

УДК 575.174:599.9

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СРЕДИ РУССКИХ И ТАТАР РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Р.Г. Газизова, И.И. Ибрагимова, А.Н. Аскарова

Аннотация

Исследована ассоциация между генами ангиотензиногена (АГТ), ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), геном эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS) и гипертонической болезнью (ГБ) в популяции Республики Татарстан. Полиморфные варианты T174M, M235T, A-20C гена АГТ, G2350A гена АПФ и в области 4 интрона эндотелиальной синтазы eNOSa/b анализировались методом полимеразной цепной реакции. Относительные частоты аллелей и генотипов варианта T174M различались в группе больных гипертонической болезнью и контрольной группе только у русских. У русских гетерозиготы TM и аллель M ассоциировались с развитием ГБ (значения отношения шансов (ОШ) – 1.66 и 1.9 соответственно). Кроме того, у русских наблюдали статистически значимое увеличение частот генотипа AC и аллеля C полиморфизма A-20C гена АГТ (ОШ = 2.24 для генотипа A-20C и ОШ = 1.97 для аллеля C). Показано, что у лиц русской национальности одновременное носительство генотипа TM (T174M) и AC (A-20C) приводит к более высокому риску развития гипертензии (ОШ = 3.8). Среди татар ассоциация генотипа TM (T174M) и AC (A-20C) с ГБ не обнаружена. Различия в распределении частот аллелей и генотипов варианта M235T наблюдали в группе татар и русских. Частота генотипа M235T была более высокой среди больных ГБ по сравнению с лицами группы сравнения (ОШ = 2.3 у татар; ОШ = 1.57 у русских). Полиморфизм G2350A гена АПФ и 4 eNOSa/b не ассоциировался с ГБ в исследованных этнических группах.

Введение

Гипертоническая болезнь (ГБ) относится к мультифакторным, полигенным патологиям, обусловленным сложным взаимодействием генетических факторов между собой и факторами среды. О полигенности данного заболевания свидетельствует неподчинение его классическим менделевским законам [1], в связи с чем для оценки вклада генетических факторов в развитии ГБ исследования последних лет были направлены на поиск генов предрасположенности и анализ ассоциаций полиморфных локусов с заболеванием в различных популяциях.

В качестве генов предрасположенности развития ГБ рассматривают гены, продукты экспрессии которых вовлечены в физиологическую регуляцию уровня кровяного давления и водно-солевого гомеостаза. В первую очередь, это гены ренин-ангиотензиновой системы (РАС), гены каллекреин-кининового пути, системы эндотелий-зависимых факторов, одним из которых является эндотелиальная синтаза оксида азота [2]. Первым компонентом РАС является белок, со-

стоящий из 452 аминокислотных остатков – ангиотензиноген (АГТ) [3]. Под действием фермента ренина осуществляется его превращение в неактивный декапептид – ангиотензин I, который в результате воздействия ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) превращается в активный октапептид ангиотензин II. Ангиотензин II обладает выраженным сосудосуживающим действием, стимулирует пролиферацию клеток гладкой мускулатуры сосудов, миокарда и через посредство альдостерона усиливает реабсорбцию натрия в почках. За последние 15 лет был достигнут большой успех в области клонирования генов этих белков и идентификации информативных генетических маркеров, расположенных внутри данных генов.

Ген ангиотензиногена расположен в локусе 1q42-43 [4]. В настоящее время описано несколько полиморфизмов этого гена, среди которых наиболее изученными являются варианты T174M и M235T. Они связаны с нуклеотидными заменами тимина на цитозин в случае варианта M235T и, наоборот, цитозина на тимин в варианте T174M, что приводит к заменам метионина на треонин в 235-м (M235T-полиморфизм) и треонина на метионин в 174-м (T174M-полиморфизм) положениях аминокислотной последовательности [5]. Первые данные о связи этих вариантов с ГБ были получены в 1992 г. X. Jeunemaitre и др. при изучении популяций США и Франции [6]. С тех пор исследования связи данных полиморфных вариантов с ГБ активно ведутся во многих популяциях. Однако данные исследований как различных популяций, так и в пределах одной популяции противоречивы. Так, у британцев [7], китайцев [8], японцев [9] связь этих точечных мутаций с развитием ГБ не обнаружена. По данным ряда авторов наличие T-аллеля по полиморфизму M235T приводит к существенному повышению уровня АГТ в плазме, чем и объясняют ассоциацию данного полиморфизма с ГБ [10, 11]. Сцепленность данного молекулярного варианта с ГБ была показана у американцев европейского происхождения [12], японцев [13, 14], китайцев [15] германцев [16], негроидов афрокарибского происхождения [17]. Сведения относительно ассоциации варианта T174M гена АГТ с ГБ в литературе немногочисленны. Ассоциация мутантного аллеля 174M обнаруживалась у японцев [18], франко-канадцев [19].

