

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИН-АЛЬДОСТЕРОНОВОЙ СИСТЕМЫ И СВЯЗЬ С ВАЗОПРЕССОРАМИ ПРИ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ДАГЕСТАНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Саидов М. З., Маммаев С. Н., Абдуллаев А. А., Арапханова Т. Б., Израйлова Г. Р.

Цель. Изучение частоты встречаемости генотипов полиморфизмов генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и β 2-адренорецепторов при эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) I, II и III степени в дагестанской популяции и оценка связи экспрессии генотипов изученных полиморфизмов с уровнями вазопрессоров в сыворотке крови.

Материал и методы. В работу были включены 98 пациентов с диагнозом "эссенциальная артериальная гипертензия I, II и III степени". Изучались генотипы полиморфизмов Thr174Met и Met235Thr гена *AGT*, полиморфизм A1166C гена *AGTR1* и полиморфизмы Arg16Gly и Gln27Glu гена *ADRB2*. Тестирование обозначенных полиморфизмов проводили с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции, позволяющей дать качественную оценку отсутствия или наличия мутантного аллеля в гетеро- или гомозиготной форме. Уровень ангиотензина (АТ) II, эндотелина (ЭТ) 1-21 и альдостерона (АС) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуно-флуоресцентного анализа. Уровень ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) определяли энзиматическим методом. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica (версия 6.0), а также "Biostat 4.03".

Результаты. ЭАГ I, II и III степени в дагестанской популяции ассоциирована с достоверным увеличением частот встречаемости (критерий χ^2) генотипов AA и CC полиморфизма A1166C гена *AGTR1*, генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*, генотипа Gln/Gln полиморфизма Gln27Glu гена *ADRB2* и генотипа MM полиморфизма Thr174Met гена *AGT*. У пациентов-носителей указанных генотипов относительный риск возникновения ЭАГ был достоверно выше по сравнению с контрольной группой. На этом фоне уровень вазопрессоров АТ II, ЭТ 1-21, АС и АПФ в сыворотке крови при ЭАГ I, II и III степени в дагестанской популяции изменялся неоднозначно. Показатели сывороточного уровня ЭТ 1-21 и АПФ были достоверно выше или имели тенденцию к повышению, в то время как уровни АТ II и АС снижались, в том и в другом случаях по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Наибольшее количество достоверных прямых корреляционных связей определялось между полиморфизмами генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* и уровнем сывороточного ЭТ1-21.

Заключение. Достоверное увеличение частот встречаемости изученных нами генотипов полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* при ЭАГ I, II III степени отражает определённую специфику мутационного процесса, затраги-

вающего указанные гены в дагестанской популяции. Эти процессы ассоциированы с достоверными изменениями уровней вазопрессоров в сыворотке крови, что является свидетельством патогенетической связи указанных полиморфизмов и прессорного контура при ЭАГ в дагестанской популяции.

Российский кардиологический журнал 2017, 4 (144): 61–69
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-4-61-69>

Ключевые слова: эссенциальная артериальная гипертензия, полиморфизмы генов, генотипы, вазопрессоры, дагестанская популяция.

ФГБОУ ВО Дагестанский государственный медицинский университет, НИИ экологической медицины, Махачкала, Россия.

Саидов М.З.* — д.м.н. профессор, зав. кафедрой патологической физиологии, зав. лабораторией медицинской генетики, Маммаев С.Н. — д.м.н. профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии, Абдуллаев А.А. — д.м.н. профессор, зав. кафедрой поликлинической терапии, кардиологии и общей врачебной практики ПК и ППС, Арапханова Т.Б. — аспирант кафедры поликлинической терапии, кардиологии и общей врачебной практики ПК и ППС, Израйлова Г.Р. — н.с. лаборатории медицинской генетики.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
 marat2002@pochta.ru

АД — артериальное давление, АПФ — ангиотензинпревращающий фермент, АС — альдостерон, АТ II — ангиотензин II, ИФА — иммуно-флуоресцентный анализ, РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система, ЭАГ — эссенциальная артериальная гипертензия, ЭТ 1-21 — эндотелин 1-21, *ADRB2* — ген β 2-адренорецептора, *AGT* — ген ангиотензиногена, *AGTR1* — ген рецептора 1 типа ангиотензина II.

Рукопись получена 27.12.2016

Рецензия получена 18.01.2017

Принята к публикации 25.01.2017

RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM GENES POLYMORPHISM AND RELATION WITH VASOPRESSORS IN ESSENTIAL HYPERTENSION AMONG DAGESTAN INHABITANTS

Saidov M. Z., Mammaev S. N., Abdullaev A. A., Arapkhanova T. B., Izraylova G. R.

Aim. Investigation on the prevalence of genotypes polymorphisms of renin-angiotensin-aldosterone system and beta2-adrenoreceptors in essential hypertension (EH) of I, II, III grades in Dagestan population, and evaluation of the relation of genotype expression with vasopressors levels in blood.

Material and methods. Totally, 98 patients included, with the diagnosis "essential hypertension of I, II, III grades". The genotypes were studied, of polymorphisms Thr174Met and Met235Thr gene *AGT*, polymorphism A1166C gene *AGTR1* and polymorphisms Arg16Gly and Gln27Glu gene *ADRB2*. Test of the mentioned polymorphisms was done with the allele-specific polymerase chain reaction, making to assess the absence or presence of a mutation allele in hetero- and homozygous form. The level of angiotensin (AT) II, endothelin (ET) 1-21 and aldosterone (AS) in serum was measured with the hard-phase immune-enzyme assay. The level of angiotensin-converting enzyme (ACE) was measured with enzymatic method. Statistics was done with the software Statistica v. 6.0 and "Biostat 4.03".

