

УДК 616.13/.14-004.6+615.225.1

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА II 1-ГО ТИПА У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Михайличенко Е.С.*Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк,
e-mail: klassiki@inbox.ru*

В патогенезе кардиоваскулярной патологии одну из ведущих ролей играет ренин-ангиотензиновая система (РАС). При этом в развитии атеросклероза и ремоделирования сосудов особое значение имеют компоненты тканевых, локальных РАС. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано увеличение плотности рецепторов ангиотензина II 1-го типа (AT1R) в гладкомышечных клетках сосудов (ГМКС) в присутствии С-аллеля полиморфизма гена A1166C гена AT1R. В настоящем исследовании мы изучали плотность рецепторов AT1R, как маркера активности РАС, в ГМКС у пациентов с мультифокальным атеросклерозом и артериальной гипертензией и ее возможную ассоциацию с генотипами полиморфизма A1166C гена AT1R. Оказалось, что только у 50 % пациентов наблюдалась высокая плотность AT1R в ГМКС, при этом в маммарных артериях, наименее подверженных атеросклерозу, плотность AT1R не отличалась от таковой в сосудах, пораженных атеросклерозом, а ассоциация уровня экспрессии гена AT1R с вариантами полиморфизма A(1166)C выявлена не была. Механизмы, определяющие неоднородность активности тканевых компонентов РАС у пациентов с атеросклерозом, требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: ренин-ангиотензиновая система, рецептор ангиотензина II 1-го типа, мультифокальный атеросклероз, артериальная гипертензия, полиморфизм A(1166)C

FEATURES OF THE ANGIOTENSIN II RECEPTOR TYPE 1 EXPRESSION IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND ATHEROSCLEROSIS

Mihajlichenko E.S.*M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk, e-mail: klassiki@inbox.ru*

Local expression of rennin-angiotensin system (RAS) components significantly increases in patients with arterial hypertension and atherosclerosis with or without elevation of RAS activity in the blood. C-allele of the angiotensin II type 1 (AT1R) receptor A(1166)C gene polymorphism has been associated with cardiovascular pathology. It can be explained by increase of AT1R density due to impossibility of posttranscriptional regulation of AT1R expression by microRNA-155 in C-allele presence that was shown *in vitro*. The aim of our study was to investigate the level of AT1R expression in the vessels smooth muscle cells (SMCs) and the influence of A(1166)C genotypes on it *in vivo*. The study results suggest that the tissue RAS activity increases inhomogeneously among patients. AT1R expression did not depend on the vascular bed (affected or intact) and AA/AC genotypes of the A(1166)C polymorphism. Negative AT1R expression in SMCs in some patients puts under the doubt the key role of RAS in pathogenesis of vascular remodeling in some cases. The studies of low susceptibility cause of mammary arteries to atherosclerosis in high RAS activity in the presence of severe lesions of arteries at other sites are required. Further researches of mechanisms that influence the level of AT1R expression are needed.

Keywords: renin-angiotensin system, angiotensin II receptor type 1, multifocal atherosclerosis, arterial hypertension, A(1166)C gene polymorphism

Исследование причин развития артериальной гипертензии (АГ), как одного из важнейших факторов риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, является одним из наиболее приоритетных направлений в медицине. Это обусловлено значительным вкладом АГ в развитие кардиоваскулярной патологии (КВП), инвалидизации и смертности населения от ее осложнений. Известно, что около 40–50 % случаев АГ обусловлены генетически. Однако до настоящего момента не выяснены механизмы реализации данной генетической предрасположенности в связи с тем, что АГ является полигенным заболеванием, наследование которого не подчиняется классическим законам Менделя, а реализация генетической информации во многом зависит от внешних воздей-

ствий, которые легли в концепцию факторов риска.