Однако данные структурные полиморфизмы не могут объяснить молекулярные механизмы, ведущие к увеличению уровня АГТ. Поэтому зарубежные исследователи приступили к изучению полиморфизмов в промоторном участке гена АГТ, способных повлиять на уровень экспрессии мРНК ангиотензиногена и тем самым участвовать в патогенезе гипертонии. На сегодняшний день известны следующие полиморфные сайты в промоторном участке гена АГТ: G-6A, A-20C, T-18C. Согласно экспериментальным данным, полученным в различных популяциях мира, на уровень АГТ оказывают влияние больше в той или иной степени полиморфизмы A-20C, G-6A [20–22]. В нашей стране попытки исследования полиморфизмов в промоторном участке гена АГТ ранее не предпринимались.

Ангиотензин-превращающий фермент, кроме превращения ангиотензина I в ангиотензин II, осуществляет инактивацию брадикинина до неактивных метаболитов. Брадикинин же является одним из стимуляторов выделения эндотелием окиси азота (NO) – основного эндотелиального фактора релаксации. Та-

ким образом, АПФ является одним из ключевых звеньев поддержания равновесия между факторами вазоконстрикции и вазодилатации, и следовательно, регуляции сосудистого тонуса. Этим объясняется повышенный интерес к изучению роли полиморфизма гена АПФ в генезе гипертонической болезни.

Ген АПФ картирован на хромосоме 17q23 [23]. К настоящему времени накоплено множество данных об ассоциации полиморфизма D/I (делеция/вставка 287 п.о. фрагмента в 16 интроне) гена АПФ с сердечно-сосудистыми заболеваниями [24–26]. Было показано влияние полиморфизма D/I гена АПФ на концентрацию АПФ в циркулирующей и локальной тканях, при этом у здоровых лиц с DD генотипом определялся максимальный уровень АПФ крови, у людей с II генотипом уровень АПФ крови вдвое ниже, а у гетерозигот уровень фермента крови промежуточный [27]. Однако значительно большее число работ не подтверждает предположение о возможной связи полиморфизма гена АПФ с гипертонией [28]. Возможно, что расхождения в экспериментальных данных, полученных авторами, могут быть объяснены различным этническим составом обследуемых групп и возрастной динамикой полиморфизма гена АПФ. Так, в старших возрастных группах московской популяции обнаружено снижение частоты аллеля I [29].

Интерес представляет относительно недавно идентифицированный полиморфный локус G2350A (экзон 17) гена АПФ. Среди 13 изученных полиморфизмов у 1343 представителей Нигерии только полиморфизм G2350A гена АПФ оказывал существенное влияние на уровень АПФ плазмы крови [30]. Ассоциация данного полиморфизма с уровнем АПФ плазмы крови, а именно с аллелем G, наблюдалась среди ямайцев и британцев [31]. Связь данного полиморфизма с заболеваниями изучалась лишь в единичных работах, и положительную связь с ГБ наблюдали только в пакистанской популяции [32].

Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) ответственна за синтез NO из L-аргинина эндотелием и, следовательно, участвует в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления. Ген eNOS локализован на хромосоме 7q35-36 [33]. Описаны и изучаются два основных полиморфных маркера гена эндотелиальной NO-синтазы: расположенный в 4 интроне eNOS4a/b полиморфизм и Glu298Asp полиморфизм.

Данные о связи этих полиморфных вариантов с артериальной гипертонией противоречивы. Имеются данные о большей частоте встречаемости полиморфизма Glu298Asp у больных гипертонией (до 10%) в японской популяции, тогда как частота полиморфизма eNOS4a/b не имела достоверных различий между больными ГБ и лицами контрольной группы [34]. В европейской же популяции связь полиморфизма Glu298Asp с ГБ не подтвердилась [35]. Показана связь данной мутации с инфарктом миокарда в Японии [36] и Великобритании [37]. Другой полиморфизм по 4 интрону eNOS4a/b был связан с ишемической болезнью сердца среди белой популяции Австралии, причем частота аллеля a была выше среди курильщиков [38]. Возможно, что противоречивость данных объясняется особенностью генофондов, к которым принадлежат обследованные больные. В связи с этим необходимо дальнейшее накопление материала об этих ассоциациях в различных этнических группах населения. В Республике Татарстан подобные исследования ранее не проводились несмотря на то, что

гипертония является одной из наиболее часто встречающихся патологий как среди татар, так и среди русских, проживающих на территории республики.

Исходя из вышесказанного, в работе была поставлена задача провести анализ ассоциации полиморфных локусов T174M, M235T, A-20C гена AGT, G2350A гена АПФ, 4 eNOS4a/b гена эндотелиальной синтазы окиси азота с ГБ у русских и татар Татарстана.

1. Материалы и методы

Группа пациентов с ГБ ($n = 145$) была сформирована на базе кардиологического отделения больницы скорой медицинской помощи г. Казани с учетом пола, возраста, национальности, показателей углеводного и липидного обмена, анамнестических данных на ближайших кровных родственниках. Группу популяционного контроля ($n = 125$) составили пациенты травматологического и хирургического отделений того же стационара без признаков ГБ, сахарного диабета и прочих системных заболеваний.

Геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови с помощью стандартного метода фенол-хлороформной экстракции [39]. Анализ полиморфизмов проводили с помощью метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) в соответствии со структурой праймеров и условий, приведенных ранее в литературе [40–44].