Results. EH of I, II, III grades in Dagestan population was associated with significant increase of the prevalences (criteria χ^2) of genotypes AA and CC of

polymorphism A1166C gene *AGTR1*, genotype Arg/Gly of polymorphism Arg16Gly gene *ADRB2*, genotype Gln/Gln of polymorphism Gln27Glu gene *ADRB2* and genotype MM of polymorphism Thr174Met gene *AGT*. In the carriers of the genotypes mentioned, relative risk of EH onset was significantly higher than in controls. The level of vasopressors ATII, ET 1-21, AS and ACE showed a controversial dynamics in Dagestan population. Serum levels of ET 1-21 and ACE were significantly higher or had tendency to increase, but AT II and AS decreased in both cases, comparing to the controls ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Most number of significant direct correlations was found in polymorphisms of the genes *AGT*, *AGTR1* and *ADRB2* and level of serum ET 1-21.

Conclusion. Significant increase of the prevalence of the studied genotypes polymorphisms of genes *AGT*, *AGTR1* and *ADRB2* in EH of I, II III grades represents a definite specifics of mutational process involving the mentioned genes in Dagestan population. These processes are associated with significant changes in vasopressors levels in serum, that is a witness for pathogenetic relationship of the mentioned polymorphisms and pressoric contour of EH in Dagestan population.

Key words: essential arterial hypertension, genes polymorphisms, genotypes, vasopressors, Dagestan population.

Клинико-патогенетическая гетерогенность эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ), недостаточная изученность поломок механизмов регуляции артериального давления (АД) и как следствие продолжающееся усовершенствование схем комплексной терапии ЭАГ обуславливают неослабевающий поток работ по дальнейшему изучению патогенетических механизмов стойкого повышения АД. Уникальной особенностью ЭАГ является доминирование нарушений функциональных механизмов регуляции АД (нервных и гуморальных), охватывающих основные гомеостатические системы организма, формирование на этой основе порочных кругов и т.н. сердечно-сосудистого континуума [1]. Функциональные регуляторные системы АД генетически детерминированы. С учётом этого, сочетание генетической предрасположенности с условиями жизни и внешней среды позволило отнести ЭАГ к категории мультифакторной патологии.

Стратификация факторов риска ЭАГ вывела в число наиболее значимых мутационные изменения в генах, ответственных на баланс прессорного (тканевая и почечная ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), вазоконстрикторы — эндотелины 1,2,3, вазопрессин, альдостерон, ПГ- F_2 , лейкотриены С и D и др.) и депрессорного (NO, Na-уретические пептиды, калликреин-кининовая система, ПГ- E_2 , простаглицлин, аденозин и др.) контуров длительного действия [2]. Реализация патофизиологических эффектов указанных “медиаторов” артериальной гипертензии возможна только в случаях экспрессии соответствующих рецепторов на клетках и органах-мишенях. Кроме этого, непептидные составляющие прессорного и депрессорного контуров реализуют свои физиологические и патофизиологические эффекты исключительно в случаях активности соответствующих ферментов. Мутационные процессы, затрагивающие синтез, продукцию и рецепцию указанных медиаторов ЭАГ, являются важной составляющей генетики этого заболевания. Идентификация и картирование конкретных полиморфизмов, ассоциированных с ЭАГ, их участие в патогенетических схемах нарушений регуляции уровня АД, дали основание определить эти гены как гены-кандидаты ЭАГ. В настоящее время их насчитывается более 80 [3].

Наиболее актуальными полиморфизмами при ЭАГ считаются полиморфизмы гена ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), полиморфизмы гена ангиотензиногена (*AGT*), полиморфизмы гена рецепторов ангиотензина II (*AGTR*), полиморфизмы

гена $\beta 2$ -адренорецептора (*ADRB2*), полиморфизмы гена NO-синтазы (*NOS*) [4]. Различные полиморфные состояния указанных генов в различной степени ассоциированы с ЭАГ и эти ассоциации носят во многом автономный характер.

Однако, результаты многочисленных исследований указанных полиморфизмов ЭАГ неоднозначны, а зачастую и противоречивы. В частности, метаанализ ассоциаций полиморфизмов промоторных регионов гена *AGT* — A-6G и A-20C при ЭАГ в китайской популяции (24 исследования, включающих 5932 пациентов с ЭАГ и 5231 случай в контроле) показал достоверное уменьшение риска АГ у носителей генотипов AA и AG, а генотип A-20C достоверно ассоциирован со снижением риска повышения АД [5]. Данные другого масштабного метаанализа (2188 случаев ЭАГ, контроль — 2459 здоровых доноров) свидетельствуют о том, что ассоциация генотипов TT, TM и MM полиморфизма T174M гена *AGT* с ЭАГ не носит статистически достоверный характер в азиатской и европейской популяциях [6].

Генотип CC полиморфизма A1166C рецептора I типа ангиотензина II (*AGTRI*) в 2,4 раза повышал риск АГ, по сравнению с носителями генотипов AA и AC в популяции населения северной Индии [7]. В то же время, изучение экспрессии гена *ADRB2* по уровню соответствующей мРНК у больных ЭАГ показало снижение этого генетического показателя по сравнению с контролем. Однако это снижение статистически было незначимым в отношении расовой, гендерной принадлежности, а также по клиническому эффекту применяемой гипотензивной терапии [8]. Достоверная связь указанных выше генетических полиморфизмов РААС у детей с АГ показана в работе [9].

Интересные результаты были получены в исследованиях, согласно которым у русских мужчин с ЭАГ, проживающих в центральном регионе России, чаще встречается полиморфизм DD гена *ACE*, в то время как достоверной взаимосвязи между присутствием в изученной когорте больных полиморфизмов Thr174Met и Met235Thr гена *AGT* с риском развития АГ получено не было [10].

