

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ T174M И M235T ГЕНА АНГИОТЕНЗИНОГЕНА С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В РОСТОВСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Нгуен Тхи Чанг

Научно-исследовательский институт биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону, trangtrang@yandex.ru

Проведено сравнение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов T174M и M235T гена ангиотензиногена (AGT) и выявлена их взаимосвязь с ишемической болезнью сердца (ИБС) и вариабельностью количественных факторов риска у больных с ИБС, в контрольной группе индивидов без клинических признаков сердечно-сосудистых нарушений и в общепопуляционной выборке лиц, не дифференцированных по отношению к коронарному атеросклерозу. Впервые определены частоты данного полиморфизма у населения Ростовской области.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, атеросклероз, ренин-ангиотензиновая система, ангиотензиноген, ишемическая болезнь сердца.

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISM T174M AND M235T OF THE ANGIOTENSINOGEN GENE AND ISCHEMIC HEART TROUBLE IN THE ROSTOV POPULATION

Nguyen Thi Trang

Scientific research institute of biology of Southern federal university, Rostov-on-Don, trangtrang@yandex.ru

Allele and genotype frequencies of the T174M polymorphism of the angiotensinogen gene were for the first time estimated in the Rosrtov population. The polymorphism was tested for association with Ischemic heart trouble and with several quantitative risk factors in patients with angiographically verified CAS, healthy individuals, and in a population sample nondifferentiated with respect to CAS

Keywords: genetic polymorphism, an atherosclerosis, renin-angiotensin system, angiotensin, an ischemic heart trouble.

Актуальной проблемой современной медицины является индивидуализация диагностических и терапевтических подходов к пациенту, основанная на исследовании его генетического статуса. В последнее время значительное количество исследований посвящено поиску наследственных факторов, пред-

располагающих к неблагоприятному течению основных сердечно-сосудистых заболеваний. Одно из основных направлений в этих исследованиях — изучение так называемых генов-кандидатов [1]. Анализ полиморфизмов генов позволяет проводить профилактику и лечение патологических состояний индивидуально

с учетом генетического статуса пациента. Однако зачастую результаты исследований противоречивы, и проблема изучения распространенности полиморфизмов генов в каждом географическом регионе остается актуальной [2].

Целью настоящего исследования являлись изучение распространенности аллелей T174M и M235T гена *AGT* у русского населения Ростовской области и оценка связи предполагаемых маркеров с ишемической болезнью сердца (ИБС) и количественными патогенетически значимыми факторами риска этого заболевания.

Материалы и методы исследования

В исследование включались 150 пациентов с ИБС, поступившие в стационар Ростовской областной клинической больницы. Диагноз ставили на основании клинических и биохимических исследований и данных коронароангиографии (у части больных). У части больных ИБС был диагностирован инфаркт миокарда (ИМ). Контрольная группа была представлена студентами Южного федерального университета ($n = 150$), имеющими аналогичный профиль основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, у которых проведенная эхо- и электрокардиография не выявила достоверных признаков ИБС.

Выборки были этнически однородны и составлены из русских (на основании паспортных данных), проживающих в г. Ростове-на-Дону. Геномную ДНК пациентов использовали для амплификации фрагментов ДНК, содержащих полиморфные маркеры гена *AGT*, предположительно вовлеченных в патогенез атеросклероза и ишемической болезни сердца. ДНК вы-

деляли из лейкоцитов периферической крови стандартным методом [3]. Участок гена *AGT*, содержащий сайты T174M и M235T, амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4]. Продукты амплификации и рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 3%-ном агарозном и окрашивали бромистым этидием.

Анализ однонуклеотидных замен осуществляли с помощью системы NCBI в сети Интернет (www.ncbi.nlm.nih.gov) и dbSNP (информация о полиморфных маркерах).

Соответствие распределения аллелей и генотипов равновесию Харди-Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Для оценки связи количественных признаков с генетическим полиморфизмом использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Во всех статистических тестах в качестве критерия статистической достоверности рассматривали уровень значимости более 95%.