В изучении природы АГ наибольший интерес представляют гены ренин-ангиотензиновой системы (РАС): ренина, ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), ангиотензиногена, рецептора к ангиотензину II 1-го типа (AT1R). Результаты многочисленных работ в данном направлении показали, что именно повышение активности РАС, как циркуляторной, так и тканевой, во многом определяет развитие АГ, метаболического синдрома, атеросклероза и коронарной болезни сердца [2]. В отличие от циркулирующей РАС, для которой характерна регуляция гомеостатических параметров на уровне организма, локальные РАС проявляют пара- и аутокринные влияния, направленные на поддержание

локального гомеостаза в тканях и органах [1]. Экспрессия молекул РАС установлена в миокарде, сосудистой стенке, жировой ткани, причем в естественных условиях они определяются в следовых количествах, а при КВП наблюдается их выраженная экспрессия. Гиперактивность тканевой РАС обуславливает нарушение структуры и функции органов и тканей, в которых она экспрессируется. Значение локальных РАС в развитии КВП во многом превышает таковое циркулирующей: именно активация тканевых РАС ответственна за ремоделирование сердца и сосудов, развитие сердечной недостаточности (СН), сахарного диабета 2-го типа, ретинопатии и нефропатии.

Основная эффекторная молекула РАС ангиотензин II (АнгII) – реализует свои патологические эффекты посредством взаимодействия со своим рецептором AT1R [6]. Анг II независимо принимает участие в развитии как АГ, так и атеросклероза, причем его роль в развитии атеросклероза представляется настолько значимой, что применение ингибиторов АПФ является стандартом лечения для всех пациентов с атеросклерозом. Поскольку уровень экспрессии AT1R определяет биологическую эффективность Анг II [7] и РАС в целом, изучение плотности AT1R и механизмов ее регуляции представляет особый интерес. Наиболее изучен полиморфный маркер A(1166)C гена AT1R [4]. Большое количество исследований показало ассоциацию данного полиморфизма с развитием АГ, инфаркта миокарда, СН, нефропатии, однако расположение полиморфизма A(1166)C в некодирующей области гена всегда ставило под сомнение его функциональную значимость. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали механизм взаимодействия специфической микро-РНК-155 с данным полиморфизмом, приводящий к посттранскрипционному подавлению экспрессии гена AT1R и, соответственно, изменению плотности рецептора AT1R в тканях [3].

Цель работы: изучить и сравнить уровень экспрессии AT1R в гладкомышечных клетках сосудов (ГМКС) и выявить его возможную ассоциацию с различными генотипами полиморфизма A(1166)C гена AT1R у пациентов с АГ и мультифокальным атеросклерозом.

Материалы и методы исследования

Исследовано 30 резецированных во время плановых оперативных вмешательств участков артерий среднего калибра: 16 артерий пациентов с облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей, во время выполнения реконструктивных операций, составивших 1-ю группу, и 14 интактных маммарных артерий, взятых в ходе операций аортокоронарного

шунтирования у пациентов с многососудистым поражением коронарного русла, составивших 2-ю группу. Значимых различий между группами по полу, возрасту, выраженности АГ, коморбидным заболеваниям (сахарный диабет, ожирение и т.д.) не было.

Полученный материал помещали в нейтральный забуференный 10%-й раствор формалина (pH 7,4) и фиксировали в течение 24 часов. После дегидратации кусочки заливали в парафин по стандартной методике. На ротационном микротоме ShandonFinesse 325 (ThermoScientific, США) изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Степень экспрессии рецепторов 1 типа к ангиотензину II в мышечном слое сосудов исследовали с помощью иммуногистохимической (ИГХ) методики. Для ИГХ-исследования срезы помещали на покрытые адгезивом стекла SuperFrostPlus (Menzel, Германия). Для «демаскирования» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе TargetRetrievalSolution (DAKO, Дания) с использованием микроволновой печи Samsung CE118KFR. После блокирования неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) и эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) наносили первичные антитела. Использовали поликлональные антитела (ПАТ) к Anti-AGTR1 (SIGMA, Sweden). Визуализацию первичных антител проводили с помощью высокочувствительной полимерной системы детекции EnVisionFLEX+ (DAKO). В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (DAKO). Препараты окрашивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую среду Eukit (Kaltex, Италия). Микроскопию препаратов и морфометрические исследования проводили на микроскопе Olympus AX70 Provis (Olympus, Япония) с помощью программы анализа изображения Analysis 3.2 Pro (SoftImaging, Германия) согласно рекомендациям производителя программного обеспечения. В каждом случае ИГХ-исследования экспрессию маркера Anti-AGTR1 в виде цитоплазматического или мембранного окрашивания коричневого цвета изучали в 30 полях зрения при увеличении 200. Интенсивность окрашивания рецепторов к ангиотензину II в мышечном слое артерий оценивали полуколичественно по проценту позитивных клеток согласно 3-уровневой шкале: «-», отрицательный (отсутствие позитивно окрашенных клеток); «+», очаговая или слабая экспрессия (< 50 % позитивных клеток); «++», диффузная или сильная позитивная реакция (> 50 % позитивных клеток) [5].