В то же время, частота встречаемости полиморфизма Thr174Met гена *AGT* у больных ЭАГ в русской и татарской популяции в несколько раз превышала аналогичный показатель в контрольной группе [11]. Диаметрально противоположные результаты были получены в отношении полиморфизмов генов *ACE* и *AGT* у якутов [12]. В польской популяции показано

достоверное увеличение частоты встречаемости генотипа ТТ полиморфизма М235Т гена *AGT* у больных ЭАГ по сравнению с контрольной группой [13].

Необходимо отметить, что наряду с оценкой патогенетической значимости экспрессии указанных полиморфизмов, эти и другие популяционно-генетические исследования ЭАГ подчёркивают необходимость учёта этнической, гендерной принадлежности, а также географического района проживания исследуемых пациентов.

Таким образом, совершенно очевидна важная роль полиморфизмов генов *PAAC* и *ADRB2* при ЭАГ. Не менее очевидна крайняя неоднозначность и разнообразие патофизиологических следствий экспрессии конкретных полиморфизмов указанных генов, недостаточная изученность этого аспекта ЭАГ и обоснованность рекомендаций по учёту генетического паспорта пациентов при назначении гипотензивной терапии.

Целью работы явилось изучение частоты встречаемости генотипов полиморфизмов генов *PAAC* и *ADRB2* при ЭАГ I, II и III степени в дагестанской популяции и оценка связи экспрессии генотипов изученных полиморфизмов с уровнями вазопрессоров в сыворотке крови.

Материал и методы

В работу были включены 98 больных ЭАГ (52 женщины и 46 мужчин), находившихся на обследовании и лечении в отделении артериальных гипертензий Республиканской клинической больницы г. Махачкалы, кардиологическом отделении Республиканской больницы № 2 г. Махачкалы, а также больных, находившиеся на амбулаторном учёте в Муниципальной поликлинике № 4 г. Махачкалы. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000г. У каждого участника было получено письменное информированное согласие на проведение обследования. Протоколы обследования больных были одобрены Этическим комитетом Дагестанского государственного медицинского университета.

Критерии включения в исследование: добровольное информированное согласие больного, больные с клиническим диагнозом ЭАГ I, II или III степени.

Критерии исключения из исследования: больные с вторичными (симптоматическими) формами артериальной гипертензии, наличие инфаркта миокарда или инсульта, больные с сопутствующими заболеваниями других органов и систем, патогенетически не связанных с ЭАГ, но могущих повлиять на результаты исследования, а также участие пациентов в любом другом исследовании.

Диагноз и степень АГ устанавливали на основании рекомендаций Всероссийского научного обще-

ства кардиологов (ВНОК) по диагностике и лечению артериальной гипертензии [14].

Контрольную группу составили 48 здоровых доноров с нормальным уровнем АД в возрасте 19-35 лет (27 мужчин и 21 женщина). Все добровольцы, давшие информированное согласие на проведение исследования, в течение последнего месяца перед началом исследования не переносили острых заболеваний, прежде всего, инфекционного характера, и не имели хронической патологии воспалительного генеза.

Настоящая работа относится к категории контролируемых (исследования типа “случай-контроль”), прогностических и проспективных исследований.

Для анализа использовали геномную ДНК, выделенную из цельной крови пациентов и здоровых добровольцев с помощью набора “ДНК-экспресс кровь” (“Литех”, Россия) согласно инструкции производителя. Определение аллелей изучаемых полиморфизмов проводили методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию и плавление продуктов ПЦР проводили на амплификаторе с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени ABI 7900 HT (“Applied Biosystems”, США). Аллель-специфическую полимеразную цепную реакцию проводили согласно разработанной производителем (“Литех”) методике для генетических полиморфизмов *AGT* (Thr174Met, C>T, rs4762), *AGT* (Met235Thr, T>C, rs699), *AGTR1* (A1166C, rs5186), *ADRB2* (Arg16Gly, rs1042713), *ADRB2* (Gln27Glu, rs1042714). Генотипирование полиморфизмов Thr174Met и Met235Thr гена *AGT*, полиморфизм A1166C гена *AGTR1* проводили с использованием наборов для генотипирования “SNP-ЭКСПРЕСС-РВ-Кардиогенетика”. Согласно инструкции к этому набору, с образцом выделенной ДНК проводили одновременно две реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров на параллельное выявление аллелей дикого и мутантного типа (норма и патология, соответственно). Результаты анализа кривых накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов позволяют дать качественную оценку отсутствия или наличия мутантного аллеля в гетеро- или гомозиготной форме. Генотипирование полиморфизмов гена *ADRB2* (Arg16Gly и Gln27Glu) проводили на наборах “SNP-ЭКСПРЕСС-SHOT-РВ-Кардиогенетика”, Литех, согласно инструкции производителя.

Уровень сывороточного ангиотензина II (АП) определяли методом конкурентного твёрдофазного иммуно-флуоресцентного анализа (ИФА), с применением поликлональных АТ к ангиотензину II. Работу проводили на наборах ИФА компании “RayBiotech”, ISO 13485 Certified, США. Результат выражался в пг/мл.