Для статистического анализа полученных данных по распределению частоты аллельных вариантов и генотипов был использован критерий χ^2 и двусторонний точный критерий Фишера. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимали менее 0.05. Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди – Вайнберга использовали критерий χ^2 [45]. Для оценки связи полиморфных вариантов с ГБ рассчитывали показатель относительного риска как отношение шансов по формуле: $ОШ = (ad)/(bc)$; в том случае, если один из показателей был равен нулю, то формула приобретала вид: $ОШ = (a + 0.5)(d + 0.5)/[(b + 0.5)(c + 0.5)]$, где a – число больных с наличием данного аллеля, b – с отсутствием данного аллеля, c и d – число здоровых соответственно с наличием и отсутствием данного аллеля; 0.5 – поправка на малочисленность выборки. При $ОШ = 1$ нет ассоциации, $ОШ > 1$ – положительная ассоциация, при $ОШ < 1$ – отрицательная ассоциация.

2. Результаты и обсуждение

В работе проведен анализ пяти полиморфных вариантов трех генов – кандидатов на развитие ГБ: T174M, M235T, A-20C гена AGT, G2350A гена АПФ, eNOS4a/b гена эндотелиальной синтазы окиси азота.

2.1. Анализ ассоциаций полиморфизма T174M гена ангиотензиногена.

В результате амплификации участка ДНК гена AGT, содержащего полиморфный участок T174M, образуется фрагмент длиной 303 п.н. После обработки рестриктазой NcoI фрагмент, содержащий аллель M, расщепляется на фрагмен-

ты размером 197 и 106 п.н. Таким образом, после обработки NcoI наличие фрагмента длиной 303 п.н. соответствовало генотипу ТТ, двух фрагментов (197 и 106 п.н.) – генотипу ММ, а трех фрагментов (303, 197 и 106 п.н.) – генотипу ТМ. Наблюдаемое распределение частот генотипов как в русской ($\chi^2 = 0.015$; $p = 0.904$), так и татарской ($\chi^2 = 0.023$; $p = 0.878$) этнических группах соответствовало теоретически ожидаемому по закону Харди – Вайнберга.

Табл. 1

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта Т174М гена АГТ среди русских и татар в контрольной группе («ГБ →») и группе больных ГБ («ГБ +»)

Аллель Генотип	«ГБ +»		«ГБ →»		$\chi^2(p)$	ОШ
	частота	ДИ	частота	ДИ		
русские						
<i>T</i>	0.843	0.789–0.897	0.911	0.852–0.970	2.38(0.12)	0.52
<i>M</i>	0.157	0.102–0.211	0.089	0.03–0.148		
ТТ	0.709	0.613–0.805	0.822	0.71–0.934	2.0(0.15)	0.52
ТМ	0.267	0.173–0.361	0.178	0.066–0.289		
ММ	0.023	0.008–0.055	0			1.66
татары						
<i>T</i>	0.905	0.854–0.956	0.866	0.803–0.929	0.88(0.34)	1.46
<i>M</i>	0.095	0.04–0.146	0.134	0.07–0.197		
ТТ	0.825	0.731–0.919	0.75	0.636–0.863	1.02(0.10)	1.44
ТМ	0.159	0.068–0.249	0.232	0.121–0.343		
ММ	0.016	0.015–0.047	0.018	0.016–0.053		0.62

Как видно из сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов (табл. 1), среди русских и татар, больных ГБ, и лиц группы сравнения наблюдалось преобладание аллеля *T* над *M*, генотипа ТТ над ТМ и ММ. У русских, больных гипертонией, по сравнению с лицами группы сравнения, наблюдали возрастание доли аллеля *M* (15.7% против 8.9%) и генотипа ТМ (26.7% против 17.8%). Хотя значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов среди русских, больных ГБ, и лиц группы сравнения не выявлено, тем не менее у русских аллель *M* и генотип ТМ можно рассматривать как факторы риска развития ГБ (OR = 1.9 и OR = 1.66), тогда как аллель *T* и генотип ТТ – наоборот, как факторы, предохраняющие от развития ГБ (OR = 0.52 и OR = 0.52).

Наши данные о предрасполагающей доли аллеля *M* и генотипа ТМ в развитии гипертонии соответствуют результатам аналогичных отечественных исследований. Положительную взаимосвязь полиморфного варианта Т174М с ГБ отметили при изучении московской популяции [40], среди славянского населения Сибири [46], а также среди русских и татар Башкортостана [47].

Для этнической группы татар динамика распределения частот аллелей и генотипов по полиморфизму Т174М гена ангиотензиногена выглядит иначе.

Частоты мутантного аллеля *M* (9.5%) и гетерозиготы *MT* (15.9%) в группе гипертоников оказываются ниже, чем в группе сравнения (соответственно 13.4% и 23.2%), поэтому в отличие от русской субпопуляции для татарской этнической группы аллель *M* и генотип *MT* выступают наоборот, как факторы, предохраняющие от развития ГБ ($OR = 0.68$ и $OR = 0.62$ соответственно).