Для определения аллелей полиморфного участка A1166C гена AT1R использовали геномную ДНК, выделенную из венозной крови, смешанной с антикоагулянтами, путем фенол-хлороформной экстракции. Для идентификации полиморфизма A(1166)C амплифицировали выделенную ДНК методом полимеразной цепной реакции с использованием соответствующих праймеров на амплификаторе PNC-2 («Techne», Великобритания) с последующим рестрикционным анализом. Присутствие после рестрикции фрагмента длиной 166 п.н. означало наличие АА-генотипа, фрагментов 139 и 27 п.н. – СС-генотипа, фрагментов 166, 139 и 27 п.н. – АС-генотипа. Статистический анализ проводился с использованием статистического пакета SPSS с использованием критерия хи-квадрат. Статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В обеих группах мы получили схожие результаты. В 1-й группе в 8 артериях (47,05%) наблюдалась слабая или очаговая (+) экспрессия AT1R (рис. 2), в других 8 артериях экспрессия AT1R (47,05%) была выраженной (++) (рис. 4), в 1 случае (5,9%) экспрессия AT1R отсутствовала (-) (рис. 1). Во 2-й группе слабая или очаговая (+) экспрессия AT1R наблюдалась в 7 случаях (50%) (рис. 5, 3), сильная (++) экспрессия AT1R – в 7 других случаях (50%). В результате генотипирования и в 1-й, и во 2-й группах не было выявлено пациентов с генотипом CC полиморфизма A1166C гена AT1R, а генотипы AA и AC встречались с одинаковой частотой. И в 1-й, и во 2-й группе корреляция плотности рецепторов AT1R и вариантов полиморфизма

гена AT1R выявлена не была (табл. 1). Таким образом, выраженная тканевая экспрессия наблюдалась примерно у 50% пациентов с атеросклеротическим поражением артерий, причем она не зависела от исследуемого сосудистого русла (пораженного атеросклерозом или непораженного) и варианта полиморфизма гена AT1R.

Распределение генотипов полиморфизма AT1R/A1166C: AA у 50% (n = 8) и AC у 50% (n = 8) пациентов 1-й группы, AA у 64,3% (n = 9) и AC у 35,7% (n = 5) пациентов во 2-й группе. Генотип CC не был выявлен ни в одном случае. Между уровнями экспрессии AT1R и распределением генотипов AT1R/A1166C в 1-й и во 2-й группах не было найдено достоверных различий ($p > 0,05$). В обеих группах уровни экспрессии AT1R не были ассоциированы ни с генотипом AA, ни с генотипом AC AT1R/A1166C (табл. 2).