Результаты и обсуждение

В гене *AGT* уже известно более 30 различных полиморфных сайтов [5, 6]. Среди обнаруженных к настоящему времени аллелей гена *AGT* в качестве генетических маркеров сердечно-сосудистых заболеваний чаще всего используются полиморфные аллели, кодирующие *AGT* с заменой Met \rightarrow Thr в положении 235 (M235T) и Thr \rightarrow Met в позиции 174 (T174M). Частота этих мутаций в гене *AGT* варьирует в различных популяциях (табл. 1,2).

В результате типирования по полиморфизму T174M гена *AGT* у людей в разных популяциях было выявлено, что мутационный аллель T встречается редко в европейских популяциях, при этом часто встречается в африканских и азиатских популяциях

Таблица 1

Частота полиморфного варианта T174M гена AGT в различных популяциях
(данные получены из базы данных <http://alfred.med.yale.edu> [29])

Географический регион	Популяция	Выборка (n) (дата)	Частота аллеля	
			C	T
Африка	Хема (SA002028M)	34 (4/12/2007)	0.088	0.912
Африка	Мбути (SA002025J)	64 (4/12/2007)	0.016	0.984
Европа	Датчане (SA001987Z)	18368 (1/11/2007)	0.878	0.122
Европа	Ашкенадия (SA002033I)	48 (4/12/2007)	0.187	0.813
Азия	Пакистан (SA002034J)	60 (4/12/2007)	0.183	0.817
Азия	Монголия (SA002037M)	48 (4/12/2007)	0.104	0.896
Восточная Азия	Корея (SA002038N)	48 (4/12/2007)	0.146	0.854
Восточная Азия	Япония (SA002035K)	48 (4/12/2007)	0.083	0.917
Северная Америка	Американцев европейского происхождения (SA002029N)	48 (4/12/2007)	0.146	0.854

Таблица 2

Частота полиморфных вариантов M235T гена AGT в различных популяциях
(данные получены из базы данных <http://alfred.med.yale.edu> [29])

Географический регион	Популяция	Выборка (n) (дата)	Частота аллеля	
			C	T
Африка	Биакская (SA000005F)	136 (1/29/2008)	0.956	0.044
Африка	Ибоская (SA000099S)	96 (1/29/2008)	0.927	0.073
Африка	Американцев африканского происхождения (SA000101C)	180 (1/29/2008)	0.800	0.200
Европа	Чешская (SA002031G)	48 (4/12/2007)	0.521	0.479
Европа	Русская (SA000019K)	94 (1/29/2008)	0.394	0.606
Азия	Пакистан (SA002034J)	60 (4/12/2007)	0.750	0.250
Азия	Монгольская (SA002037M)	48 (4/12/2007)	0.729	0.271
Восточная Азия	Японская (SA000010B)	102 (1/29/2008)	0.677	0.324
Восточная Азия	Корейская (SA003027M)	106 (10/17/2009)	0.824	0.176
Океания	Новозеландец (SA001992V)	812 (1/25/2007)	0.380	0.620
Океания	Микронезии (SA000063J)	72 (1/29/2008)	0.667	0.333
Сибирь	Якутская (SA000011C)	102 (1/29/2008)	0.559	0.441
Северная Америка	Пима, Мексика (SA000026I)	106 (1/29/2008)	0.972	0.028
Южная Америка	Каритяна (SA000028K)	106 (1/29/2008)	0.991	0.009

При изучении полиморфизма M235T гена AGT у коренных жителей Европы отмечается повышение частоты мутантного аллеля T в сравнении с наблюдаемыми значениями в ряде африканских, азиатской и американ-

ской популяций. Некоторые американские популяции (Пима, Мексика, Каритяна) характеризуются снижением частоты аллеля T по сравнению с азиатской и европейской популяциями.