Уровень эндотелина 1-21 (ЭТ1-21) в сыворотке крови определяли методом твёрдофазного ИФА

Таблица 1

**Генотипы полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2*,
имеющих статистически достоверное увеличение частоты встречаемости, у больных ЭАГ I, II и III степени**

	Генотипы полиморфизма Thr174Met гена <i>AGT</i>	Генотипы полиморфизма Met235Thr гена <i>AGT</i>	Генотипы полиморфизма A1166C гена <i>AGTR1</i>	Генотипы полиморфизма Gln27Glu гена <i>ADRB2</i>	Генотипы полиморфизма Arg16Gly гена <i>ADRB2</i>
I степень ЭАГ		-	AA $\chi^2=3,5$, $p=0,05$ ОР (95% ДИ) 3,03 (1,13-8,1)	-	Arg/Gly $\chi^2=3,6$, $p=0,05$, ОР (95% ДИ) 2,75 (1,03-7,3)
II степень ЭАГ	MM $\chi^2=0,23$, $p=0,6$ ОР (95% ДИ) 1,4 (1,032-1,9)	-	CC $\chi^2=0,8$, $p=0,37$ ОР (95% ДИ) 2,4 (1,3-4,4)	-	Arg/Gly $\chi^2=4,68$, $p=0,03$ ОР (95% ДИ) 3,27 (1,2-8,6)
III степень ЭАГ	-	-	-	Gln/Gln $\chi^2=5,6$, $p=0,018$, ОР (95% ДИ) 5 (2,4-10,5)	Arg/Gly $\chi^2=3,9$, $p=0,048$, ОР (95% ДИ) 2,8 (1,06-7,4)

на наборах компании “Biomedica”, CAT. NO BI-20052. Результат выражался в фмоль/мл.

Уровень сыровоточного альдостерона (АС) определяли методом конкурентного твёрдофазного ИФА на наборах компании “Diagnostics Biochem Canada Inc.”, CAT. NO 749-8600. Результат выражался в пг/мл.

Результаты ИФА-анализов определяли на многоканальном спектрофотометре компании “Human”, Германия, Humareader Single в двухволновом режиме, основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр — 630 нм.

Активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) определяли энзиматическим методом на наборах “ACE kinetic Angiotensin Converting Enzyme” BUHLMANN, кат. № КК-АСК. Результаты анализа замеряли на биохимическом анализаторе ChemWell Awareness Technology Inc. USA, при длине волны 340 нм. Результат выражался в ед. ACE.

Статистическая обработка полученных результатов. Обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica (версия 6,0), а также “Biostat 4.03”. База данных создавалась с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2007. Непрерывные переменные в исследуемых выборках представлены в виде медианы (Me) с 25;75-процентами. Для определения достоверности различий между двумя сравниваемыми выборками использовался критерий Манна-Уитни. Достоверность различий частот генотипов и аллелей полиморфизмов исследованных генов в основной и контрольной группах проводили с помощью критерия χ^2 . В случаях достоверности различий частот полиморфизмов в основной и контрольной группах рассчитывался относительный риск (ОР) развития ЭАГ у пациентов основной группы с доверительными интервалами (ДИ). Показатель ОР считался достоверным, если ДИ не включал единицу. Корреляционную взаимосвязь между изученными параметрами определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции

Спирмена (r). Сила связи определялась величиной r: слабая $r < 0,3$, средней силы r от 0,3 до 0,7 и сильная — $r > 0,7$. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Всего обследовано 98 больных ЭАГ, из них 52 женщины и 46 мужчин, средний возраст обследованных $46,8 \pm 7,6$ лет. I степень ЭАГ диагностирована у 26 (27%) больных, II степень ЭАГ диагностирована у 33 (34%) больных и III степень ЭАГ диагностирована у 37 (38%) больных. Из факторов риска в обследованной когорте больных присутствовали: ожирение у 32 больных (32%), гиперхолестеринемия за счёт липопротеидов низкой плотности у 52 больных (53%), курение у 24 больных (25%), сахарный диабет 2 типа у 12 больных (12%), хронический стресс у 65 больных (66%), малоподвижный образ жизни у 75 больных (76%).

В семейном анамнезе ЭАГ встречалась у родственников I степени родства (родители, родные братья, сёстры) в 27% случаев (26 пациентов) и у родственников II степени родства (бабушки и дедушки) в 44% случаев (42 пациента).

В обследованной когорте больных ЭАГ методом ПЦР в реальном времени были изучены следующие генотипы и аллели полиморфизмов генов-кандидатов ЭАГ:

— полиморфизм Thr174Met (мутация в 174 кодоне, приводящая к замене аминокислоты треонина на метионин) гена *AGT*;

— полиморфизм Met235Thr (мутация в 235 кодоне, приводящая к замене аминокислоты метионина на треонин) гена *AGT*;

— полиморфизм A1166C (замена нуклеотида аденина на цитозин в 1166 позиции) гена рецептора 1 типа *AGTR1*;

— полиморфизм Gln27Glu (замена аминокислоты глутамина на глутаминовую кислоту в 27 позиции) гена *ADRB2*;

Таблица 2

Уровни эндотелина 1-21, ангиотензина II, альдостерона и ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови у больных ЭАГ I степени и генотипы полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2*, имеющих статистически достоверное увеличение частоты встречаемости

	ЭТ 1-21, фмоль/мл Me (25;75)	АТ II, пг/мл Me (25;75)	АС, пг/мл Me (25;75)	АПФ, ед. ACE Me (25;75)
Генотипы полиморфизма A1166C гена <i>AGTR1</i>				
AA, n=14	0,25* [0,12;0,55]	4,5** [3,5;7,3]	189,9* [157;225]	10,6 [9;18]
AA, n=10, контрольная группа	0,14 [0,08;0,2]	10,4 [5,7;11,8]	339 [296;366]	7,5 [4;10]
Генотипы полиморфизма Arg16Gly гена <i>ADRB2</i>				
Arg/Gly, n=15	0,22 [0,11;0,44]	5,3* [4,3;7,67]	176,5* [148,9;218]	12,8 [8,4;17]
Arg/Gly, n=14, контрольная группа	0,19 [0,14;0,4]	11 [5,9;26]	341 [318;354]	9 [4,4;10]

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой (критерий Манна-Уитни).