Табл. 2

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта M235T гена AGT среди русских и татар в контрольной группе («ГБ →») и группе больных ГБ («ГБ +»)

Аллель Генотип	«ГБ +»		«ГБ →»		$\chi^2(p)$	ОШ
	частота	ДИ	частота	ДИ		
русские						
<i>M</i>	0.453	0.379–0.528	0.556	0.453–0.658	2.46(0.11)	0.66
<i>T</i>	0.547	0.472–0.621	0.444	0.341–0.547		
MM	0.174	0.09–0.255	0.333	0.195–0.471		
MT	0.558	0.453–0.663	0.444	0.299–0.590		
TT	0.267	0.173–0.361	0.222	0.100–0.344		
татары						
<i>M</i>	0.585	0.496–0.674	0.519	0.383–0.655	0.63(0.42)	1.3
<i>T</i>	0.415	0.326–0.504	0.481	0.344–0.617		
MM	0.271	0.157–0.385	0.308	0.130–0.485		
MT	0.627	0.503–0.751	0.423	0.233–0.613		
TT	0.102	0.024–0.179	0.269	0.098–0.440		

2.2. Анализ ассоциаций полиморфизма M235T гена ангиотензиногена.

В случае полиморфного варианта M235T гена AGT в результате амплификации происходило образование фрагмента длиной 162 п.н. (аллель *M*) и фрагмента размером 140 п.н. (аллель *T*). Обнаружение в амплификационной смеси только фрагмента одной длины соответствовало гомозиготному генотипу MM (162 п.н.) или TT (140 п.н.), а выявление фрагментов 162 и 140 п.н. – гетерозиготному генотипу MT. Распределение частот генотипов по M235T полиморфизму в русской ($\chi^2 = 0.114$; $p = 0.74$) и татарской ($\chi^2 = 1.453$; $p = 0.23$) этнических группах соответствовало теоретически ожидаемому. Среди русских и татар, как больных, так и контрольной группы, преобладал генотип MT над генотипами MM и TT (табл. 2). Однако в группе больных ГБ, особенно среди татар, генотип MT встречается чаще, чем у лиц группы сравнения. Подобная ассоциация MT-гетерозиготности с ГБ была отмечена в подобных исследованиях зарубежными авторами [48]. Возможно, что АГТ активен в форме димера, и такой димер M235T функционально отличается от гомодимеров M235M и T235T. Кроме того, у больных ГБ татар, в отличие от лиц группы сравнения, наблюдали достоверное уменьшение в 2.5 раза частоты встречаемости гомозигот TT (по Фишеру $p = 0.042$). Таким образом, генотип MT является фактором риска раз-

вития ГБ как среди татар, так и среди русских (ОШ = 2.30 у татар; ОШ = 1.57 у русских), тогда как аллель *T* и генотип ТТ являются факторами риска только для русских (ОШ = 1.54 для аллеля *T*, ОШ = 1.28 для генотипа ТТ).

Табл. 3

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта А-20С гена АГТ среди русских и татар в контрольной группе («ГБ →») и группе больных ГБ («ГБ +»)

Аллель Генотип	«ГБ +»		«ГБ →»		$\chi^2(p)$	ОШ	
	частота	ДИ	частота	ДИ			
русские							
<i>A</i>	0.784	0.72–0.84	0.878	0.81–0.94	3.41(0.064)	0.5	
<i>C</i>	0.216	0.15–0.27	0.122	0.05–0.19		1.97	
AA	0.605	0.49–0.71	0.778	0.65–0.89		3.88(0.048)*	0.43
AC	0.358	0.25–0.46	0.2	0.08–0.31			2.24
CC	0.037	0.004–0.07	0.022	0.02–0.06			1.69
татары							
<i>A</i>	0.917	0.86–0.96	0.866	0.8–0.92	1.54(0.214)	1.7	
<i>C</i>	0.083	0.03–0.13	0.134	0.07–0.19	1.35(0.5)	0.58	
AA	0.85	0.75–0.94	0.768	0.65–0.87		1.71	
AC	0.133	0.04–0.21	0.196	0.09–0.3		0.62	
CC	0.017	0.01–0.04	0.036	0.01–0.08			

2.3. Анализ ассоциаций полиморфизма А-20С гена ангиотензиногена.

В результате амплификации участка ДНК гена АГТ, содержащего полиморфный участок А-20С, образуется фрагмент длиной 265 п.о. После обработки рестриктазой *Dra*II фрагмент, содержащий аллель *C*, расщеплялся на фрагменты размером 137 и 68 п.о., а фрагмент, содержащий аллель *A*, – на фрагменты 205 и 60 п.о. Таким образом, после обработки рестриктазой *Dra*II наличие фрагментов длиной 205 и 60 п.о. соответствовало генотипу AA, фрагментов 205, 137, 68, 60 п.о. – генотипу AC, и трех фрагментов 137, 68 и 60 п.о. – генотипу CC. Наблюдаемое распределение частот генотипов как в русской ($\chi^2 = 0.032$; $p = 0.804$), так и татарской ($\chi^2 = 0.043$; $p = 0.778$) этнических группах соответствовало теоретически ожидаемым по закону Харди – Вайнберга.