Таблица 3

Частота аллелей T235 и M174 и их связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями в различных популяциях

Популяция	Количество обследованных	Частота аллеля T235	Частота аллеля M174	Ссылка
Австралийцы	92	0,42	0,08	[7]
Французы	477	0,47	0,11	[5]
Японцы	92	0,91	0,12	[5]
Китайцы	268	0,91	0,09	[6,25]
Европейцы (белые)	149	0,51	0,10	[4]

В 1992 г. было показано полное сцепление полиморфных вариантов M235T и T174M и вовлеченность гена AGT в патогенез эссенциальной гипертензии (ЭГ).

Частота аллелей T235 и M174 высока среди больных ЭГ и связана с этим заболеванием [8]. В дальнейшем была выявлена корреляция между аллелем T235 гена AGT и степенью коронарного повреждения у больных с высоким риском коронарного атеросклероза у больных ишемической болезнью сердца [9, 30]. При обследовании 63 семей белых европейцев связи между ЭГ и двумя изученными полиморфными вариантами гена AGT (M235T и T174M) найдено не было [4], но изучение этнически однородной японской популяции показало,

что вариант 174T связан с ЭГ [10] и с уровнем систолического давления [11]. На выборке из 422 больных из Новой Зеландии показано, что аллель T235 гена AGT является независимым фактором риска ишемической болезни сердца и примерно в два раза повышает риск этого заболевания [12]. Считается, что мутантный гомозиготный локус 235TT может быть надежным маркером риска артериальной гипертензии [13]. M235T гена AGT с сердечно-сосудистыми заболеваниями представлен в табл. 4. В большинстве случаев связь полиморфных вариантов гена AGT с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями вполне объяснима, учитывая прямое влияние AGT на уровень кровяного давления [14].

Таблица 4

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера T174M гена AGT в группах «ИБС+» и «ИБС-»

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«ИБС+» (n = 150)	«ИБС-» (n = 150)			
Аллель T174	0,60	0,84	13,27	p<0,005	0,28 [0,14 — 0,57]
Аллель 174M	0,40	0,16			3,56 [1,76 — 7,26]
Генотип TT	0,22	0,70	39,44	p<0,005	—
Генотип TM	0,76	0,28			2,53 [0,25 — 25,37]
Генотип MM	0,02	0,02			0,39 [0,04 — 3,95]

Частоты аллелей, распределение генотипов, а также оценка их соответствия равновесию Харди-Вайнберга в исследованных группах представлены в табл. 1,2 [26,27,28,29]. Частота мутантного аллеля 174М гена *AGT* в различных популяциях варьирует от 0,122 у европейцев до 0,984 у африканцев (табл. 1). В нашей работе частота этого аллеля в контрольной группе составила 0,16, а в группе больных ишемической болезнью сердца — 0,4 (табл. 4).

Было показано, что носители аллеля *M* и генотипа *TM* имеют повышенный риск развития ИБС ($OR = 3,56$ и $2,53$ соотв.), в то время как носители аллеля *T* и генотипа *MM* — пониженный риск ($OR = 0,28$ и $0,39$ соотв.).

При анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *M235T* гена *AGT* (табл. 5) были обнаружены статистически достоверные различия. Было показано, что частота аллеля *235T* в контрольной группе составила 0,179, а в группе с ИБС — 0,224.

Было показано, что носители аллеля *M* и генотипа *TT* имеют повышенный риск развития ИБС ($OR = 5,50$ и $2,59$ соотв.), в то время

как носители аллеля *T* и генотипа *MT* — пониженный риск ($OR = 0,18$ и $0,39$ соотв.).

При изучении больных ИБС и ЭГ из японской популяции [11, 15] и популяции китайцев, больных одновременно ИБС и инфарктом миокарда, было показано, что полиморфный маркер T174M тоже ассоциирован с развитием этих заболеваний [16, 17]. Частота мутантного аллеля (0,09) была, однако, в этих популяциях ниже, чем у больных ИБС (0,224) в ростовской популяции.