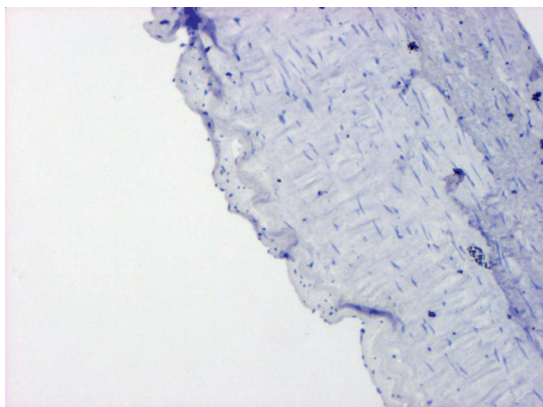


Рис. 1. Отсутствие экспрессии AT1R в мышечном слое пораженного атеросклерозом артериального сосуда. Система визуализации DAKO Envision Flex+ x75

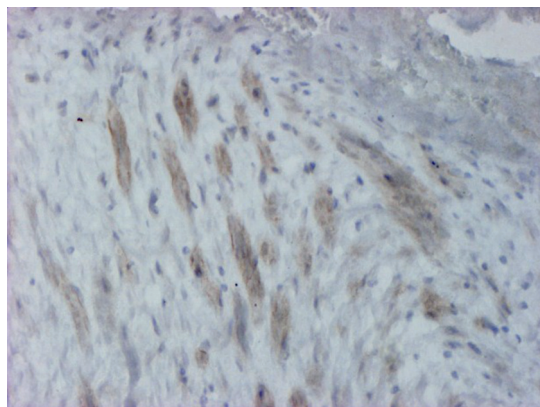


Рис. 2. Очаговая экспрессия AT1R в пораженной атеросклерозом артерии. Система визуализации DAKO Envision Flex+ x150

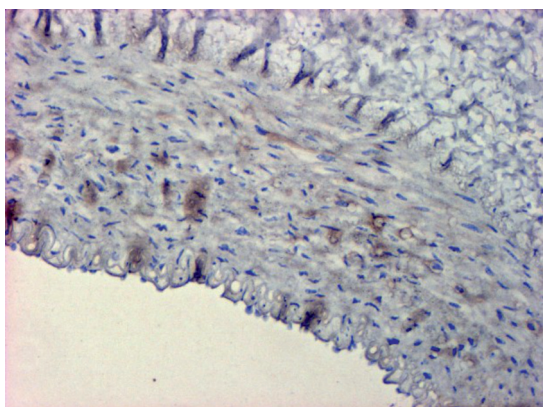


Рис. 3. Очаговая экспрессия AT1R в маммарной артерии. ИГХИ с поликлональными антителами к Anti-AGTRI. Система визуализации DAKO Envision Flex+ x75

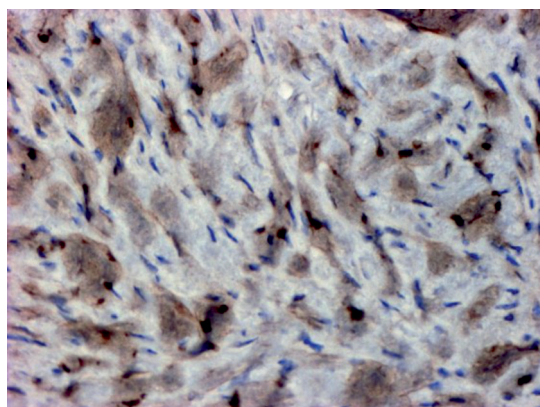


Рис. 4. Выраженная экспрессия AT1R в пораженной атеросклерозом артерии. ИГХИ с поликлональными антителами к Anti-AGTRI. Система визуализации DAKO Envision Flex+ x75

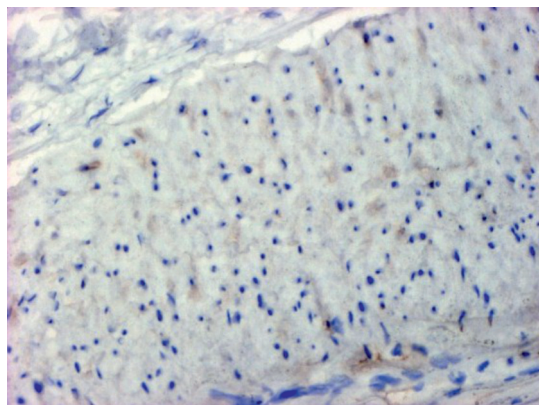


Рис. 5. Слабая экспрессия AT1R в маммарной артерии. Система визуализации DAKO Envision Flex+ x75

