭАГ; b – количество аллелей ApoB ≥ 35 повторов в группе детей с ЭАГ; d – количество аллелей ApoB ≥ 35 в контрольной группе; c – количество аллелей ApoB < 35 в контрольной группе. OR указан с 95 %-м доверительным интервалом. Границы доверительного интервала вычисляли по формулам:

$$OR_{min} = OR^{(1-1,96/\sqrt{\chi^2})},$$

$$OR_{max} = OR^{(1+1,96/\sqrt{\chi^2})}.$$

Результаты

По ApoB полиморфизму типировано 84 препарата ДНК основной группы и 40 препаратов контрольной. Выявлено 11 аллелей с количеством повторов от 31 до 55 и 30 различных генотипов. Наиболее часто встречающимся аллелем является HVE 37, затем следует HVE35 и генотип 35/37. В обеих группах наблюдается распределение аллелей с пиками HVE 31, 37, 47, характерное для европеоидных популяционных данных.

Для сравнения выборок использована 4-аллельная модель. Аллели были сгруппированы по классам: HVE<35, HVE35, HVE37 и HVE>37 (*табл. 1*). Частота коротких аллелей достоверно различается. Доля аллелей с числом повторов < 35 в группе детей с ЭАГ в 2,2 раза выше, чем в контрольной группе (19,64 % против 8,75 %, $\chi^2=4,77$, $p<0,05$, $OR= 2,55$ (1,10-5,92)). Аллель с 35 повторами также в большей степени представлен в группе детей с ЭАГ (27,4 % против 22,5 %, статистически не достоверно).

Таблица 1

Распределение аллелей ApoB 3' VNTR по 4-аллельной модели в исследованных группах

Аллели	Контрольная группа		Группа с ЭАГ	
	Кол-во	%	Кол-во	%
HVE <35	7	8,8	33	19,6*
HVE 35	18	22,5	46	27,4
HVE 37	33	41,3	56	33,3
HVE >37	22	27,3	33	19,6
Всего	80		168	

По полиморфизму гена ACE было типировано 129 проб ДНК из группы детей с ЭАГ и 39 проб из контрольной группы. Распределение генотипов ACE в группе детей и подростков с ЭАГ и в контрольной группе приведено в *табл. 2*. Частота генотипа DD у

пациентов с ЭАГ в 1,8 раза выше, чем в контрольной группе, частота II генотипа, наоборот, в контрольной группе во столько же раз больше, чем в группе детей с ЭАГ ($\chi^2=3,27$, $p>0,05$). Частота I аллеля в контрольной группе равна 0,63, D аллеля - 0,37, а в группе детей с ЭАГ - 0,51 и 0,49 соответственно.

Таблица 2

*Распределение генотипов ACE I/D полиморфизма
в исследованных группах*

Генотип	Контрольная группа		Группа с ЭАГ	
	Кол-во	%	Кол-во	%
II	14	35,9	26	20,2
ID	21	53,9	79	61,2
DD	4	10,3	24	18,6
Всего	39		129	

По полиморфизму гена B1AR исследовано 89 образцов ДНК в группе детей с ЭАГ и 34 образца в контрольной группе. Данные по распределению генотипов и частот аллелей гена B1AR представлены в **табл. 3**. Как в выборке больных ЭАГ, так и в контрольной группе отклонений в распределении генотипов от равновесия Харди–Вайнберга не наблюдается. Частоты генотипов полиморфизма A145G гена B1AR распределились следующим образом: AA - 51,7 %; AG - 34,8 %; GG - 13,5 % в группе больных ЭАГ и 61,8, 32,4, 5,8 % в контрольной группе соответственно. Соотношение аллелей A/G в контрольной группе составляет 0,78/0,22, у больных ЭАГ - 0,69/0,30. Доля гомозигот по мутации GG у больных ЭАГ в 2,3 раза выше, чем в контрольной группе, но достоверность по χ^2 критерию отсутствует, возможно, из-за недостаточного объема выборок.

Таблица 3

*Распределение частот генотипов B1AR A145G
полиморфизма в исследованных группах*

Генотип	Контрольная группа		Группа с ЭАГ	
	Кол-во	%	Кол-во	%
AA	21	61,8	46	51,7
AG	11	32,4	31	34,8
GG	2	5,8	12	13,5
Всего	34		89	

Таким образом, статистически достоверное различие между группами обнаружено только по VNTR полиморфизму гена APOB. Коротких аллелей с числом повторов ≤ 35 достоверно больше в группе детей и подростков с эссенциальной гипертензией.

Литература

1. Rigat B. PCR detection of the insertion / deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP 1) (dipeptidyl – carboxypeptidase 1) // Nucl. Acids.

Res. 1992. 20:1433.

2. Danser A.H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion / insertion polymorphism // Circulation. 1995. 92:1387-1388.

3. Magbool A. Common polymorphisms of $\beta 1$ -adrenoreceptor: identification and rapid screening assay // Lancet. 1999. 353:897.

4. Knott T.J. A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene // Nucleic Acids Res. 1986. 14:9215-9216.

5. Friedl W. Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls // J. Lipid Res. 1990. 31:659-665.

6. Hegele R.A., Herbert P.N., Blum C.B. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction // New Engl. J. Med. 1986. 315:1509-1515.

7. Wu J.H. Apolipoprotein B 3' hypervariable repeat genotype: association with plasma lipid concentration, coronary artery disease, and other restriction fragment polymorphisms // Clin Chem. 1996. 42:927-932.

8. Frossard P.M., Obineche E.N., Lestringant G.G. Association of an Apolipoprotein B Gene Marker With Essential Hypertension // Hypertension. 1999. 33:1052-1056.

9. Garasto S. A study of the average effect of the 3' APOB-VNTR polymorphism on lipidemic parameters could explain why the short alleles (<35 repeats) are rare in centenarians // BMC Med. Genet. 2004. 9(5):3.

10. Ranade K. A polymorphism in the $\beta 1$ adrenergic receptor is associated with resting heart rate // Amer. J. Hum. Genet. 2002. 70:935-942.

POLYMORPHISMS ApoB3' VNTR, B1AR A145G, ACE I/D AND ESSENTIAL HYPERTENSION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

**Lyubov Il'ichna Kolesnikova, Igor Yurevich Urybin, Vladimir Anatolievich Shenin,
Vladimir Valentinovich Dolgikh, Elena Vladimirovna Belyaeva**

*SI Scientific Center for Medical Ecology of ESSC SB RAMS
664003, Irkutsk, Timiryazev str., 16*

The paper presents results of the research of distribution of the incidence of alleles and genotypes of polymorphous locus ACE, B1AR, ApoB among children and adolescents with essential hypertension and the normals. The analysis of polymorphism variability showed higher level of alleles ACE with deletion, ApoB alleles HVE \leq 35 and GG genotypes B1AR in children and adolescents with essential hypertension.

Key words: essential arterial hypertension, ApoB3' VNTR, ACE, B1AR, predilection

*Kolesnikova L.I. - director, Doctor of Medical Sciences, professor, corresponding member of RAMS,
iphr@sbamsr.irk.ru*

Urybin I.Y. - scientist of laboratory of genetic biochemical problems of ontogenesis

Shenin V.A. - head of laboratory of genetic biochemical problems of ontogenesis, Doctor of Medical Sciences

Dolgikh V.V. - vice-director of institute, Doctor of Medical Sciences, professor

Belyaeva E.V. - junior scientist of laboratory of genetic biochemical problems of ontogenesis