Столь высокая частота мутантного аллеля 174M как в нашем исследовании не встречалась ни в одной из описанных в литературе группе лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Сравнительный анализ полиморфизма T174M в московской популяции и группе больных инфарктом миокарда выявил достоверное снижение числа генотипов TT аллеля T174 и увеличение доли аллеля 174M и гетерозигот TM у больных. У больных с гипертрофией левого желудочка также обнаружено достоверное по сравнению с контрольной группой уменьшение доли генотипа TT и аллеля 174T на фоне существенного повышения частоты аллеля M [18]. Однако не во всех случаях обнаружена связь моле-

Таблица 5

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *M235T* гена *AGT* в группах «ИБС+» и «ИБС-»

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«ИБС+» (n = 150)	«ИБС-» (n = 150)			
Аллель <i>M235</i>	0,820	0,455	20,65	$p < 0,005$	5,50 [2,51 — 12,08]
Аллель <i>235T</i>	0,180	0,545			0,18 [0,08 — 0,40]
Генотип <i>MM</i>	0,500	0,073	53,01	$p < 0,005$	—
Генотип <i>MT</i>	0,280	0,765			0,39 [0,16 — 0,92]
Генотип <i>TT</i>	0,220	0,162			2,59 [1,08 — 6,19]

кулярных вариантов гена *AGT* с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Так, при изучении 149 человек из английских семей, в которых не менее двух членов страдали ЭГ, не выявлена связь полиморфизма T174M (как и M235T) гена *AGT* с этим заболеванием [4]. В то же время при изучении 63 этих же семей с высоким риском ЭГ и 64 здоровых индивидов наблюдали достоверное сцепление и связь ЭГ с другим полиморфным вариантом гена *AGT* (динуклеотидный фланкирующий GT-повтор) [4]. Представляет интерес изучение 10 диаллельных полиморфных вариантов локуса *AGT* (включая T235M) и оценка неравновесия по сцеплению между ними. При генотипировании 477 пробандов, больных гипертензией, и 364 здоровых индивидов из французской популяции и выборки из японской популяции, включающей 92 больных гипертензией и 122 здоровых индивида, несмотря на широкие этнические различия в генных частотах, из всех изученных полиморфизмов связь с ЭГ установлена только для аллеля T235 и гаплотипа, комбинирующего аллели полиморфных вариантов M235T и G-6A [19].

В нашей работе при попарном сравнении частот генотипов значимо различались частоты полиморфизма T174M гена *AGT* у больных ишемической болезнью сердца и в контроле по всем трем возможным генотипам.

При исследовании M235T полиморфизма было обнаружено, что наличие одного или двух T аллелей приводило к существенному повышению уровня *AGT* в плазме, что ведет к увеличению содержания ангиотензина II, чем многие авторы объясняют ассоциацию этого полиморфизма с артериальной гипертензией [20,21,22].

При исследовании популяции европейского происхождения из Новой Зеландии было обнаружено, что вариант 235T является независимым фактором риска развития инфаркта, фактором риска ишемической болезни сердца [12]. В то же время у японцев не было найдено ассоциации данного полиморфизма с ИБС [23]. Также не была найдена корреляция между M235T полиморфизмом и артериальной гипертензией у американских негров [24].

Sethi A. et al. был проведен мета анализ, цель которого заключалась в изучении связи M235T полиморфизма гена *ATG* с концентрацией ангиотензиногена в плазме крови, уровнем систолического и диастолического давления, *AG* и риском развития ИМ и ИБС. В исследование были включены три крупные этнические группы: представители европеоидной, монголоидной и негроидной рас. У представителей европеоидной расы отмечалось повышение концентрации *ATG* в плазме крови на 5% у МТ гетерозигот и на 11% у гомозигот по 235T аллелю по сравнению с носителями ММ генотипа. M235T полиморфизм гена *ATG* ассоциирован с риском развития *AG* у европеоидов и коренных жителей Азии. Однако во всех трех этнических группах данный полиморфизм не был ассоциирован с риском развития ИМ и ИБС [21].