Таблица 1

Отсутствие различия ($p = 0,626$ по критерию хи-квадрат) распределения значений уровня экспрессии AT1R в 1-й и во 2-й группах

Уровень экспрессии AT1R	Частота встречаемости, абс. ($\% \pm m\%$)		Уровень значимости различия, p
	1-я группа ($n = 16$)	2-я группа ($n = 14$)	
(-)	1 ($6,3 \pm 6,1$)	—	0,626
(+)	8 ($50,0 \pm 12,5$)	7 ($50,0 \pm 13,4$)	
(++)	7 ($43,8 \pm 12,4$)	7 ($50,0 \pm 13,4$)	

Таблица 2

Отсутствие связи ($p = 0,502$ по критерию хи-квадрат) распределения значений уровня экспрессии гена AT1R с генотипом AA и AC полиморфизма A(1166)C

Показатель		Частота встречаемости, абс. ($\% \pm m\%$)		Уровень значимости различия, p
		Генотип AA ($n = 17$)	Генотип AC ($n = 13$)	
Уровень экспрессии AT1R	(-)	—	1 ($7,7 \pm 7,4$)	0,502
	(+)	9 ($52,9 \pm 12,1$)	6 ($46,2 \pm 13,8$)	
	(++)	8 ($47,1 \pm 12,1$)	6 ($46,2 \pm 13,8$)	

Выводы

Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что активность РАС в ГМКС неоднородна среди пациентов с АГ и мультифокальным атеросклерозом, не зависит от генотипа полиморфизма A(1166)C гена AT1R. Уровни экспрессии AT1R в интактных артериях не отличаются от таковых в артериях, пораженных атеросклерозом ($p > 0,05$). У ряда пациентов с выраженным атеросклеротическим поражением артерий отсутствует экспрессия AT1R в ГМКС, что ставит под сомнение ведущую роль именно РАС в патогенезе ремоделирования сосудов в отдельных случаях.

Механизмы, влияющие на уровень экспрессии тканевых компонентов РАС, требуют дальнейшего изучения. Необходи-

мо проведение исследований, выясняющих причину низкой подверженности маммарных артерий атеросклерозу в условиях высокой активности в них РАС при одновременном наличии выраженного поражения артерий других локализаций (например, выраженного коронарного атеросклероза). Возможно, исследование эффективности терапии блокаторами РАС (ингибиторами АПФ и сартанами) у пациентов с разной степенью экспрессии AT1R в тканях позволит разработать методы прогнозирования эффективности терапии и индивидуализировать схему лечения.

Список литературы/References

1. Crowley S.D., Coffman T.M. Recent advances involving the renin-angiotensin system // Exp. Cell. Res. – 2012. – Vol. 318, № 9. – P. 1049–1056.

2. De Giusti V.C., Ciancio M.C., Orlowski A., Aiello E.A. Modulation of the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter by the renin angiotensin aldosterone system: pathophysiological consequences // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 411.

3. Martin M.M., Buckenberger J.A., Jiang J. et al. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2007. – Vol. 282, № 33. – P. 24262–24269.

4. Palatini P., Ceolotto G., Dorigatti F. et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts development of hypertension and metabolic syndrome // *American Journal of Hypertension.* – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 208–214.

5. Suganuma T., Ino K., Shibata K., et al. Functional expression of the angiotensin II type1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 2686–2694.

6. Thomas W.G., Mendelsohn F.A.O. Angiotensin receptors: form and function and distribution // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* – 2003. – Vol. 35, № 6. – P. 774–779.

7. Wynne B.M., Chiao C.W., R. Webb C. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1 // *J. Am. Soc. Hypertens.* – 2009. – Vol. 3, № 2. – P. 84–95.

Рецензенты:

Крутиков Е.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней Медицинской академии им. С.И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь;

Кубышкин А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь.