

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра экологии и генетики

Заведующий кафедрой
д-р. биол. наук, профессор
И.В. Пак

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистра

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА M235T ГЕНА
AGT ЧЕЛОВЕКА

06.04.01 Биология
Магистерская программа «Экологическая генетика»

Выполнил работу
студент 2 курса
очной формы обучения

Савченко Владислав Валерьевич

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент

Трофимов Олег Владимирович

Рецензент
канд. биол. наук, доцент, доцент
кафедры анатомии и физиологии
человека и животных ФГАОУ
ВО «Тюменский
государственный университет»

Дубровский Виталий Николаевич

Тюмень
2020

РЕФЕРАТ

с. 45, рис. 8, табл. 6, библи. 50

Разработан метод определения полиморфизма M235T в гене ангиотензиногена (AGT), как маркера высокого риска развития артериальной гипертензии, с применением ПЦР-ПДРФ-анализа. Произведен дизайн праймеров для амплификации целевого участка гена AGT с помощью полимеразной цепной реакции. Установлена оптимальная температура отжига для данных праймеров – 60°C. Метод успешно испытан в ходе анализа 150 образцов геномной ДНК, выделенной из крови пациентов с артериальной гипертензией (115) и без таковой (35). Отмечено, что частота встречаемости аллеля 235T в группе больных составила 81,3%, аллеля 235M 18,7%, в контрольной группе – 85,7% и 14,3% соответственно.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, ангиотензиноген, генетические маркёры, полимеразная цепная реакция, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

A method has been developed for determining the M235T mutation in the angiotensinogen gene (AGT), as a marker of a high risk of developing hypertension, using PCR-RFLP analysis. Primers were selected for amplification of the target region of the AGT gene using polymerase chain reaction. The optimum annealing temperature for these primers is 60°C. The method was successfully tested in the analysis of 150 samples of genomic DNA isolated from the blood of patients with arterial hypertension (115) and without it (35). The incidence of the 235T allele in the patient group was 81.3 235M alleles 18.7, in the control group 85.7 and 14.3, respectively.

Keywords: arterial hypertension, angiotensinogen, genetic markers, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ: КЛАССИФИКАЦИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ФАКТОРЫ РИСКА, ДИАГНОСТИКА	8
1.2. ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА.....	14
1.3. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ.....	15
1.4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ	16
1.5. МОНОГЕННЫЙ И ПОЛИГЕННЫЙ ТИПЫ АГ	17
1.6. ПОЛНОГЕНОМНЫЙ ПОИСК АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ ВАРИАЦИЯМИ ГЕНОМА И ФЕНОТИПАМИ.....	19
1.7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА.....	20
1.8. АНГИОТЕНЗИНОГЕН.....	21
1.9. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА AGT, ЕГО СВЯЗЬ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ	22
1.10. СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА M235T И РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ НА ФОНЕ СОПУТСТВУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	23
1.11. МЕТА-АНАЛИЗ ДАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	24
1.12. ЭНДОТЕАЛЬНАЯ NO-СИНТАЗА.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ	27
2.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В 0,8% АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	28
2.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В 2% АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ	28
2.3. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ	29
2.4. РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЦР-ПРОДУКТА.....	29
2.5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
ВЫВОДЫ:.....	40

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	41
--------------------------------	----

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AGT – angiotensinogen (ангиотензиноген);
- NODAT – new-onset diabetes mellitus after transplantation;
- АГ – артериальная гипертония;
- АГР – ангиотензиновый рецептор;
- АД – артериальное давление;
- АПФ – ангиотензиногенпревращающий фермент;
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
- ГБ – гипертоническая болезнь;
- ДАД – диастолическое артериальное давление;
- ИМ – инфаркт миокарда;
- ИМТ – индекс массы тела;
- ЛВП – липопротеины высокой плотности;
- ЛЖ – левый желудочек;
- МРТ – магнитно-резонансная томография;
- ОХС – общий холестерин;
- ОЦК – объём циркулирующей крови;
- ОШ – отношение шансов.
- ПААГ – полиакриламидный гель;
- ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система;
- САД – систолическое артериальное давление;
- СМАД – суточное мониторирование артериального давления;
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания;
- ССС – сердечно - сосудистая система;
- ТГ – триглицериды;
- УЗИ – ультразвуковое исследование;
- Хс – холестерин;
- ХС – хронический стресс;

ЦНС – центральная нервная система;

ЭКГ – электрокардиография.

ВВЕДЕНИЕ

Массовое развитие сердечно-сосудистых заболеваний вообще, и артериальной гипертонии в частности, представляет немалую проблему для современного здравоохранения, сравнимую с инфекционными болезнями, но значительно опережающую их по числу жертв. Так, по имеющимся данным, системное повышение артериального давления ставит в группу риска до трети населения Земли и ведёт к крайне высокой смертности [Заболеваемость населения России..., с. 45]

Стоит заметить, что АГ одно из наиболее часто встречаемых заболеваний сердечно-сосудистой системы, что подтверждается данными ВОЗ за 2010 и 2014 годы. В России около 44% пациентов с патологией ССС страдают именно от гипертензии [World Health Organization: Global status..., 2010 p. 102; World Health Organization: Global status..., 2014 p. 12].

Таким образом, высокая распространённость и смертность ставит АГ на один уровень с такими глобальными проблемами здравоохранения как инфекционные и онкологические заболевания и это определяет необходимость к исследованию причин заболевания и разработки качественно новых диагностических методов и, следовательно, объективному мониторингу и совершенствованию схем лечения.

Цель работы:

Разработка метода определения полиморфизма M235T гена AGT человека как маркера высокого риска развития артериальной гипертензии.

Исходя из намеченной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать праймеры для амплификации целевого участка гена AGT с помощью полимеразной цепной реакции;
2. Оптимизировать условия проведения полимеразной цепной реакции с использованием данных праймеров;
3. Испытать разрабатываемым метод с использованием 150 образцов крови пациентов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ: КЛАССИФИКАЦИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, ФАКТОРЫ РИСКА, ДИАГНОСТИКА

Артериальная гипертония – системное, а равно периодическое повышение артериального давления с нижним пределом от 140/90 мм рт.ст., хотя – не строго, как в случае изолированной систолической или диастолической гипертонии. В первом случае, соответственно, происходит повышение только систолического артериального давления, а во-втором диастолического [Клинико-статистический анализ..., с. 40-44].

Стоит заметить, что артериальная гипертония далеко не всегда имеет внешние проявления, сказывающиеся на самочувствии больного. Те же симптомы, которые можно обнаружить не позволяют чётко поставить диагноз без дополнительных анализов и обследования, это могут быть и спазмы сосудов, и неврозы, и атеросклероз сосудов (нижних конечностей, мозга, сердца), а также головная боль в периоды повышения давления. Впрочем, клиническая практика показывает, что для АГ может быть характерно и бессимптомное протекание заболевания [Глезер, Глезер, с. 56].

Ранняя классификация стадий артериальной гипертонии была проведена Л.И. Фогельсоном, В.Ф. Зелениным и Г.Ф. Лангом еще в 1939 году, при этом она остаётся достаточно актуальной и до сих пор. Данная классификация приведена ниже в таблице 1.

В.Ф. Зеленин в 1945 году выделил четыре фазы болезни, а именно: транзиторную, неврогенную (лабильную), стабильную и фазу исходов (поражение органов - мишеней). Г.Ф. Ланг в 1947 году выделил две стадии ГБ – нейрогенную и нефрогенную. На первой стадии была выделена фаза транзиторных повышений артериального давления и фаза неустойчивой АГ. Затем, автор считал, что наступает переходная стадия, когда происходит нарушение органов – мишеней [Жанна, Котовская, Моисеев, с. 756].

Классификация стадий артериальной гипертензии Фогельсона-Зеленина-Ланга

Стадия	Описание
I	Эссенциальная гипертония без артериосклеротических изменений. Повышен тонус артериол
II	Признаки артериолосклероза органов без резкого нарушения их функции. Преобладающие синдромы – сердечный, почечный или мозговой
III	Изменения в артериолах внутренних органов, приводящие к резкому нарушению их функций

Разделение гипертензии на степени в зависимости от показателей артериального давления приведено ниже в таблице 2. При этом врачам предписывается проводить не менее двух последовательных измерений артериального давления, либо основываться на достоверных данных о повышении давления у пациента полученных другими врачами ранее, но с обязательной проверкой текущих показателей [Органов, с. 184].