Таблица 3

Уровни эндотелина 1-21, ангиотензина II, альдостерона и ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови у больных ЭАГ II степени и генотипы полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2*, имеющих статистически достоверное увеличение частоты встречаемости

	ЭТ 1-21, фмоль/мл Me (25;75)	АТ II, пг/мл Me (25;75)	АС, пг/мл Me (25;75)	АПФ, ед. ACE Me (25;75)
Генотипы полиморфизма Thr174Met гена <i>AGT</i>				
MM, n=7	0,56 [0,32;0,75]	7,33** [5,5;9,3]	122,6 [112;138]	28,9 [24,6;31,4]
MM, n=6, контрольная группа	0,58 [0,38;0,8]	41,2 [34,3;49,7]	191 [150;228]	22,3 [14,6;26,4]
Генотипы полиморфизма A1166C гена <i>AGTR1</i>				
CC, n=6	0,37 [0,3;0,4]	6,5 [6;7]	170* [133;207]	18,5 [14,3;23,7]
CC, n=5, контрольная группа	0,23 [0,2;0,33]	8,2 [7,3;12,6]	323 [258;340]	17,8 [14;21,7]
Генотипы полиморфизма Arg16Gly гена <i>ADRB2</i>				
Arg/Gly, n=18	0,63** [0,3;0,95]	8,5 [5,3;13,8]	183,5** [157,6;222]	29 [16,4;34]
Arg/Gly, n=14, контрольная группа	0,19 [0,14;0,4]	11 [5,9;26]	341 [318;354]	21,7 [17,4;33]

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой (критерий Манна-Уитни).

— полиморфизм Arg16Gly (замена аминокислоты аргинина на глицин в 16 позиции) гена *ADRB2*.

Все исследованные полиморфизмы относились к категории единичных нуклеотидных замен (SNP) и определялись в ПЦР в реальном времени либо в гомозиготном, либо в гетерозиготном состояниях. В работе представлены результаты и анализ только генотипов исследованных полиморфизмов.

В таблице 1 представлены варианты генотипов полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* у больных ЭАГ I, II и III степени, которые имели статистически достоверное увеличение частот встречаемости по сравнению с контрольной группой. Видно, что при ЭАГ I степени — это генотип AA полиморфизма A1166C гена *AGTR1* ($\chi^2=3,5$, $p=0,05$), а также генотип Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* ($\chi^2=3,6$, $p=0,05$). У носителей первого генотипа достоверный риск появления ЭАГ в три раза превышал аналогичный показатель в контрольной группе, а у носителей генотипа Arg/Gly — более чем в два раза. Частота встречаемости остальных полиморфизмов не достигала статистически значимых величин.

Интересная картина открывается при II степени ЭАГ. Как видно из таблицы 1, частота генотипа MM полиморфизма Thr174Met гена *AGT* и генотипа CC полиморфизма A1166C гена *AGTR1* статистически не отличается от частоты аналогичных генотипов в контрольной группе. Однако значения ОР появления ЭАГ у носителей указанных генотипов хотя и невысокие (1,4 и 2,4, соответственно), но статистически достоверные. В то же время, у носителей генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* частота встречаемости этого генотипа достоверно превышала этот показатель в контрольной группе ($\chi^2=4,68$, $p=0,03$) и у носителей этого генотипа вероятность появления ЭАГ более чем в три раза превышает вероятность этого заболевания в контрольной группе, ОР=3,27 (1,2-8,6).

III степень ЭАГ ассоциирована с достоверным увеличением частот генотипа Gln/Gln полиморфизма Gln27Glu гена *ADRB2* ($\chi^2=5,6$, $p=0,018$) и генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly того же гена ($\chi^2=3,9$, $p=0,048$). ОР появления ЭАГ у носителей этих генотипов по сравнению с контрольной группой достигал

Таблица 4

Уровни эндотелина 1-21, ангиотензина II, альдостерона и ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови у больных ЭАГ III степени и генотипы полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2*, имеющих статистически достоверное увеличение частоты встречаемости

	ЭТ 1-21, фмоль/мл Me (25;75)	АТ II, пг/мл Me (25;75)	АС, пг/мл Me (25;75)	АПФ, ед. АСЕ Me (25;75)
Генотипы полиморфизма Gln27Glu гена <i>ADRB2</i>				
Gln/Gln, n=7	0,16 [0,1;0,7]	7,3* [4,8;9]	152** [110;190]	21 [17,4;30,3]
Gln/Gln, n=6, контрольная группа	0,17 [0,15;0,18]	12,8 [9,8;15,8]	360 [330;390]	18,7 [16;23]
Генотипы полиморфизма Arg16Gly гена <i>ADRB2</i>				
Arg/Gly, n=6	0,21 [0,14;0,4]	13,4 [9,6;22]	230 [185,5;283]	22,6* [18;22,8]
Arg/Gly, n=14, контрольная группа	0,19 [0,14;0,4]	11 [5,9;26]	341 [318;354]	15 [11,4;18]

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, по сравнению с контрольной группой (критерий Манна-Уитни).

Таблица 5

Достоверные корреляционные связи между уровнями в сыворотке крови эндотелина 1-21, ангиотензина II, альдостерона и ангиотензинпревращающего фермента и генотипами полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* при ЭАГ I, II и III степени

	ЭТ 1-21	АТ II	АС	АПФ
I степень ЭАГ				
<i>AGTR1</i> (A1166C)	-	-	-	-
<i>ADRB2</i> (Arg16Gly)	$r=0,445$ $p=0,05$	-	-	-
II степень ЭАГ				
<i>AGT</i> (Thr174Met)	$r=0,556$ $p=0,027$	-	-	$r=0,545$ $p=0,05$
<i>AGTR1</i> (A1166C)	-	-	-	-
<i>ADRB2</i> (Arg16Gly)	-	-	$r=0,626$ $p=0,002$	-
III степень ЭАГ				
<i>ADRB2</i> (Gln27Glu)	$r=0,759$ $p=0,001$	$r=0,570$ $p=0,008$	-	-
<i>ADRB2</i> (Arg16Gly)	$r=0,518$ $p=0,049$	$r=0,509$ $p=0,019$	$r=0,509$ $p=0,019$	-

Примечание: r — коэффициент ранговой корреляции Спирмена; в таблице представлены только статистически достоверные значения r ($p < 0,05$).