При сравнительном анализе полиморфизма А-20С гена АГТ в исследуемых группах получено достоверно значимое различие частот генотипов между больными ГБ и лицами группы сравнения только в русской этнической группе (табл. 3). Наблюдается достоверно значимое повышение частоты генотипа AC в группе русских больных ГБ (35.8% против 20%). Для русских носителей данного генотипа показатель относительного риска развития болезни составил 2.24. Тогда как для татарской этнической группы генотип AC выступает как фактор, предохраняющий от развития ГБ (ОШ = 0.62).

Динамики распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма А-20С и Т174М гена АГТ среди русских и татар, больных ГБ, и лиц контрольной группы оказались очень схожими (табл. 1, 3), что наводит на мысль о сцеплен-

Табл. 4

Сравнительный анализ распределения частот генотипов в различных сочетаниях полиморфизмов А-20С и Т174М гена АГТ в русской этнической группе среди больных ГБ («ГБ +») и лиц группы сравнения («ГБ -»)

Аллель Генотип	«ГБ +»		«ГБ -»		$\chi^2(p)$	ОШ
	частота	ДИ	частота	ДИ		
русские						
<i>M</i>	0.453	0.379–0.528	0.556	0.453–0.658	2.46(0.11)	0.66
<i>T</i>	0.547	0.472–0.621	0.444	0.341–0.547		
MM	0.174	0.09–0.255	0.333	0.195–0.471		
MT	0.558	0.453–0.663	0.444	0.299–0.590		
TT	0.267	0.173–0.361	0.222	0.100–0.344		
татары						
<i>M</i>	0.585	0.496–0.674	0.519	0.383–0.655	0.63(0.42)	1.3
<i>T</i>	0.415	0.326–0.504	0.481	0.344–0.617		
MM	0.271	0.157–0.385	0.308	0.130–0.485		
MT	0.627	0.503–0.751	0.423	0.233–0.613		
TT	0.102	0.024–0.179	0.269	0.098–0.440		

ности данных полиморфных вариантов. Из проведенных анализов попарных сочетаний генотипов полиморфных локусов Т174М и А-20С гена АГТ достоверно значимым для русской группы является АС-ТМ. Таким образом, для русской группы одновременное носительство данных генотипов приводит к высокому риску развития заболевания, где значение отношения шансов составляет 3.8 (табл. 4).

Наблюдаемая нами тесная связь между аллелем 174М и аллелем-20С подтверждает предположения о том, что не сам структурный полиморфизм (Т174М) связан с развитием ГБ, а полиморфизм в промоторной области гена АГТ (А-20С), который может повлиять на увеличение уровня транскрипции белка АГТ и, соответственно, его уровня в плазме крови.

2.4. Анализ ассоциаций полиморфизма G2350А гена АПФ. В случае полиморфного варианта G2350А гена ангиотензин-превращающего фермента в результате амплификации происходило образование фрагмента длиной 122 п.о. После обработки рестриктазой BstUI фрагмент, содержащий аллель А, расщеплялся на фрагменты размером 100 и 22 п.о. Таким образом, после обработки BstUI наличие фрагмента длиной 122 п.о. соответствовало генотипу GG, двух фрагментов 100 и 22 п.о. – генотипу AA, трех фрагментов 100, 122, 22 – генотипу GA. Наблюдаемое распределение частот генотипов как в русской

($\chi^2 = 0.022$; $p = 0.704$), так и татарской ($\chi^2 = 0.033$; $p = 0.678$) этнических группах соответствовало теоретически ожидаемым по закону Харди – Вайнберга.

Табл. 5

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта G2350A гена АПФ среди русских и татар в контрольной группе («ГБ →») и группе больных ГБ («ГБ +»)

Аллель Генотип	«ГБ +»		«ГБ →»		$\chi^2 (p)$	ОШ	
	частота	ДИ	частота	ДИ			
русские							
<i>G</i>	0.48	0.39–0.57	0.47	0.37–0.58	0.007(0.93)	1.02	
<i>A</i>	0.51	0.42–0.60	0.52	0.42–0.62		0.97	
GG	0.23	0.12–0.33	0.2	0.08–0.31		0.246(0.88)	1.19
GA	0.5	0.38–0.63	0.55	0.41–0.70			0.82
AA	0.26	0.15–0.37	0.24	0.11–0.37			1.09
татары							
<i>G</i>	0.6	0.50–0.69	0.56	0.47–0.65	0.267(0.61)	1.15	
<i>A</i>	0.4	0.30–0.49	0.43	0.34–0.52	0.44(0.79)	0.86	
GG	0.32	0.19–0.44	0.26	0.15–0.37		1.32	
GA	0.56	0.42–0.69	0.6	0.48–0.72		0.82	
AA	0.12	0.02–0.21	0.13	0.04–0.21		0.9	

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфизму G2350A гена АПФ показал отсутствие статистически значимых различий между больными и лицами контрольной группы в этнических группах русских и татар (табл. 5). Расчет относительного риска развития заболевания показал отсутствие связи данного полиморфизма с ГБ в русской этнической группе и наличие слабой ассоциации в этнической группе татар с GG генотипом (ОШ = 1.32).