Боли в области сердца, у больных гипертонической болезнью, часто носят функциональный характер (кардиалгии) и связаны с понижением порога восприятия афферентных импульсов, поступающих в ЦНС от интерорецепторов, расположенных в сердечной мышце, стенке аорты и т.п.

Чаще всего, боли отличаются от типичных приступов стенокардии:

- локализуются в области верхушки сердца или слева от грудины;
- возникают в покое, при эмоциональном напряжении или повышении АД;
- обычно не провоцируются физической нагрузкой;
- в некоторых случаях длятся достаточно долго (минуты, часы);
- не купируются нитроглицерином.

Классификация типов артериальной гипертензии, мм рт.ст.

Артериальное давление*	АД	
	Систолическое	Диастолическое
Оптимальное**	<120	<80
Нормальное	<130	<85
Высокое нормальное	130-139	85-89
I степень гипертонии (мягкая)	140-159	90-99
II степень гипертонии (умеренная)	160-179	100-109
III степень гипертонии (тяжелая)	≥ 180	≥ 110
Изолированная систолическая гипертония	≥ 140	<90

* - степень определяется наибольшим показателем (САД или ДАД)

** - относительно принадлежности к группе риска по развитию ССЗ

Выделяется первичная и вторичная формы гипертонии. Первичная или эссенциальная форма артериальной гипертонии в России получила название гипертоническая болезнь (ГБ), к ней относят те случаи гипертонии, при которых причина развития заболевания остаётся неизвестной, а таких случаев 90-95%, тогда как вторичной формой гипертонии чьё развитие связано с некоторыми факторами среды всего 5-10% [Органов, с. 145].

Существуют и другие классификации принятые и рекомендованные ВОЗ для оценки состояния пациентов больных АГ, они отображены на таблице 3.

Часто пациенты, страдающие гипертонической болезнью, даже не догадываются о своём заболевании, и обнаружение факта повышенного артериального давления происходит случайно, часто при прохождении диспансеризации и плановых медицинских осмотров.

Классификация артериальной гипертензии, рекомендованная ВОЗ

Стадия	Критерии
I	АД >160/95 мм рт.ст. Отсутствуют изменения органов, обусловленные АГ (гипертрофия левого желудочка, поражение сетчатки, нефросклероз)
II	АД >160/95 мм рт.ст. Есть изменения внутренних органов (сердце, почки, мозг, глазное дно), обусловленные АГ, но без нарушения их функции
III	АД >160/95 мм рт.ст. Есть изменения органов, обусловленные АГ, с нарушением их функции (сердечная недостаточность, кровоизлияния на глазном дне, отек и дегенеративные изменения диска зрительного нерва, хроническая почечная недостаточность, инсульт)

К факторам риска развития артериальной гипертензии можно отнести:

[Органов, с. 165]

1. Курение, с ним связано повреждение и нарушение функций эндотелия сосудов;
2. Потребление алкоголя, приводящее к нарушениям центральной регуляции артериального давления в связи с негативным влиянием на барорецепторы крупных сосудов;
3. Ожирение значительно повышает риск развития гипертензии в результате нарушений функций эндотелия;
4. Наследуемая предрасположенность. При наличии среди родителей больных артериальной гипертензией первого типа резко повышается риск проявления этого заболевания, особенно под воздействием других перечисленных неблагоприятных факторов;
5. Потребление поваренной соли (NaCl) в объёмах, превышающих 4,0 г в день (норма для взрослого человека) в связи с тем, что ионы натрия способствуют повышению осмотического давления, объёма циркулирующей крови и, как следствие, к потенциальному повышению артериального давления;
6. Малоподвижный образ жизни ведущий к снижению тонуса не только сердечно-сосудистой системы и мышц, но и всей кардио-респираторной системы, что приводит к ослаблению их устойчивости к нагрузкам.

7. Повышенный уровень липидов и липопротеинов в крови человека в достаточной степени способствует развитию атеросклероза и повышению артериального давления;
8. Снижение адаптивно-регуляторных возможностей организма по причине его старения, что выражено и при серьёзных и систематических общих нагрузках.

Рассматривая первичную гипертензию, стоит отметить воздействие на т.н. «органы-мишени», а именно сердце, сосуды, почки и мозг. Яркие проявления гипертонической болезни в виде поражения сосудов могут характеризоваться:

1. Проникновение белков плазмы крови в стенки сосудов, что вызывает в них дегенеративные изменения;
2. Изменение соотношения диаметра артерий мышечного типа к толщине их стенок в пользу увеличения последней, т.е. гипертрофия стенок этих артерий;
3. Нарушение кровообращения в результате развития атеросклероза крупных сосудов с образованием атеросклеротических бляшек и тромбов.
4. Как одно из следствий вышеперечисленного, микротромбозы, сужения просвета и нарушение циркуляции крови через артериолы.

Воздействие на «органы-мишени» легло в основу ещё одной классификации АГ [Жанна, Котовская, Моисеев, с. 47]:

I степень – отсутствуют выраженные поражения «органов - мишеней»;

II степень – наличие одного или нескольких изменений «органов – мишеней»: гипертрофия левого желудочка, протеинурия либо креатинимия (1,2-2 мг/дл), очаговое или генерализированное сужение артерий сетчатки, ультразвуковые или рентгеновские признаки атеросклеротической бляшки (сонные артерии, аорта, бедренные и подвздошные артерии);

III степень – присутствие выраженных симптомов поражения мозга (инсульт, энцефалопатия), сердца (инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, стенокардия), почек (почечная недостаточность) и сосудов.

Выявление факта наличия гипертонической болезни проводится поэтапно в медицинском учреждении и начинается с измерения артериального

давления в течение не менее двух приёмов врача и в двух повторностях, а в случае повышения артериального давления назначаются дополнительные тесты и исследования, включающие в себя несколько типов:

1. Обязательные:

- ЭКГ;
- общие анализы крови и мочи;
- определение содержания глюкозы в крови натощак;
- содержание сывороточных креатина, ХС, ОХС, ТГ и ЛВП;
- определения интенсивности клубочковой фильтрации.

2. Рекомендуемые:

- самоконтроль и суточный мониторинг артериального давления;
- УЗИ почек и надпочечников;
- УЗИ сердца;
- исследование глазного дна;
- рентгеноскопия органов грудной клетки;
- определение скорости пульсовой волны;
- оценка содержания белков в моче;
- тестирование на толерантность к глюкозе.

3. Углублённые:

- определение состояния сердца, крупных сосудов, почек методами МРТ и ангиографии.

Не случайно диагностика включает в себя широкое обследование сердца, именно патологические изменения в сердечной мышце часто определяют летальный исход при тяжёлых степенях гипертонии. Негативное влияние АГ на сердечную мышцу проявляется гипертрофией миокарда ЛЖ; развитием сердечной недостаточности (как левожелудочковой, так и бивентрикулярной) в случае систолической и/или диастолической дисфункции ЛЖ; признаками коронарного атеросклероза (ИБС); повышением риска внезапной сердечной смерти.

Таким образом, гипертония способна привести к сопутствующим ССЗ, например, ишемической болезни сердца, что в отсутствии адекватного лечения рано или поздно может привести к смерти больного.

Отдельно следует рассмотреть «мембранную концепцию» возникновения АГ. Она была сформулирована С.Н. Орловым и Ю.В. Постновым и заключается в том, что в результате нарушения регулирующих систем в конечном счёте происходят патобиохимические изменения в механизмах мембранного ионного транспорта, что в итоге приводит к резкому повышению концентрации ионов кальция внутри клеток мускулатуры сосудов и к чрезмерному, т.е. патологическому повышению тонуса стенок сосудов [Новицкий, Гольдберг, Уразова, с. 548].

1.2. ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА

Стоит также рассмотреть ещё одно ССЗ: ишемическую болезнь сердца (ИБС). Это связано с тем, что АГ и ИБС часто могут сопутствовать друг другу, тем более, что их патогенез во многом схож и огромную роль в нём играет атеросклероз сосудов. При совместном протекании этих заболеваний достаточно сложно отнести те или иные клинические проявления чётко к АГ или к ИБС. Ишемией миокарда называется состояние, при котором нарушается кровоснабжение сердца, когда к некоторым участкам миокарда поступает недостаточное количество крови, при этом причины могут быть схожи с гипертонией и возможно даже иметь общую этиологию [Новицкий, Гольдберг, Уразова, с. 447].