В Copenhagen City Heart Study проводился поиск ассоциаций между полиморфизмом промотора ангиотензиногена -6G/A, а также его сочетанием с T174M и M235T и повышенным уровнем ангиотензиногена в плазме крови, гипертензией, ИБС и ишемической цереброваскулярной болезнью. Было обнаружено, что лица с сочетанием

аллелей -6AA, 174TT и 235TT имеют значительно повышенный уровень АТГ в плазме [20], а также у женщин с данным генотипом повышен риск развития АГ. Но ни одна из этих замен (самостоятельно или в комбинации с другими) не является независимым фактором риска ИБС или ИБМ [20].

Таким образом, обнаружена связь полиморфизма T174M и M235T гена AGT с ИБС. Впервые определены частоты данной мутации у населения Ростова-на-Дону, которые в основном согласуются с частотами в других популяциях мира. Изучаемый генетический маркер представляет интерес как ген, предположительно связанный с широким спектром сердечно-сосудистых заболеваний, и может быть использован в дальнейших популяционных и эпидемиологических исследованиях.

Список литературы

1. R.Pratt, V.Dzau. Genomics and Hypertension. Concepts, Potential and Opportunitis// Hypertension, 1999; 33 [part II]: 238–247.
2. Палова Т.В., Поляков В.П., Дупляков Д.В. и др. Распределение полиморфизмов генов некоторых компонентов системы гемостаза у больных ишемической болезни сердца// Кардиология. — 2009; 4:9-13.
3. Johns M., Paulus-Thomas J. // Anal. Biochem. — 1989. — V.180. — P. 276–278.
4. Caulfield M., Lavender P., Farrall M., Munroe P., Lawson M., Turner P., Clark A. II New Eng. J. Med. — 1994. — V. 330. — P. 1629–1633.
5. Kurland L., Liljedahl U., Karlsson J. et al. Angiotensinogen gene polymorphisms: relationship to blood pressure response to antihypertensive treatment. Results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) trial // Am J Hypertens.—2004. —Vol. 1.—P. 8–13.
6. Liljedahl U., Karlsson J., Melhus H. et al. A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response // Pharmacogenetics.—2003.—Vol. 13, № 1.—P. 7–17.
7. Интернет-ссылки: (1) GeneCards: www.bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.shtml; (2) National centre for biotechnology information (NC BI): www.ncbi.nlm.nih.gov; (3) <http://www.sciam.ru> (2010).
8. Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y., Lifton R.P., Williams CS., Charru A., Hunt S. C, Hopkins P.N., Williams R. R., Lalouel J.-M., Corvol P. //Cell. — 1992. — V.71. —P.7-20
9. Jeunemaitre X., Ledru F., Battaglia S., Guillauneuf M'.T., Courbon D., Dumont C, Darmon O., Guize L., Gueronprez J.-L., Diebold B., Ducimetiere P. // Human.Genet, — 1997. — V. 99. — P. 66–73.
10. Hata A., Namikawa C, Sasaki M., Sato K., Nakamura T., Tamura K., Lalouel J.-M. II J. Clin. Invest. — 1994. — V. 93. — P. 1285-1287.
11. Hegele R., Brunt J., Connelly P. // Circulation. 1994. V. 90. P. 2207-2212.
12. Katsuya T., Koike G., Yee T., Sharpe N., Jackson R., Norton R., Horiuchi M., Pratt R., Dzau V. // Lancet. — 1995. — V. 345. — P. 1600–1603.
13. Hudecova S., Krizanova O., Szomolayova I., Polak E. // Bratisl. lek. Listy. — 1995. — V. 96. — P. 322–325.
14. Walker W., Whelton P., Saito H., Hermann J. // Hypertension. 1997. V. 1. P. 287–291.
15. Ward K., Hata A., Jeunemaitre X., Helin C, Nelson L., Namikawa C, Farrington P., Ogasawara M., Suzumori K., Tomoda S., Berrebi S., Sasaki M., Corvol P., Lifton R., Lalouel J.-M. // Nature Genet. — 1993. — V. 4. — P. 59–61.