2.5. Анализ ассоциаций полиморфизма eNOS4a/b гена эндотелиальной синтазы окиси азота. Полиморфизм в 4-м интроне гена эндотелиальной синтазы окиси азота (VNTR полиморфизм) представлен 2 аллелями: *b*, в котором имеются 5 повторяющихся фрагментов размером по 27 п.о., и *a*, в котором содержится только 4 таких повтора. В результате амплификации получали фрагменты длиной 393 п.о., что соответствует аллелю *a*, и 420 п.о. – аллелю *b*.

В ходе сравнительного анализа по распределению частот аллелей и генотипов VNTR полиморфизма гена эндотелиальной синтазы окиси азота не было обнаружено статистически достоверных различий между больными ГБ и лицами контрольной группы в обеих этнических группах (табл. 6). В работах отечественных авторов ассоциацию с ГБ также не удалось подтвердить [49].

Поскольку NO угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток, а также обладает протективным эффектом в отношении агрегации тромбоцитов, можно предположить, что NO имеет значение в патогенезе ишемической болезни

Табл. 6

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта eNOS4a/b гена эндотелиальной синтазы окиси азота среди русских и татар в контрольной группе («ГБ →») и группе больных ГБ («ГБ +»)

Аллель Генотип	«ГБ +»		«ГБ →»		$\chi^2(p)$	ОШ
	частота	ДИ	частота	ДИ		
русские						
<i>b</i>	0.821	0.76–0.87	0.814	0.73–0.89	0.02(0.88)	1.05
<i>a</i>	0.179	0.12–0.23	0.186	0.1–0.26		0.95
bb	0.667	0.56–0.76	0.674	0.53–0.81	0.007(0.93)	0.96
ba	0.31	0.21–0.4	0.279	0.14–0.41		1.15
aa	0.024	0.008–0.05	0.047	0.01–0.10		0.5
татары						
<i>b</i>	0.892	0.83–0.94	0.867	0.8–0.93	0.30(0.58)	1.25
<i>a</i>	0.108	0.05–0.16	0.133	0.05–0.21		0.79
bb	0.8	0.69–0.90	0.755	0.63–0.87	0.31(0.57)	1.29
ba	0.183	0.08–0.28	0.224	0.10–0.34		0.77
aa	0.017	0.01–0.04	0.02	0.01–0.06		0.81

сердца. Имеются данные о достоверно большей частоте аллеля *a* в белой популяции Австралии, где X.L. Wang и соавт. [38] показали связь данного полиморфизма с ишемической болезнью сердца у курильщиков.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований полиморфных сайтов генов предрасположенности к гипертонической болезни в группе больных ГБ мы наблюдали статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов между русскими и татарами, тогда как в контрольной группе эти различия отсутствовали. Так, уровень значимости (p) различий между русскими и татарами в группе больных для M235T гена АГТ составил 0.036 (по генотипам), для A-20C – 0.0015 (по генотипам), для G2350A гена АПФ – 0.048 (по аллелям), для eNOS4a/b – 0.042 (по генотипам); в контрольной группе для M235T гена АГТ составил 0.9 (по генотипам), для A-20C – 0.92 (по генотипам), для G2350A – 0.2 (по аллелям), для eNOS4a/b – 0.39 (по генотипам). Статистически значимыми различиями считали при $p < 0.05$. Вероятно, на формирование генетической предрасположенности к развитию ГБ оказывает влияние генетический фонд популяции, что подтверждается этногеографической неоднородностью заболевания. Как видим, изучение полиморфных локусов генов предрасположенности к заболеванию представляется необходимым не только с медицинской точки зрения, но также ин-

интересным в популяционно-генетическом плане для познания структуры популяции.

Нами впервые исследованы полиморфизмы T174M и M235T A-20C гена АГТ, G2350A гена АПФ, eNOS4a/b гена эндотелиальной синтазы окиси азота в популяциях Республики Татарстан. Полученные данные свидетельствуют о важной предрасполагающей роли гена АГТ в развитии гипертонической болезни среди русских. В отличие от татар, у них генотипы T174M и A-20C вносят существенный вклад в предрасположенность к развитию гипертонии, особенно их одновременное носительство. В то же время полиморфизм M235T ассоциируется с ГБ в этнической группе татар. Полиморфизмы G2350A гена АПФ, eNOS4a/b гена эндотелиальной синтазы окиси азота не являются факторами риска развития ГБ среди населения Татарстана. Найденные различия по частотам встречаемости полиморфных вариантов отражают особенности генетической структуры этнических групп русских и татар.

Работа выполнена при финансовой поддержке молодежного гранта Академии Наук Республики Татарстан № 14-3 (2004 г.).

Summary

R.G. Gazizova, I.I. Ibragimova, A.N. Askarova. Polymorphisms associations of the essential hypertension predisposing gene among russians and tartars of Republic of Tartarstan.