Классификация ИБС включает в себя несколько её проявлений [Горбачев, с. 274; Чазова, Жернакова, с. 6-31; Поздняков, Красницкий, с. 56]:

- внезапная коронарная смерть;
- стенокардия (стенокардия напряжения и спонтанная стенокардия);
- инфаркт миокарда;
- сердечная недостаточность (различных форм и стадий);

- постинфарктный кардиосклероз;
- нарушения сердечного ритма (аритмия).

1.3. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Одним из основных методов установления диагноза Артериальная гипертензия является СМАД. Диагностика АГ включает следующие этапы [Чазова, Жернакова, с. 6-31]:

- выяснение жалоб и сбор анамнеза;
- повторные измерения АД;
- объективное обследование;
- лабораторно-инструментальные методы исследования: рутинные на первом этапе и сложные — на втором этапе обследования (по показаниям);
- исключение вторичных (симптоматических) АГ при необходимости;
- оценка общего сердечно-сосудистого риска.

При всем этом необходимо учитывать возможность развития симптоматической кратковременной АГ, к примеру, при наличии нетипичных клинических проявлений или необычным данным анамнеза. К таким относится развитие АГ у детей и лиц до 40 лет, синдром обструктивного апноэ сна. Диагностика осложняется тем, что многие симптомы АГ: одышка, головная боль, боль в груди, потливость, кровотечение из носа, отёки не являются симптомами только лишь АГ, а могут указывать на широкий спектр других заболеваний, как соматических, так и некоторых инфекционных. Диагностика АГ делится на инструментальную и лабораторную. Инструментальная диагностика включает в себя ЭКГ, УЗИ, измерение давления. Лабораторная диагностика проводится с целью исключить вторичную гипертензию и подразумевает проведения общего анализа крови (гемоглобин, гематокрит, лейкоциты, тромбоциты), общего анализа мочи, уровня креатинина, расчёт

скорости клубочковой фильтрации, определения уровня глюкозы в крови, всё это также позволяет определить степень сердечно-сосудистого риска.

Лечение АГ предусматривает применение методов медикаментозной и немедикаментозной терапии. Немедикаментозная терапия предполагает стабилизацию АД и уменьшение сердечно-сосудистого риска за счёт изменения образа жизни, снижения потребления соли до менее чем 5 гр в сутки, необходимо и снижение потребления мяса, регулярные физические нагрузки. Медикаментозная терапия заключается в блокировании ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, как системы, отвечающей за повышение АД. Используются препараты ингибирующие ангиотензин превращающий фермент, блокаторы рецепторов ангиотензина-II, блокаторы кальциевых каналов, бета-адреноблокаторы, диуретики. Обычно назначаются сразу два лекарственных средства, блокирующих ренин-ангиотензин-альдостероновую систему [Чазова, Жернакова, с. 6-31].

1.4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

В целях определения маркёров артериальной гипертонии возможно использование нескольких методик или скорее стратегий поиска [Timberlake, O'Connor, Parmer, p. 71-79]:

1. Полногеномный поиск ассоциаций между вариациями генома и фенотипами;
2. Сравнительная геномика;
3. Метод промежуточных фенотипов;
4. Метод генов-кандидатов.

Более подробно о вышеперечисленных методах будет рассказано ниже.

Другие используемые методы, это:

- 1) Анализ групп сцепления;
- 2) Метод совпадающих аллелей;
- 3) Ассоциативный анализ;
- 4) Исследования с использованием моделей животных;

5) Титрования генов.

Последний метод во многом синтетический, т.к. с помощью него изучается влияние изменения экспрессии отдельных генов на фенотип, он позволяет разделить гены, регулирующие артериального давления на три типа [Takahashi, O. Smithies, p. 1598-1605; A metaanalysis of genome-wide..., p. 144-147; E.S. Lander, Schork, p. 2037-2048]:

- ген или гены, изменение уровня экспрессии которых непосредственно приводит к изменению артериального давления;
- гены, изменение функционирования которых приводит к артериальной гипертензии только в случае изменения какого-то фактора окружающей среды;
- гены, напрямую не влияющие на снижение или повышение кровяного давления, но входящие в более крупные регулирующие системы, которые, в свою очередь, способны влиять на показатели артериального давления.

1.5. МОНОГЕННЫЙ И ПОЛИГЕННЫЙ ТИПЫ АГ

В соответствии с современными данными, можно выделить несколько типов артериальной гипертензии, а именно моногенную и полигенную. Моногенная артериальная гипертензия означает, что нарушения в показателях артериального давления вызвано мутацией в каком-то одном гене, при этом гипертензия может быть не единственным и даже не основным проявлением неработоспособности продукта экспрессии гена или нарушения его регуляторных функций. В качестве примера возможно привести синдром Лиддла, аутосомно-доминантного типа наследования при котором мутация затрагивает α – субъединицы эпителиальных натриевых каналов, что приводит к усиленной резорбции натрия в кровь [Liddle's syndrome: heritable human..., p. 407-414].

Второй тип артериальной гипертензии определяется несколькими генами, как например в случае Ренин-ангиотензин-альдостероновой системой. Наиболее тесно связан с АГ ген AGT [Molecular basis of human..., p.169-180],

при этом правда есть данные, что это характерно в большей степени для европеоидов, нежели для других рас [M235T angiotensinogen gene..., p. 9-17]. Обнаружено, что ассоциируется с гипертонией M235T полиморфизм с заменого метионина на треонин в позиции 235. Так как данная работа посвящена именно полиморфизму M235T, то более подробно о нём будет сказано ниже [Association between the angiotensinogen..., p. 1331-1337].

В различных работах были исследованы и другие полиморфизмы генов, связанные с развитием артериальной гипертонии:

- G83A полиморфизм гена ренина;
- I/D полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента;
- A1166C полиморфизм гена АГР II 1-го типа (AGTR1);
- A3123C полиморфизм гена АГР II 2-го типа;
- T58C и I/D полиморфизм гена рецептора брадикинина 2 (BKR2).

В результате исследований, в которых участвовали дети, чьи ближайшие родственники страдали АГ достоверно было выявлено, что по отношению к контрольной группе у них повышена частота встречаемости аллеля D полиморфизма I/D гена рецептора брадикардина 2 (BKR2). Определена и зависимость полиморфизма A1166C гена рецептора ангиотензина II 1-го типа. [Сафроненко, с. 67-76].

Стоит упомянуть и об исследованиях на установление ассоциации гена eNOS (эндотелиальной NO – синтазы), находящегося в 7q35-36 хромосоме и содержащего 26 экзонов с развитием АГ, а именно полиморфизма T-786C его промотора, а также вариантов 4a/b и G894T [Endothelial nitric oxide..., p. 136-139].

Ещё один ген, полиморфизм которого был выбран как кандидат на ассоциирование с ГБ, это ген эндотелина EN-1. Эндотелин –полипептид из 21 аминокислотного остатка (предшественник – проэндотелин из 38), который ответственен за регуляцию гемостаза и вазоконстрикции. В первом случае, он обеспечивает агрегацию белых кровяных пластинок с образованием красного тромба, а во втором - за сокращение и рост гладкомышечной мускулатуры

стенок сосудов и изменение их диаметра в сторону уменьшения. В гене эндотелина-1 обнаружен полиморфизм K198N (G/T), который возможно связан с риском развития ГБ [31]. Исследования концентрации этого полипептида у больных экзенциальной формой гипертонии показало его повышенное содержание в плазме крови относительно нормы [Jin, Nakura, p. 163-167; Enhanced expression of endothelin-1..., p. 57-63; Increased basal concentrations..., p. 1069-1074]. Исследования показали, что у гомозигот TT и гетерозигот GT систолическое и диастолическое давление несколько выше нежели у гомозигот с GG, хотя это достоверно выражено только при сравнении выборок, состоящих из индивидов с лишним весом или ожирением.

Более подробно об исследованиях ассоциации полиморфизмов генов eNOSи ET-1, как об одних из главных факторов развития АГ первого типа, наряду с M235T полиморфизмом гена ангиотензиногена, будет также рассказано ниже.