статистически значимых значений — $OP=5$ (2,4-10,5) в первом случае и $OP=2,8$ (1,06-7,4) во втором.

Изменения показателей концентраций вазопрессоров в сыворотке крови у больных ЭАГ I степени, носителей указанных выше генотипов полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2*, представлены в таблице 2. В этой же таблице отражены изученные показатели и в контрольной группе. Видно, что уровень ЭТ 1-21 достоверно ($p < 0,05$) превышает аналогичный показатель в контрольной группе только у носителей генотипа AA полиморфизма A1166C гена *AGTR1*. Однако уровень АТ II в сыворотке крови у носителей того же генотипа, а также генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly *ADRB2*, достоверно ($p < 0,05$, $p < 0,01$)

снижается по сравнению с контролем. Аналогичная картина наблюдается и в отношении уровня АС в сыворотке крови. На этом фоне активность сывороточного АПФ повышалась, но недостоверно.

При II степени ЭАГ картина несколько иная, таблица 3. Уровень сывороточного ЭТ1-21 достоверно ($p < 0,01$) повышался только у больных ЭАГ, носителей генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*. Уровень АТ II достоверно ($p < 0,01$) снижался у носителей генотипа MM полиморфизма Thr174Met гена *AGT*, во всех остальных случаях колебания этого показателя носили статистически недостоверный характер. Сывороточный уровень АС достоверно снижался только у носителей генотипа CC полиморфизма A1166C гена *AGTR1* ($p < 0,05$) и у носителей генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* ($p < 0,01$). Активность АПФ в обследованной группе больных испытывала тенденцию к увеличению.

Третья степень ЭАГ сопровождалась изменениями уровней сывороточных вазопрессоров только в случаях экспрессии полиморфизмов гена *ADRB2*, что отражено в таблице 4. Из данных таблицы видно, что при III степени ЭАГ носители генотипа Gln/Gln полиморфизма Gln27Glu гена *ADRB2* имели достоверное снижение уровня АС ($p < 0,01$). В этой же группе больных ЭАГ определялось достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня АТ II, в то время как у носителей генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* определялась тенденция к повышению уровня этого вазопрессора по сравнению с контрольной группой. Одновременно у носителей этого же полиморфизма выявлялось достоверное ($p < 0,05$) увеличение активности АПФ. Колебания уровней ЭТ1-21 не носили статистически значимого характера.

Важно было оценить характер корреляционных связей между изученными полиморфизмами и уровнями сывороточных вазопрессоров при ЭАГ I, II и III степени. В таблице 5 представлены значения статистически достоверных коэффициентов ранговой корреляции Спирмена. Корреляционная связь оценивалась

между показателями сывороточных вазопрессоров и полиморфизмами изученных генов в гомо- и гетерозиготной формах. Видно, что наибольшее количество достоверных связей определялось между полиморфизмами генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* и уровнем сывороточного ЭТ1-21 — их четыре. Достоверная корреляционная связь между уровнем сывороточного АТ II определялась только с полиморфизмами Gln27Glu и Arg16Gly гена *ADRB2*. Уровень сывороточного АС имел достоверные корреляционные связи с полиморфизмом Arg16Gly гена *ADRB2* при ЭАГ I и II степени. Что касается АПФ, то этот показатель имел единственную достоверную корреляционную связь с полиморфизмом Thr174Met гена *AGT* при ЭАГ II степени. Наибольшее количество достоверных корреляционных связей наблюдалось при ЭАГ III степени — их определялось пять, при II степени ЭАГ — две и при I степени ЭАГ — одна. Все связи были положительными и средней силы.

Обсуждение

Несмотря на многочисленные работы, посвящённые генетическим аспектам ЭАГ, значимость полиморфизмов генов-кандидатов ЭАГ остаётся недостаточно изученной. Констатация мутационной изменчивости генов-кандидатов, определение достоверной частоты встречаемости конкретных полиморфизмов в изучаемых выборках, ассоциация генотипов и аллелей полиморфизмов с клиническими формами ЭАГ — важное направление исследований генетики ЭАГ. Но имеющиеся на сегодняшний день результаты этих работ противоречивы и не позволяют представить обоснованные схемы патогенеза ЭАГ, где полиморфизмы генов-кандидатов ЭАГ играли бы доминирующую роль и, что не менее важно, имели бы практическое значение. В настоящей работе представлены результаты оценки частот встречаемости генотипов полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* при ЭАГ I, II и III степени и связи этих генотипов с уровнями сывороточных вазопрессоров. Все изученные полиморфизмы относятся к категории единичных замен, обозначаемых как SNP. Работа проведена на дагестанской популяции. Известно, что распространённость SNP неодинакова в различных выборках и имеет существенные этнические различия и различия, обусловленные географическим регионом проживания обследованных больных [10].

Ассоциация изученных нами полиморфизмов “генов гипертонии” с патогенезом ЭАГ доказывается наличием статистически значимого повышения частоты встречаемости конкретных генотипов этих полиморфизмов в изучаемой выборке. По нашим данным (табл. 1) в дагестанской популяции при ЭАГ I степени такими генотипами являются генотипы AA полиморфизма A1166C гена *AGTR1*, а также генотип Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*. Отме-

тим, что первый генотип является нормальной гомозиготой, где отсутствует замена аденина (A) на цитозин (C), а второй генотип является “патологической” гетерозиготой, где произошла замена аргинина (Arg) на глицин (Gly).