This study investigated the association between angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS) gene polymorphisms and essential hypertension (EH) in populations of the Tartarstan. T174M, M235T, A-20C AGT gene, G2350A ACE gene and in intron 4 eNOSa/b polymorphisms were typed with PCR-based methods. The relative frequency of the alleles and genotypes of the T174M gene polymorphism in patients with hypertension differed from non-hypertensive patients in russian but not tartar ethnic groups. In russians the TM heterozygotes and M allele was associated with the development of EH (Odds ratios 1.66 and 1.9 respectively). Russians with EH a statistically significant increase of the A-20C genotype and the C allele frequencies along. Odds ratios (OR) were 2.24 for A-20C genotype and 1.97 for C allele. The carriers of the TM (T174M), AC (A-20C) combination showed a substantially higher probability of being hypertensive (OR = 3.8). No associations were found in tartars. The relative frequencies of the alleles and genotypes of the M235T gene polymorphism difference were observed in both ethnic groups: tartar and russian. The frequency of the M235T genotype in patients with EH was higher than that observed in patients without EH (OR = 2.3 in tartars; OR = 1.57 in russians). No association was detected between ACE G2350A or in intron 4 eNOSa/b polymorphisms and essential hypertension in two ethnic groups.

Литература

1. *Lifton R.P.* Genetic determinants of human hypertension // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – P. 8545–8551.
2. *Чистяков Д.А., Туракулов Р.И.* Генетические маркеры гипертонической болезни // Генетика. – 1999в. – Т. 35, № 5. – С. 565–573.
3. *Jeunemaitre X., Corvol P.* Molecular Genetics of Human Hypertension: Role of Angiotensinogen // Endocrine Rev. – 1997. – V. 18, No 5. – P. 662–677.

4. *Gjallard-Sanchez I., Matteri M.G., Clauser E., Corvol P.* Assignment by in situ hybridization of angiotensinogen to chromosome band 1q32: the same region as human renin gene // *Hum Genet.* – 1990. – V. 84. – P. 341–343.
5. *Hixson J.E., Powers P.K.* Detection and characterization of new mutation in the human angiotensinogen gene (AGT) // *Hum Genet.* – 1995. – V. 96. – P. 110–112.
6. *Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y.V. et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen // *Cell.* – 1992. – V. 71. – P. 169–180.
7. *Caulfield M., Lavender P., Farrall M. et al.* Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – V. 330. – P. 1629–1633.
8. *Niu T., Xu X., Rogus J. et al.* Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese // *J. Clin. Invest.* – 1998. – V. 101. – P. 188–194.
9. *Kato N., Sugiyama T., Morita H. et al.* Angiotensinogen gene and essential hypertension in the Japanese: Extensive association study and meta-analysis on six reported studies // *J. Hypertens.* – 1999. – V. 17. – P. 757–763.
10. *Corvol P., Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y.V. et al.* Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen // *Endocrine Rev.* – 1992. – V. 18. – P. 662–677.
11. *Bloem L.J., Manatunga A.K., Tewksbury D.A., Pratt J.H.* The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children // *J. Clin. Invest.* – 1995. – V. 95. – P. 948–953.
12. *Fornage M., Turner S.T., Sing C.F., Boerwinkle E.* Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota // *Hum Genet.* – 1995. – V. 96. – P. 295–300.
13. *Nishiuma S., Kario K., Kayaba K. et al.* Effect of the angiotensinogen gene Met235→Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factors in two Japanese populations // *J. Hypertens.* – 1995. – V. 13. – P. 717–722.
14. *Hata A., Namikawa C., Sasaki M. et al.* Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan // *J. Clin. Invest.* – 1994. – V. 93. – P. 1285–1287.
15. *Ye Q., Wu K., Xie L. et al.* The relationship of polymorphism of angiotensinogen and angiotensin converting enzyme with essential hypertension // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2000. – V. 17, No 1. – P. 28–31.
16. *Kunz R., Kreuz R., Beige J. et al.* Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal // *Hypertension.* – 1997. – V. 30. – P. 1331–1337.
17. *Caulfield M., Lavender P., Newell-Price J. et al.* Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans // *J. Clin. Invest.* – 1995. – V. 96. – P. 687–692.
18. *Morise T., Takeuchi Y., Takeda R.* Rapid detection and prevalence of the variants of the angiotensinogen gene in patients with essential hypertension // *J. Int. Med.* – 1995. – V. 235. – P. 175–180.
19. *Hegele R.A., Brunt J.H., Connelly P.W.* Genetic and biochemical factors associated with variation in blood pressure in a genetic isolate // *Hypertension.* – 1996. – V. 27. – P. 308–312.
20. *Hopkins P.N., Lifton R.P., Hollenberg N.K., Jeunemaitre X. et al.* Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity // *J. Hypertens.* – 1996. – V. 14. – P. 199–207.
21. *Inoue I., Nakajima T., Williams C.S., Quackenbush J., et al.* A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro // *J. Clin. Invest.* – 1997. – V. 99. – P. 1786–1797.