1.6. ПОЛНОГЕНОМНЫЙ ПОИСК АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ ВАРИАЦИЯМИ ГЕНОМА И ФЕНОТИПАМИ

Метод полногеномного поиска ассоциаций предполагает, что сравнивается сразу огромное число различных генов, что позволяет отойти от точечного анализа и выявить закономерности в контексте целостного взаимодействия всех элементов ответственных за функционирование организма. С помощью этого подхода удалось предположить наличие локуса на 11q хромосоме связанного с АГ [Timberlake, O'Conner, Parmer, p. 71-79], а также сделать вывод о связи гена SLC4A5 с этим заболеванием [A genome-wide scan..., p. 1291-1296]. Вероятно, имеется связь регуляции ДАД и в меньшей степени САД с хромосомным регионом 2q31-34 [Family Blood Pressure, p. 477-482; QTL influencing blood..., p. 2810-2816], во второй же хромосоме был определён, как вероятно ассоциированный с АГ участок 2q11 [Genome scan among..., p. 626-633]. Однако, такой подход не всегда позволяет определить

какие-то конкретные маркеры высокого риска, которые в дальнейшем возможно было бы использовать как диагностические. Тем ни менее, метод позволяет обозначить границы для дальнейшего поиска.

1.7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

Сравнительная геномика позволяет, на основе исследований генома животных, сделать вывод об аналогичных процессах в организме человека, к примеру, было выяснено, что участок 10 хромосомы крысы, отвечающий за кровяное давление гомологичен к области 17 хромосомы человека, содержащей ген ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), были обнаружены соответствующие маркёры D17S183 и D17S934, прочно ассоциированные с АГ [Genetic susceptibility..., p. 2077-2085].

Промежуточные фенотип предполагает развитие у индивида артериальной гипертонии в лёгкой форме, либо наличие лишь отдельных проявлений свойственных для заболевания и представляющих собой отдельные изменения и нарушения в биохимических процессах, как например нарушение синтеза альдостерона, что влияет на концентрацию ионов натрия в крови [Non-modulation as an intermediate..., p. 788-796]. Данные, полученные с помощью этого метода послужили основой для определения зависимости развития артериальной гипертонии от M235T полиморфизма гена AGT (кодирующего ангиотензиноген) [Blunted renal vascular..., p.199-207].

Наконец, поиск генов-кандидатов означает, что ген или набор генов, связанных с определёнными физиологическими или клеточными функциями, способствуют, в зависимости от конкретного аллеля, изменению артериального давления в ту или иную сторону. Для эссенциальной гипертонии известно по крайней мере 51 locus, которые влияют на различные психофизиологические и биохимические системы [Non-modulation as an intermediate..., p. 788-796]. Самый простой подход при этой стратегии предполагает выбор группы генов, в совокупности ответственных за контроль процессов повышения и понижения

артериального давления и сравнение их нуклеотидных последовательностей у индивидов опытной и контрольной групп, но при этом ранее существовали ограничения связанные с большим количеством этих генов и несовершенством методов секвенирования [Tanira, Balushi, p. 786-795]. Однако, в последнее время развитие этих методов позволило без значительных затрат и с высокой точностью определять нуклеотидную последовательность интересующих генов-кандидатов и проводить сравнительные исследования на наличие различных полиморфных участков этих генов и связи между ними и повышенным риском развития ССЗ и артериальной гипертензии в частности. Секвенирование – это метод определения последовательности нуклеотидов или аминокислот в различных биополимерах, сама идея, как и первый описанный метод (метод обрыва цепи), принадлежит Фредерику Сенгеру (1977), при этом за последние 10 лет появились и другие методы, менее трудоёмкие и дорогие.

1.8. АНГИОТЕНЗИНОГЕН

Ангиотензиноген – альфа-глобулин, предшественник гормона Ангиотензина II входящего в Ренин-ангиотензин-альдостероновую систему. Ангиотензиноген состоит из 453 аминокислотных остатков, при этом собственной активностью не обладает. Превращение ангиотензиногена в ангиотензин начинается с падения давления на юкстагломерулярные клетки, располагающихся в стенках артериол, составляющих почечные клубочки, которые выделяют специальный протеолитический фермент - ренин в кровоток. В результате воздействия ренина на ангиотензиноген образуется ангиотензин I – неактивный промежуточный предшественник ангиотензина II представляющий собой декапептид (т.е. пептидную цепь из десяти аминокислот). Следующим этапом становится модификация ангиотензина I до состояния активной формы гормона, это происходит под действием ангиотензинпревращающего фермента – дипептидкарбоксилазы, пептидная цепь ангиотензина II содержит лишь восемь аминокислотных остатков.

Активная форма гормона индуцирует через АП-рецепторы усиленную выработку одного из основных гормонов надпочечников – альдостерона, который, являясь единственным минералокортикостероидным гормоном, который выбрасывается в кровь, регулирует синтез белков ионного транспорта, повышает реабсорбцию натрия в почках и тем самым, будучи компонентом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы оказывает влияние на гемодинамику и через изменение концентрации ионов на показатели АД.

Помимо сильного вазоконстрикторного действия, Ангиотензин II способен оказывать прямое действие на постганглионарные симпатические нервные волокна, что увеличивает потенциал выработки норадреналина, что в свою очередь оказывает дополнительное воздействие в том числе и на кардио-респираторную систему при развитии стресса.

1.9. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА AGT, ЕГО СВЯЗЬ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Анализируя полиморфизм гена AGT пришли к выводу, что замена аминокислот в связи с мутацией во втором экзоне этого гена приводит к повышению концентрации ангиотензиногена и вероятно повышает риск развития гипертонической болезни [Molecular basis of human..., p. 169-180]. Проведённые позже мета-генетические исследования подтвердили связь M235T полиморфизма гена с развитием гипертонической болезни(21,34,35,36). При этом и другие разновидности гена, такие как A-20C и A-6G способны по некоторым данным повлиять на его экспрессию и также определить высокую вероятность развития первичной АГ [M235T angiotensinogen gene..., p. 9-17]. Достаточно широкие исследования проводились в Китае, где в отдельных группах людей наблюдалась очень высокая заболеваемость (16,8%) артериальной гипертензией, достаточная изолированность и слабоэффективное лечение [Сафроненко, с. 67-76].

Однако, стоит понимать, что полиморфизм M235T не единственный фактор риска, кроме него известны и иные точечные мутации в гене AGT, с которыми ассоциировано развитие артериальной гипертензии первого типа. В частности, известен полиморфизм T174M [Evaluation of Angiotensinogen..., p. 137-143], T207M (C521T), M268T (T702C) последние расположены во втором экзоне первой хромосомы, связанной с развитием ишемической болезни и артериальной гипертензией первого типа [Implication of an AGT..., p. 71-78; The role of genetic, p. 23-30]. Для определения наличия мутантных аллелей в клинических образцах могут быть применены и готовые тест системы, например РеалБест-Генетика AGT C521T/AGTR1 A1166C для определения наличия полиморфизма T207M (C521T) компании Вектор-Бест (город Новосибирск).

1.10. СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА M235T И РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ НА ФОНЕ СОПУТСТВУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Исследования показали, что наличие полиморфизма M235T ангиотензиногена не только прочно связано с риском развития АГ первого типа, но и значительно повышает риск развития преэклампсии – осложнением при беременности, которое характеризуется значительным повышением кровяного давления, повышением сопротивляемости сосудов, отёками и протеинурией в период второго и третьего триместров [Angiotensinogen gene M235T..., p. 383-388].

Другим заболеванием, в отношении которого удалось установить связь с полиморфизмом M235T гена ангиотензиногена, является т.н. новый диабет (NODAT) в период после трансплантации печени, кроме этого, к факторам риска относят и аллель T полиморфизма T174M, в ходе исследования было выявлено, что являясь независимыми факторами риска, они значительно повышали вероятность развития NODAT [Evaluation of Angiotensinogen..., p. 137-143]. Показано также, что рецессивный вариант полиморфизма M235T

способствует повышению риска развития диабетической нефропатии [Associations between angiotensinogen ..., p. 26-36].