16. Yu-Lin Ko, Yu-Shien Ko, Chu-Mei Wang, Po-Hsien Chu, Ming-Sheng Teng, Nye-Jan Cheng, Wei-Jan Chen, TsuShiu Hsu, Chi-Tai Kuo, Chen-Wen Chiang, Ying-Shiung Lee // *Human. Genet.* — 1997. — V. 100. — P. 210–214.
17. Wang QS, Li YG, Chen XD, Yu JF, Wang J, Sun J, Lu SB, Jin L, Wang XF. Angiotensinogen polymorphisms and acquired atrial fibrillation in Chinese// *J Electrocardiol.* 2009 Nov 20. [Epub ahead of print]
18. Чистяков Д., Таракулов Р., Моисеев В., Носиков В. // *Генетика.* — 1999. — Т.35. — С. 1160–1164.
19. Jeunemaitre X., Inoue I., Williams Ch., Charru A., Ticket J., Powers M., Sharma A.P., Gimenez-Roqueplo A.-P., Hata A., Corvol P., Lalouel J.-M. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — V. 60. — P. 1448–1460.
20. Sethi A.A., Nordestgaard B.G., Agerholm-Larsen B., et al. Angiotensinogen polymorphisms and elevated blood pressure in the general population: the Copenhagen City Heart Study. *Hypertension.* — 2001 Mar;37(3):875–81.
21. Sethi A.A., Nordestgaard B.G., Gronholdt M.L., et al. Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease. *Hypertension.* — 2003 Jun;41(6):1202–11. Epub 2003 May 12.
22. Dickson ME, Sigmund CD. Genetic basis of hypertension: revisiting angiotensinogen. *Hypertension.* — 2007;48:14–20.
23. Martinez E., Puras A., Escribano J., et al. Threonines at position 174 and 235 of the angiotensinogen polypeptide chain are related to familial history of hypertension in a Spanish-Mediterranean population // *Br J Biomed Sci.* — 2002;59(2):95–100.
24. Rotimi C., Puras A., Cooper R., et al. Polymorphisms of renin-angiotensin genes among Nigerians, Jamaicans, and African Americans. *Hypertension.* 1996 Mar;27(3 Pt 2):558–63.
25. Zhang X.G., Sun Z.Q., Zheng L.Q., Li J., Liu S.S., Xu C.L., Li J.J., Zhao F.F., Hu D.Y., Sun Y.X. (2007) // *Archives of Medical Research*, 38(4), 432–439.
26. Ariyaratnam R, Casas JP, Whittaker J, Smeeth L, Hingorani AD, Sharma P. 2007. Genetics of ischaemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32,500 individuals. *PLoS Med* 4:e131.
27. Brenner D, Labreuche J, Poirier O, Cambien F, Amarencu P; GENIC Investigators. 2005. Renin-angiotensin-aldosterone system in brain infarction and vascular death. *Ann Neurol* 58:131–138.
28. Lalouschek W, Endler G, Schillinger M, Hsieh K, Lang W, Cheng S, Bauer P, Wagner O, Mannhalter C. 2007. Candidate genetic risk factors of stroke: results of a multilocus genotyping assay. *Clin Chem* 53:600–605.
29. The ALlele FREquency Database
<http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.siteuid=%27SI0002570//Kenneth> K Kidd, Yale University. All rights reserved. The full Copyright Notification is also available 2010.
30. Мешков А.Н., Стамбольский Д.В., Никитин Л.А. и др. Генетические факторы риска развития ишемической болезни сердца у пациентов с семейной гиперхолестеринемией // *Кардиология.* — 2005; 7: 10–14.