22. *Ishigami T., Umemura S., Tamura K., Hibi K. et al.* Essential hypertension and 5' upstream core promoter region of human angiotensinogen gene // *Hypertension.* – 1997. – V. 30. – P. 1325–1330.
23. *Mattei M.-G., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al.* Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17 // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1989. – V. 51. – P. 1041.
24. *Bohn M., Berge K.E., Bakken A., Erikssen J., Berg K.* Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction // *Clin. Genet.* – 1993. – V. 44. – P. 292–297.
25. *Cambien F., Poirier O., Lecerf L., Evans A. et al.* Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction // *Nature.* – 1992. – V. 359. – P. 641–644.
26. *Evans A.E., Poirier O., Kee F., Lecerf L. et al.* Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease // *Quart. J. Med.* – 1994. – V. 87. – P. 211–214.
27. *Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F. et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels // *J. Clin. Invest.* – 1990. – V. 86. – P. 1343–1346.
28. *Kramers C., Danilov S.M., Deinum J., Balyasnikova I.V. et al.* Point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum angiotensin-converting enzyme but no cardiovascular disease // *Circulation.* – 2001. – V. 104. – P. 1236–1240.
29. *Милосердова О.В., Сломинский П.А., Лимборская С.А.* Зависимые от возраста изменения частот аллелей и генотипов инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента // *Генетика.* – 2002. – Т. 38, № 1. – С. 105–107.
30. *Zhu X., Bouzekri N., Southam L., Cooper R.S., Adeyemo A. et al.* Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure // *Am. J. Hum. Genet.* – 2001. – V. 68. – P. 1139–1148.
31. *McKenzie C.A., Abecasis G.R., Keavney B., Forrester T. et al.* Trans-ethnic fine mapping of a quantitative trait locus for circulating angiotensin I-converting enzyme (ACE) // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – V. 10. – P. 1077–1084.
32. *Mahmood M.S., Saboohi K., Osman Ali S. et al.* Association of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene G2350A dimorphism with essential hypertension // *J. of Human Hypertension.* – 2003. – V. 17, No 10. – P. 719–723.
33. *Robinson L.J., Weremowicz S., Morton C.C., Michel T.* Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene // *Genomics.* – 1994. – V. 19. – P. 350–357.
34. *Miyamoto Y., Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N. et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene is positively associated with essential hypertension // *Hypertension.* – 1998. – V. 32. – P. 3–5.
35. *Bonnardeaux A., Nadaud S., Charru A., Jeunemaitre X. et al.* Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension // *Circulation.* – 1995. – V. 91. – P. 96–102.
36. *Hibi K., Ishigami T., Tamura K., Mizushima S.* Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene polymorphism and acute myocardial infarction // *Hypertension.* – 1998. – V. 32. – P. 521–526.
37. *Hingorani A.D., Liang C.F., Fatibene J., Lyon A. et al.* A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (glu298-asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK // *Circulation.* – 1999. – V. 100. – P. 1515–1520.

38. Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F. et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene // Nature Med. – 1996. – V. 2. – P. 41–45.
39. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 479 p.
40. Чистяков Д.А., Туракулов Р.И., Мусеев С.В. и др. Полиморфизм T174M гена ангиотензиногена связан с гипертонической болезнью в московской популяции // Молекул. биология. – 1999. – Т. 33, № 4. – С. 592–594.
41. Pavlovic M., Holl R.W., Haerberle U. et al. Angiotensin I converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms related to 24-h blood pressure in paediatric type I diabetes mellitus // Eur. J. Pediatr. – 1999. – V. 158. – P. 18–23.
42. Ishigami T., Umemura S., Tamura K., Hibi K. et al. Essential hypertension and 5' upstream core promoter region of human angiotensinogen gene // Hypertension. – 1997. – V. 30. – P. 1325–1330.
43. Perwaiz Iqbal M., Mahmood S., Mehboobali N. et al. Association study of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene G2350A dimorphism with myocardial infarction // Experimental and molecular medicine. – 2004. – V. 136, No 2. – P. 110–115.
44. Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F. et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene // Nature Med. – 1996. – V. 2. – P. 41–45.
45. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М.: Наука, 1991. – 270 с.
46. Косянкина Т.В., Еремина Е.Р., Пузырев В.П., Салюков В.Б. Полиморфизм T174M гена ангиотензиногена в сибирских популяциях // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 3. – С. 367–370.
47. Мустафина О.Е., Насибуллин Т.Р., Хуснутдинова Э.К. Связь полиморфного маркера T174M гена ангиотензиногена с эссенциальной гипертензией у русских и татар Башкортостана // Молекулярная биология. – 2002. – Т. 36, № 4. – С. 599–604.
48. Hunt S.C., Geleijnse J.M., Wu L.L. et al. Enhanced blood pressure response to mild sodium reduction in subjects with the 235t variant of the angiotensinogen gene // Am. J. Hypertens. – 1999. – V. 12, No 5. – P. 460–466.
49. Мустафина О.Е., Шагисултанова Л.И., Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А. и др. Полиморфизм 27-членных tandemных повторов гена эндотелиальной синтазы оксида азота: исследование в популяциях Волго-Уральского региона и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией у жителей Башкортостана // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 5. – С. 668–674.

Поступила в редакцию
15.06.05

Газизова Регина Гадельшовна – аспирант Казанского государственного университета.

Ибрагимова Ильдия Ильясовна – студент Казанского государственного университета.

Аскарова Альфия Наримановна – кандидат биологических наук, доцент Казанского государственного университета.

E-mail: alask@ksu.ru