1.11. МЕТА-АНАЛИЗ ДАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Несмотря на то, что полиморфизм M235T и его связь с развитием артериальной гипертензии наиболее известны, существует несколько исследований, показывающих не только положительную [Case-control association study..., p. 63-69; Association of renin-angiotensin..., p. 267-274], но и отрицательную корреляцию [Association of angiotensinogen..., 235-239]. Кроме того, многие исследования ограничиваются лишь населением Восточной Азии [M235T polymorphism..., p. 222-232]. В результате крупных статистических исследований была доказана общая корреляция наличия рецессивного аллеля и, в меньшей степени, гетерозиготного варианта с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. При этом наблюдалось расхождение среди различных этнических групп, в европейской и азиатской группе значение рецессивного и гетерозиготного вариантов в развитии АГ было выше, нежели у кавказской группы [Association of angiotensinogen..., 235-239]. В связи с этим, возникает необходимость дальнейших исследований, которые позволят провести анализ частоты встречаемости полиморфизма и его связи с развитием АГ в других этнических и географически разобщённых группах.

Различия наблюдались для всех исследуемых популяций. Также было обнаружено, что M235T ассоциирован с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, рецессивный аллель в сравнении с доминантным, имел отношение шансов 1,16 при 95% доверительном интервале от 1,05 до 1,27 и $P < 0,001$, рецессивные гомозиготы против гетерозигот и доминантных гомозигот имели отношение шансов 1,14 при 95% доверительном интервале от 1,06 до 1,23 и $P < 0,001$. Разделение по этническому признаку показало, что для народов Кавказа не выявлено никаких ассоциаций вариантов полиморфизма M235T с развитием ССЗ. При этом, у восточно-азиатской

группы полиморфизм был достоверно связан с риском развития АГ отношением шансов 1,46 при 95% доверительном интервале от 1,13 до 1,90 при $P < 0,001$, между гомозиготных рецессивных и доминантных аллелей отношение шансов 1,78, у рецессивных гомозигот, гетерозигот и доминантных гомозигот - 1,47, у рецессивных гомозигот против гетерозигот и доминантных гомозигот - 1,68 [M235T polymorphism..., p. 222-232]. Вместе с тем приведённые выше аналитические исследования не включают в себя данные, которые могли бы указывать на какое либо взаимодействие полиморфизма M235T гена ангиотензиногена с вариантами других генов, являющимися маркерами развития ССЗ.

1.12. ЭНДОТЕАЛЬНАЯ NO-СИНТАЗА

В сосудистой эндотелии NO, мощное короткоживущее вазоактивное вещество, постоянно образуется из L-аргинина ферментом эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) 1 [NO at work., p. 919-925]. NO играет ключевую роль в расслаблении гладких мышц сосудов, ингибирует адгезию тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, уменьшает миграцию и пролиферацию клеток гладких мышц сосудов и ограничивает окисление атерогенных липопротеинов низкой плотности [Xiaoqing, p. 160-170]. Более того, было показано, что ингибирование eNOS ускоряет атеросклероз на животных моделях и что аномалии эндотелиального пути NO присутствуют у людей с атеросклерозом (38) (39).

Таким образом, как и в случае с полиморфизмом M235T гена AGT, была установлена связь некоторых полиморфизмов в гене eNOS с повышением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [Endothelin-1 gene variant associates..., p. 1321-1324].

Эндотелин-1 (ЕТ-1) - мощный вазоконстрикторный пептид, вырабатываемый эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Многие статистические исследования свидетельствуют о том, что ген ЕТ-1 является геном-кандидатом, полиморфизм которого ассоциирован с развитием

гипертонии. Более того, недавние исследования ассоциации показали, что полиморфизм G / T с аминокислотной заменой (Lys / Asn) в кодоне 198 экзона 5 гена ET-1 связан с увеличенным индексом массы тела (ИМТ) как и с повышенным кровяным давлением. Они предположили, что T-носители более чувствительны к увеличению веса, чем гомозиготы GG в связи с кровяным давлением [Association of Endothelin-1..., p. 163-167]. Однако, популяционно-генетические исследования с определением частот встречаемости и ассоциативности различных полиморфизмов часто невоспроизводимы, и ранние исследования часто указывают на более яркую ассоциацию, чем обнаруживается в последующих исследованиях. Вместе с тем, новые исследования показывают положительную корреляцию, с проведенными ранее.

Кроме того, в соответствии с предыдущими сообщениями, новые исследования выявило значительную положительную связь между полиморфизмом ET-1 K198N (G / T) и индекса массы тела с развитием артериальной гипертонии, по крайней мере, в азиатской популяции ($P = 0,027$). Взаимосвязь была значимой даже после поправки на пол и возраст ($P = 0,045$) гомо- и гетерозиготы по рецессивному аллелю (T) были более подвержены развитию АГ на фоне высокого индекса массы тела, чем гомозиготы GG. Учитывая совокупное влияние ожирения и гипертонии на развитие сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

В качестве подготовительного этапа проводилось выделение генетического материала, в качестве которого использовалась геномная ДНК. Выделение геномной ДНК проводилось из цельной крови по описанной ниже методике щелочного лизиса в присутствии мягкого детергента TritonX-100.

Разрушение мембраны клеток при помощи Лизирующего раствора №1, включающего в себя: 1% детергента TritonX-100, 320мМ сахарозы, 5 мМ буфера Tris-HCl pH=8, 8мМ EDTA pH=8, 5 мМ MgCl₂, воду. К 200 мкл цельной крови добавляли 1200 мкл раствора и перемешивали, после чего инкубировали 1,5 часа при 0С. Так как Triton X-100 является относительно слабым детергентом при разрушении клеточной мембраны ядро остаётся целым, что позволяет избавиться от внеядерной ДНК.

Ядра осаждались центрифугированием при 3500 оборотах в минуту, супернатант удаляли. Разрушение ядерной мембраны. Ядерную мембрану разрушали Лизирующим раствором №2: 25 мМ EDTA, 75мМ NaCl, 1% SDS и вода. Осадок суспензировали в 178 мкл лизирующего раствора, а для разрушения белков добавляли 2 мкл Протеиназы К (до концентрации 50 нг/мкл). Инкубировали в течение ночи при 37С.

С целью проведения фенольной депротеинизации ДНК добавляли 20 мкл 4М раствора NaCl (для последующего спиртового осаждения). Для удаления белков и различных полипептидов из раствора ДНК к нему добавляли равный объём фенола (180 мкл) насыщенного буфером T10E1 pH=8 и интенсивно перемешивали, фракции разделяли на центрифуге в течение 5 минут при 14000 оборотах в минуту, водную фазу, очищенную от белков, переносили в новую пробирку. Для дополнительной очистки использовали хлороформ, его равный объём добавляли к уже очищенной фенолом водной фазе, перемешивали,

центрифугировали 5 минут при 14000 оборотах, раствор ДНК переносили в новую пробирку.

Для проведения спиртового осаждения ДНК к образцу добавляли 540 мкл (3 объёма) 95% этанола перемешивали, инкубировали ночь при температуре - 20°C, центрифугировали 10 минут при 14000 оборотов в минуту, супернатант удаляли. Вымывание ионов соли проводили 70% этанолом (500 мкл), вновь центрифугировали при 14000 оборотов в минуту 10 минут, жидкость удаляли, а осадок высушивали на воздухе и растворяли в 40 мкл буфера T10E1 pH=8.

2.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В 0,8% АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Оценку результатов выделения ДНК проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Гель - 0,8% агароза в виде горизонтальных пластин в буфере TBE (89мМ бората, 89 мМ трис, 2мМ ЭДТА – pH 8,0 при 22°C). Однократный буфер для нанесения образцов содержал 10% глицерин, 0,005% бромфенолового синего, 0,005% ксиленцианола. Визуализацию геномной ДНК проводили при помощи интрколирующего красителя – бромистого этидия в концентрации 2 мкг/мл.

2.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В 2% АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез в 2% агарозном геле, как и в полиакриламидном позволяет разделить и визуализировать фрагменты нуклеиновых кислот длиной до 500 пар нуклеотидов. Гель - 2% агароза в виде горизонтальных пластин в буфере TAE (2М трис, 0,05М ЭДТА, 1,56М уксусная кислота (ледяная) – pH 7,6 при 22°C). Однократный буфер для нанесения образцов содержал 10% глицерин, 0,005% бромфенолового синего, 0,005% ксиленцианола. Визуализацию геномной ДНК проводили при помощи интерколирующего красителя – бромистого этидия в концентрации 2 мкг/мл.