При II степени ЭАГ генотип Arg/Gly также встречается достоверно чаще по сравнению с контрольной группой, в этой же группе определяется достоверное увеличение значения ОР. Однако с другими генотипами дело обстоит иначе. Согласно критерию χ^2 достоверность частоты встречаемости генотипа MM полиморфизма Thr174Met гена *AGT* и генотипа CC полиморфизма A1166C гена *AGTR1* является статистически незначимой. Но что необходимо отметить, у носителей этих же генотипов мы видим статистически значимые повышенные показатели ОР возникновения ЭАГ (1,4 и 2,4, соответственно). Отметим, что и генотип MM, и генотип CC являются “патологическими” гомозиготами, свидетельствующими о заменах треонина (T) на метионин (M) и аденина (A) на цитозин (C) в гомозиготной форме, соответственно.

При III степени ЭАГ достоверное увеличение частот встречаемости отмечается в отношении генотипа Gln/Gln полиморфизма Gln27Glu и генотипа Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*. Первый генотип является нормальной гомозиготой, где 27 позиция глутамина (Gln) остается неизменной, второй генотип является “патологической” гетерозиготой, свидетельствующей о замене аргинина (Arg) на глицин (Gly) в 16 позиции. В этих же группах отмечается достоверное повышение ОР — 5 и 2,8, соответственно.

Таким образом, достоверное повышение частот встречаемости изученных генотипов полиморфизмов “генов гипертонии” в дагестанской популяции имеет определённую ассоциацию со степенями ЭАГ. Характер этих ассоциаций при I, II и III степени ЭАГ разнороден, наиболее часто встречаемым в этих ассоциациях является генотип Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*. Патогенетическое значение дисфункции β_2 -адренорецепторов при ЭАГ известно, и среди причин расстройств деятельности этих рецепторов может присутствовать указанный полиморфизм.

При анализе полученного материала очевидной была обоснованность оценки связи выведенных нами генотипов ЭАГ в дагестанской популяции с наиболее значимым аспектом ЭАГ — уровнями сывороточных вазопрессоров. Эта связь изучена в зависимости от степени ЭАГ.

Изменения сывороточных вазопрессоров у носителей патогенетически значимых генотипов полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* носили также разнонаправленный характер. При I степени ЭАГ (табл. 2) определяется ассоциация достоверно повышенного уровня ЭТ1-21 с генотипом AA полиморфизма A1166C гена *AGTR1* и тенденция к ассоциации

с генотипом Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*. На этом фоне между полиморфизмом Arg16Gly и уровнем ЭТ1-21 определяется достоверная прямая корреляционная связь средней силы ($r=0,445$, $p=0,05$). Ассоциация между достоверным повышением уровня ЭТ1-21 в сыворотке крови с генотипом Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* определяется и при ЭАГ II степени. Полученные результаты вполне объяснимы, поскольку эндотелиальная дисфункция является необходимым и доказанным звеном патогенеза ЭАГ и кроме этого известно, что ангиотензиновые рецепторы и адренорецепторы экспрессируются в т.ч. и на эндотелии сосудов [15, 16].

Однако в отношении других вазопрессоров получены иные данные. При I, II и III степени ЭАГ определяется снижение сывороточных уровней АТ II и АС. Вероятные причины подобных изменений при ЭАГ состоят в том, что более половины обследованных нами больных принимали ингибиторы АПФ (лизиноприл, каптоприл), что способствовало снижению уровней АТ II и АС в сыворотке крови. Кроме этого известно, что первичные АГ сопровождаются снижением уровня АС в сыворотке крови [17].

Отличительной чертой ЭАГ II степени (табл. 3) является ассоциация достоверного снижения уровней АТ II и АС с генотипом ММ полиморфизма Thr174Met гена *AGT* в первом случае и с генотипами СС полиморфизма A1166C гена *AGTR1* и Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* во втором. Подобная ассоциация особенно демонстративна в отношении полиморфизма гена *AGT* — полипептидного предшественника наиболее мощного вазопрессора ангиотензина II и уровнем его в сыворотке крови.

При III степени ЭАГ достоверное снижение уровня АТ II и АС в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой ассоциировано с единственным генотипом — Gln/Gln полиморфизма Gln27Glu гена *ADRB2* (табл. 4). Что же касается АПФ, то тенденция к повышению активности этого фермента достигает статистически значимого уровня только при ЭАГ III степени и этот факт ассоциирован с генотипом Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*. В целом же ассоциации полиморфизмов гена *ADRB2* встречаются наиболее часто и именно

с ними отмечается наибольшее количество достоверных корреляционных связей с уровнями вазопрессоров в сыворотке крови (табл. 5). В отношении достоверных корреляционных связей интересна тенденция к пропорциональному увеличению их количества степени ЭАГ.

Полученные в настоящей работе результаты отражают, возможно, некоторые особенности генетики ЭАГ в дагестанской популяции и, несмотря на свою мозаичность, позволяют провести патогенетические связи между SNP “генов гипертонии” и уровнями наиболее актуальных вазопрессоров в сыворотке крови. Обоснованность дальнейших исследований в этом направлении совершенно очевидна и они принесут важные результаты, в т.ч. и в отношении индивидуализации гипотензивной терапии у этих больных.