2.3. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Реакционная смесь готовилась исходя из следующих конечных концентраций: однократный буфер для Taq-полимеразы, MgCl₂ - мкМ, смесь нуклеотидов – 0,8 мкМ, праймеры – 0,5 мкМ, Taq-полимераза – 0,05 ед/мкл. Соотношение компонентов реакционной смеси к количеству образца 19 к 1. Образец в целях отработки методики разводился в 1000 или 500 раз, после отработки условий проведения ПЦР образец не разводился. Режимы ПЦР также варьировались в части температуры отжига праймеров и продолжительности этапа отжига от 50 до 61 градусов. Это было сделано с целью определения оптимального режима постановки ПЦР и получения интерпретируемых результатов. Окончательный режим ПЦР включал в себя отжиг праймеров 60 градусов. Для снижения числа продуктов неспецифического отжига в реакционную смесь добавлялся энхансер – диметилсульфоксид в объеме 5% от конечного объема реакционной смеси.

2.4. РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЦР-ПРОДУКТА

Рестрикционный анализ на наличие точечных мутаций в гене ангиотензиногена проводили с помощью рестриктазы SfaNI. Для этого готовилась смесь с конечной концентрацией рестриктазы- 10 ед/мкл, однократным рестрикционным буфером и образцом. Инкубировали в течении двух часов при температуре 37С. Конечный анализ полученных данных проводили с помощью метода электрофореза в 8% полиакриламидном геле, либо в 2% агарозном геле.

2.5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез в полиакриламидном геле позволяет разделить и визуализировать фрагменты нуклеиновых кислот длиной до 500 пар

нуклеотидов. Гель – 40% смесь акриламида и метилен-бис-акриламида в соотношении 1 к 19 и в количестве на 10 мл 2 мл, 5 мл 20 мМ глицерина, насыщенного ЭДТА, 1,89 мл воды, 100 мкл PSA, 10 мкл Timed в вертикальных пластинках, расположенных в однократном буфере TBE (исходно - 89мМ бората, 89мМ трис, 2мМ ЭДТА – рН 8,0 при 22°C). Однократный буфер для нанесения образцов содержал 10% глицерин, 0,005% бромфенолового синего, 0,005% ксиленианола. Визуализацию ДНК проводили при помощи системы гель-документации, гель предварительно помещали на 5 мин. в раствор интерколирующего красителя – бромистого этидия в концентрации 2 мкг/мл.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных данных известно, что одним из наиболее перспективных маркеров высокого риска развития артериальной гипертензии, является мутация в гене ангиотензиногена, приводящая к замене треонина на метионин в 235-м положении кодируемой полипептидной цепи (M235T). По сообщениям ряда авторов, полиморфизм M235T приводит к повышению активности ангиотензиногена плазмы крови, что, в свою очередь, увеличивает содержание ангиотензина II и, как следствие, повышает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Основная идея работы заключается в выявлении полиморфизма указанного гена с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа (рис. 1) у группы больных артериальной гипертонией и без таковой и проведение статистического анализа частот встречаемости аллелей и генотипов. При этом амплифицируется полиморфный участок гена в полимеразной цепной реакции, после чего ПЦР-продукт обрабатывается эндонуклеазой рестрикции SfaNI.

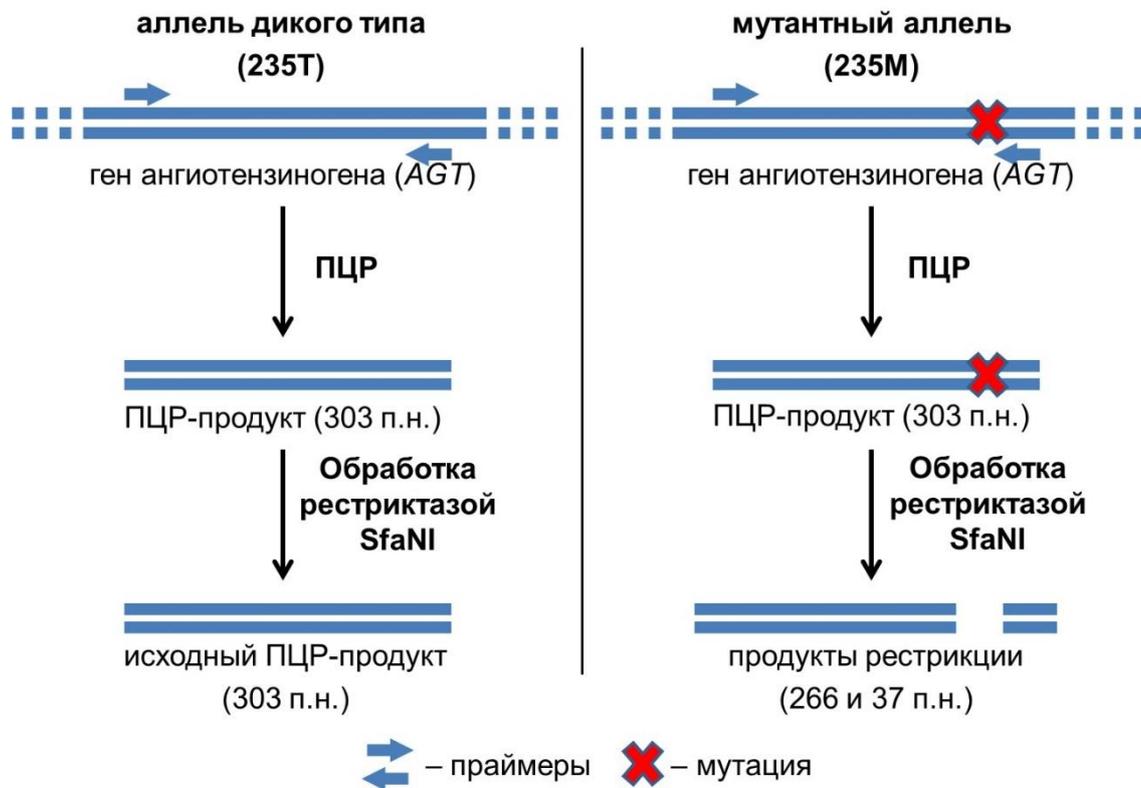


Рис. 1. Схема выявления полиморфизма M235T гена *AGT*

Нуклеотидная последовательность аллеля дикого типа (варианта 235Т) не содержит сайта узнавания данной рестриктазы и ПЦР-продукт расщепляться не будет. Однако, наличие мутации (в варианте 235М) приведет к гидролизу ПЦР-продукта с образованием двух рестрикционных фрагментов ДНК длиной 266 и 37 пар нуклеотидов.

Дизайн праймеров для амплификации целевого участка гена *AGT* проводили с использованием программы VectorNTI. На рисунке 2 представлена нуклеотидная последовательность кодирующей цепи 2-го экзона данного гена и схема расположения основных элементов, необходимых для выявления полиморфизма с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа. Данные, позволяющие определить полиморфный участок для последующего проведения дизайна праймеров, проведения полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа были взяты из открытой базы данных NCBI GenBank.

```

1  cctttgcaaa  atgatatttc  agggtatgca  gaagcgagca  ccccagtcctg  agatggctcc
61  tgccggtgtg  agcctgaggg  ccaccatcct  ctgcctcctg  gcctgggctg  gcttggctgc
121 aggtgaccgg  gtgtacatac  accccttcca  cctcgtcatc  cacaatgaga  gtaccctgtga
181 gcagctggca  aaggccaatg  ccgggaagcc  caaagacccc  accttcatac  ctgctccaat
241 tcaggccaag  acatcccctg  tggatgaaaa  ggcctacag  gaccagctgg  tgctagtgcg
301 tgcaaaaactt  gacaccgaaq  acaagttgag  ggccgcaatg  gtcgggatgc  tggccaactt
361 cttgggcttc  cgtatatatg  gcatgcacag  tgagctatgg  ggcgtggtcc  atggggccac
421 cgtcctctcc  ccaacggctg  tctttggcac  cctggcctct  ctctatctgg  gaggccttggg
481 ccacacagct  gacaggctac  aggcaatcct  ggggtttcct  tggaaaggaca  agaactgcac
541 ctcccggctg  gatgcgcaca  aggtcctatc  tgccctgcaq  gctgtacagg  gcctgctagt
601 ggcccagggc  agggctgata  gccaggccca  gctgctgctg  tccacggtag  tgggctgatt
661 cacagcccca  ggccctgcacc  tgaagcagcc  gtttgtagca  ggccctggctc  tctatacccc
721 tgtggtcctc  ccacgctctc  tggacttcac  agaactggat  gttgctgctg  agaagattga
781 caggttcatg  caggctgtga  caggatggaa  gactggctgc  tcctga  gg  gagccagtgt
841 ggacagcacc  ctggctttca  acacctacgt  ccacttcaa  ggtaaaggcaa  acctctctgc
901  t

```

gatgcgcacaaggtcctg – участок, гомологичный прямому праймеру;

gggagccagtgtagcagca – участок, комплементарный обратному праймеру;

█ – мутантный нуклеотид (в последовательности дикого типа представлен █);

ga^{gg} – сайт узнавания рестриктазы SfaNI;

tg – сайт гидролиза ДНК рестриктазой SfaNI.

Рис. 2. Дизайн праймеров для амплификации целевого участка гена *AGT*.

Показана нуклеотидная последовательность кодирующей цепи 2-го экзона в направлении 5'→3' (по данным GenBank)

Участок отжига обратного праймера располагался в непосредственной близости от мутантного нуклеотида и частично включал в себя сайт узнавания рестриктазы SfaNI. Сайт гидролиза ДНК данной рестриктазой отстоял на 7 нуклеотидов от сайта узнавания. Нуклеотидные последовательности были подобраны с учетом всех требований, предъявляемых к праймерам.

Для проведения ПЦР из образцов цельной крови пациентов, больных артериальной гипертензией, а так же здоровых людей выделяли хромосомную ДНК. Подтверждение эффективности выбранного метода выделения ДНК и определения необходимости повторного выделения проходило при помощи анализа полученных препаратов методом электрофореза в 0,8% агарозном геле. Пример электрофореграммы представлен на рисунке 3.

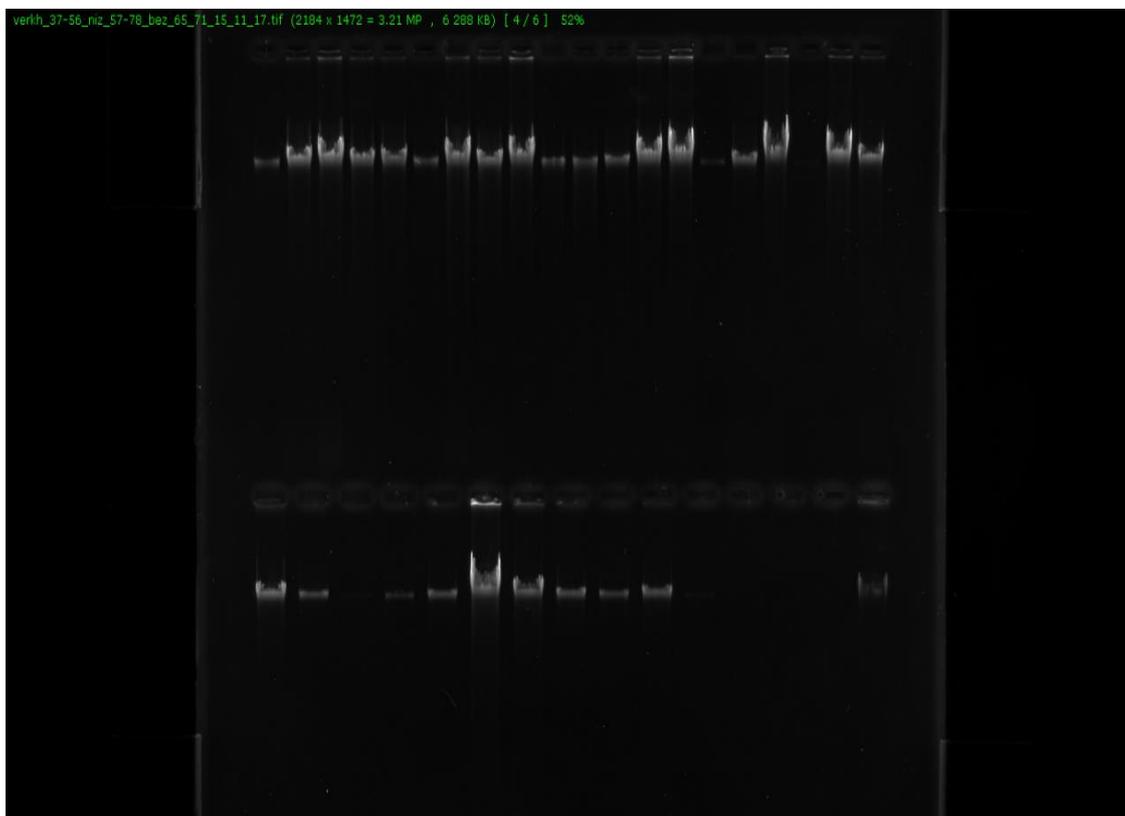


Рис. 3. Препараты хромосомной ДНК, выделенной из крови пациентов, больных артериальной гипертензией.

Электрофорез в 0,8% агарозном геле. Окрашено бромистым этидием.

Для части образцов было проведено дополнительное выделение ДНК. Всего было получено более 200 препаратов хромосомной ДНК, от пациентов с артериальной гипертензией.

Следующим этапом разработки метода стала оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции, в частности, такого ключевого параметра, как температура отжига праймеров. Для этого в реакционные смеси в качестве матрицы добавляли хромосомную ДНК, полученную ранее от одного и того же пациента. Режим проведения ПЦР представлен в таблице 4. Температура отжига праймеров варьировала в диапазоне от 50 до 64°C. Остальные параметры амплификации были фиксированными. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле (рис. 4).

Таблица 4

Режим проведения ПЦР

Стадия цикла	Температура, °С	Время, сек.	Число циклов
Денатурация матрицы	94	60	40
Отжиг праймеров	градиент от 50 до 64	30	
Полимеризация	72	60	

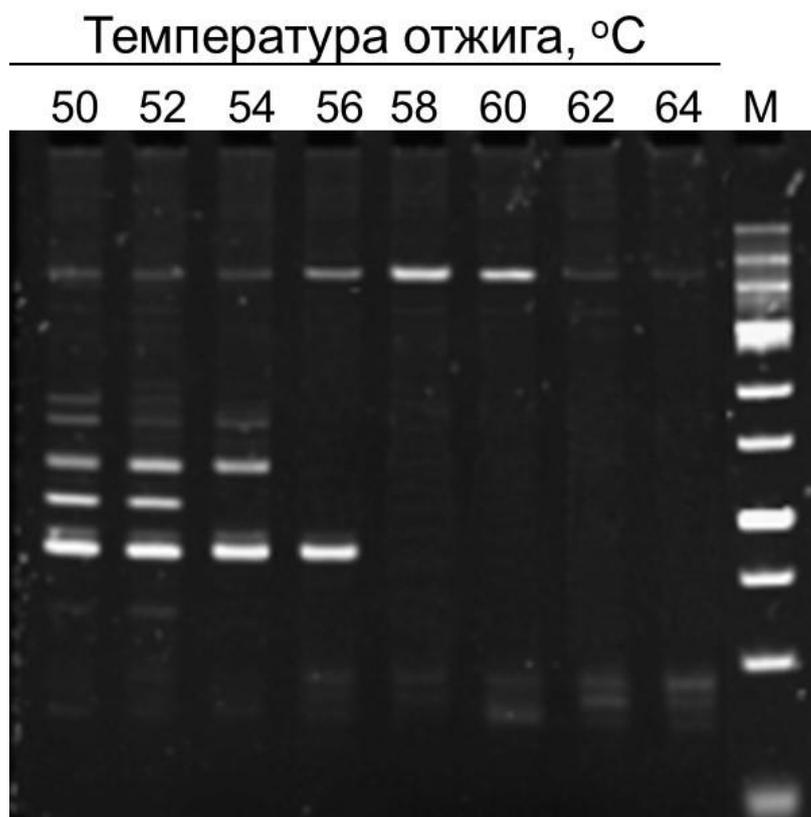


Рис. 4. Продукты ПЦР, полученные при различной температуре отжига праймеров.