Заключение

Достоверное увеличение частот встречаемости изученных нами генотипов полиморфизмов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* при ЭАГ I, II III степени отражает определённую специфику мутационного процесса, затрагивающего указанные гены в дагестанской популяции. Речь не идёт об уникальности этого процесса, поскольку полиморфизмы генов-кандидатов ЭАГ являются универсальными, составляющими генетическую основу ЭАГ в различных регионах и в различных этнических группах. Но сочетание достоверно изменённых частот встречаемости конкретных генотипов с достоверными изменениями концентраций сывороточных вазопрессоров ЭТ1-21, АТ II, АС и АПФ у носителей этих генотипов, позволяют сделать вывод о патогенетической связи пресорного контура длительного действия и экспрессией патологических генотипов генов *AGT*, *AGTR1* и *ADRB2* при ЭАГ I, II III степени в дагестанской популяции. Наличие достоверных положительных корреляционных связей средней силы дополняют обоснование вывода о том, что в дагестанской популяции при ЭАГ I, II, III степени патогенетически важное значение имеют генотипы Arg/Gly полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*, генотипа АА полиморфизма A1166C гена *AGTR1*, генотипа ММ полиморфизма Thr174Met гена *AGT* и генотипа Gln/Gln полиморфизма Gln27Glu гена *ADRB2*.

Литература

1. Dzau V, Antman E, Black H, et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation*. 2006; 114(25): 2850-70.
2. Boytsov SA. What we know about pathogenesis of arterial hypertension. *Consilium medicum*. 2011; 6(5): 315-19. Russian (Бойцов С.А. Что мы знаем о патогенезе артериальной гипертензии. *Consilium medicum*. 2011; 6(5): 315-19).
3. Puzirev VP. Genetic of arterial hypertension (modern scientific paradigms). *Clinical medicine*. 2003; 1: 12-8. Russian (Пузырёв В.П. Генетика артериальной гипертензии (современные исследовательские парадигмы). *Клиническая медицина*. 2003; 1: 12-8).
4. Dickson ME, Sigmund CD. Genetic basis of hypertension: revisiting angiotensinogen. *Hypertension*. 2007; 48: 14-20.
5. Wei G, Jieli L, Qiuli N, et al. A-6G and A-20C Polymorphisms in the Angiotensinogen Promoter and Hypertension Risk in Chinese: A Meta- Analysis. *PLoS ONE* 2011; 6(12): e29489. doi:10.1371/journal.pone.0029489.
6. Xiaoyang L, Zhiyi Y, Daqing P, et al. Association of T174M polymorphism of angiotensinogen gene with essential hypertension: A meta-analysis *Genetics and Molecular Biology*. 2014; 37(2): 473-79.
7. Sudhir C, Rajiv N, Vishnubhatla S, et al. Association of Angiotensin II Type 1 Receptor (A1166C) Gene Polymorphism and Its Increased Expression in Essential Hypertension: A Case-Control Study *PLoS ONE* 2014; 9(7):e101502.doi:10.1371/journal.pone.0101502
8. Dungan JR, Conley YP, Langae TY, et al. Altered beta2 adrenergic receptor gene expression in human clinical hypertension. *Biol. Res. Nurs.* 2009; 11(1): 17-26.

9. Obraztsova GI, Yurev VV, Glotov AS, et al. Genetic aspects of arterial hypertension in children. *Molecular medicine*. 2013; 3: 32-5. Russian (Образцова Г.И., Юрьев В.В., Глотов А.С. и др. Генетические аспекты формирования артериальной гипертензии у детей. *Молекулярная медицина*. 2013; 3: 32-5).
10. Silvestrova GA, Golubeva AA, Sirkin AL, et al. Polymorphs markers genes of renin-angiotensin-aldosterone system and gene NO-sintase in diagnosis of arterial hypertension in mens of Central Russions region. *Cardiology and cardiovascular surgery*. 2008; 1(5): 40-5. Russian (Сильвестрова Г.А., Голубева А.А., Сыркин А.Л. и др. Полиморфные маркеры генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и гена NO-синтазы в диагностике артериальной гипертонии у мужчин Центрального региона России. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2008; 1(5): 40-5).
11. Mustafina OE, Nasibulin TR, Husnudinov IK. Association M235T polymorphism of angiotensinogen and essential hypertension in Russian and Tatars populations in Bashkortastan. *Molecular biology*. 2002; 36(4): 599-604. Russian (Мустафина О.Е., Насибуллин Т.Р., Хуснутдинов Э.К. Ассоциация T174M полиморфизма ангиотензиногена и эссенциальной гипертензии в русской и татарской популяции Башкортостана. *Молекулярная биология*. 2002; 36(4): 599-604).
12. Miloserdova OV, Slominskiy PA, Tarskaya LA, et al. Polymorphs markers of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme in yakuts. Absens of association with the level of arterial pressure. *Genetic*. 2001; 37(5): 712-5. Russian (Милосердова О.В., Сломинский П.А., Тарская Л.А. и др. Полиморфные маркеры ангиотензиногена и ангиотензин-превращающего фермента у якутов. Отсутствие ассоциации с уровнем артериального давления. *Генетика*. 2001; 37(5): 712-5).
13. Dzida G, Buraczynska K, Sobstyl J, et al. M235T polymorphism of human angiotensinogen gene in essential hypertension in Polish population. *Pol. Arch. Med. Wewn*. 1999 102 (6): 1033-7.
14. Diagnosis and treatment of arterial hypertension. Russian recommendation (fours reverse). *System hypertension*. 2010; 3: 5-33. Russian (Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (четвёртый пересмотр). *Системные гипертензии*. 2010; 3: 5-33).
15. Dungan J, Conley Y, Langae T, et al. Altered beta2 adrenergic receptor gene expression in human clinical hypertension. *Biol Res Nurs*. 2009; 11(1): 17-26. doi:10.1177/1099800409332538.
16. Mottl AK, Shoham DA, North KE. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and susceptibility to hypertension: A HuGE review. *Genet Med*. 2008; 10(8): 560-74.
17. Adebisi A, Akinosun O, Nwafor C, Falase A. Relationship between Plasma Aldosterone Levels and Left Ventricular Mass in Hypertensive Africans. *International Journal of Hypertension*; 2013, Article ID 762597, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/762597>.