М – маркер молекулярной массы (GeneRuler Low Range). Электрофорез в 8% ПААГ. Окрашено бромистым этидием.

Для снижения количества неспецифических продуктов реакции в реакционную смесь добавляли энхансер–диметилсульфоксид, который специфически связывает одноцепочечные молекулы ДНК (праймеры) препятствуя взаимному отжигу праймеров между собой. С повышением температуры отжига наблюдали снижение количества продуктов неспецифического синтеза вплоть до практически полного их отсутствия при температуре отжига 58°C и выше. При этом также отмечали некоторое увеличение выхода целевого продукта ПЦР. Однако, при температуре выше 60°C эффективность специфического синтеза вновь снижалась. Таким образом, оптимальная температура отжига для данных праймеров составила 60°C.

Для дальнейшей работы необходимо провести амплификацию выделенных образцов с использованием отработанных режимов ПЦР. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле (рис. 5).

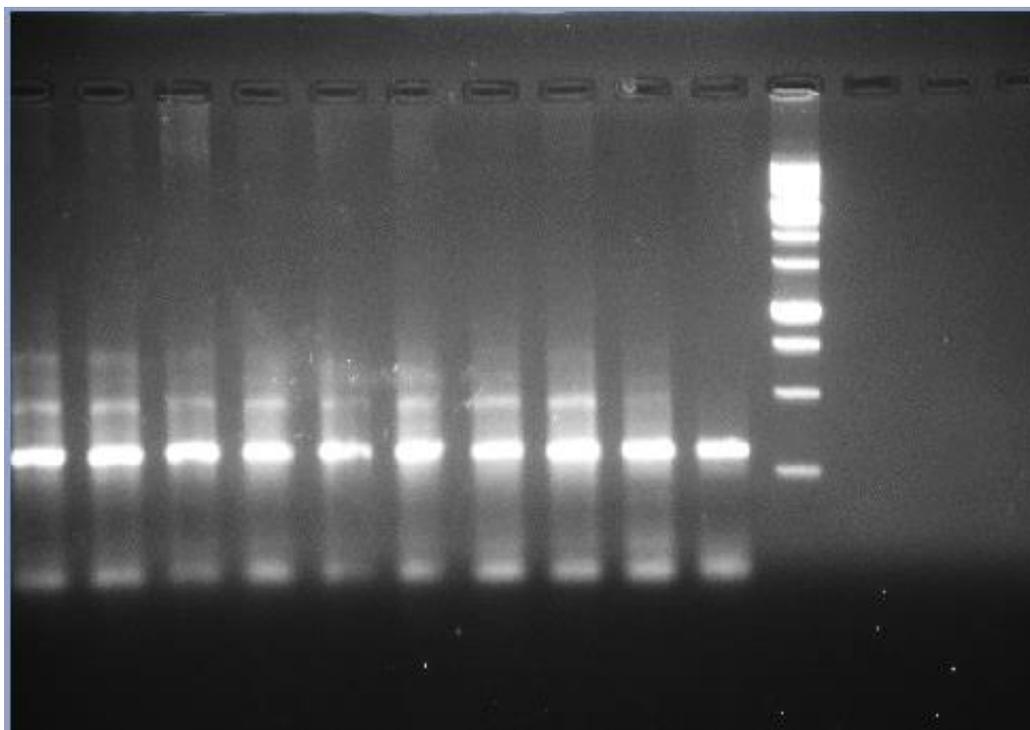


Рис.5. Продукты ПЦР

Электрофорез в 2% агарозном геле. Окрашено бромистым этидием.

На дальнейшем этапе работ необходимо было провести рестрикционный анализ, используя амплифицированные фрагменты ДНК. Для этого продукт ПЦР, полученный с хромосомной ДНК 150 пациентов подвергали обработке рестриктазой SfaNI, рестрикционные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 6) и в 2% агарозном геле (рис. 7-8). При наличии полиморфизма на электрофереграммах можно было наблюдать образование фрагментов расчётной длины, в случае с гетерозиготным вариантом наблюдалось сохранение и фрагмента изначальной длины.

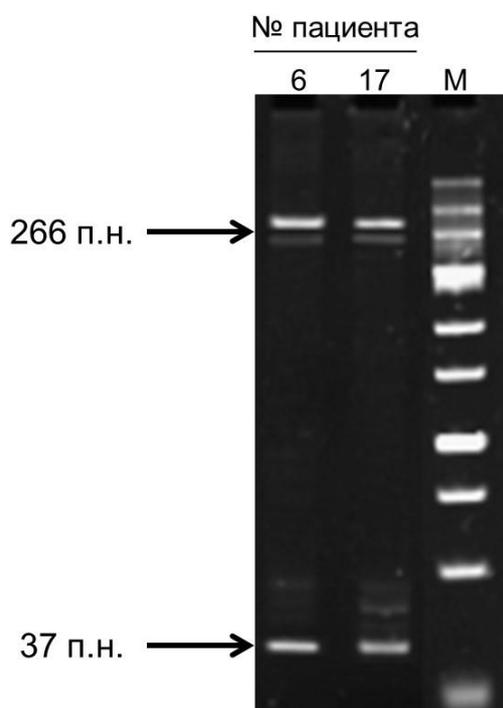


Рис.6. Положительный результат рестрикционного анализа на мутацию 235M в гене *AGT*.

M – маркер молекулярной массы (GeneRulerLowRange). Электрофорез в 8% ПААГ. Окрашено бромистым этидием.

На рисунке 5 можно заметить, что помимо образования расчётных фрагментов 266 и 37 пар нуклеотидов сохраняется и исходный фрагмент длиной 303 пары нуклеотидов, это свидетельствует о гетерозиготности по полиморфизму M235T.

Для проверки чувствительности метода ПЦР и рестрикции анализ проводился двукратно для всех 150 образцов. Было обнаружено отсутствие ложноположительных результатов, при этом в 5 случаях на 300 проведённых

анализов наблюдался ложно – отрицательный результат (1,6%), эти образцы дополнительно были проверены путём проведения ещё одного ПЦР-ПДРФ анализа.

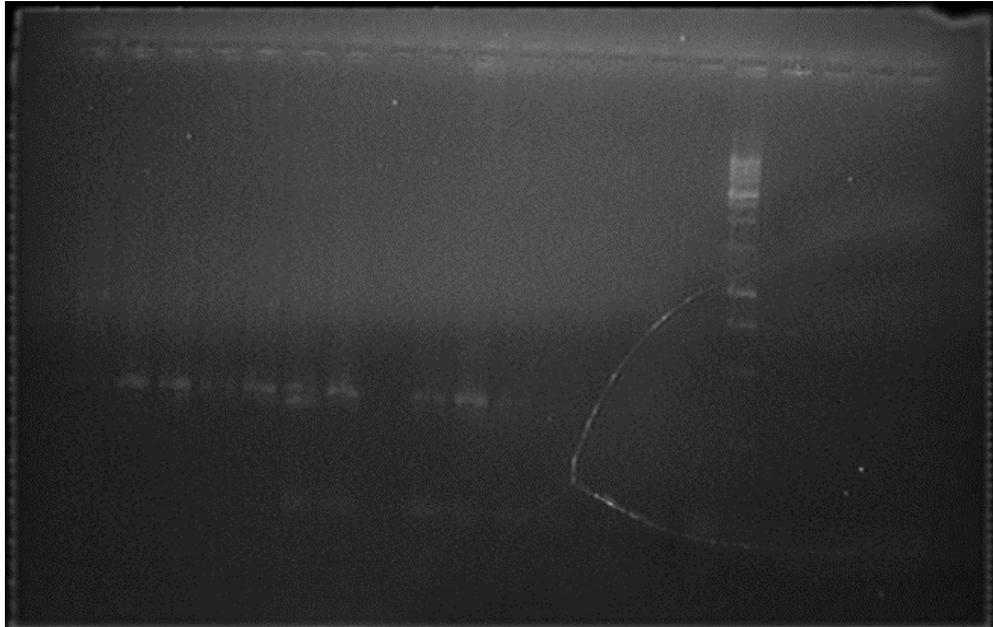


Рис.7. Результат рестрикционного анализа на мутацию 235М в гене АГТ.
Электрофорез в 2% агарозном геле. Окрашено бромистым этидием.

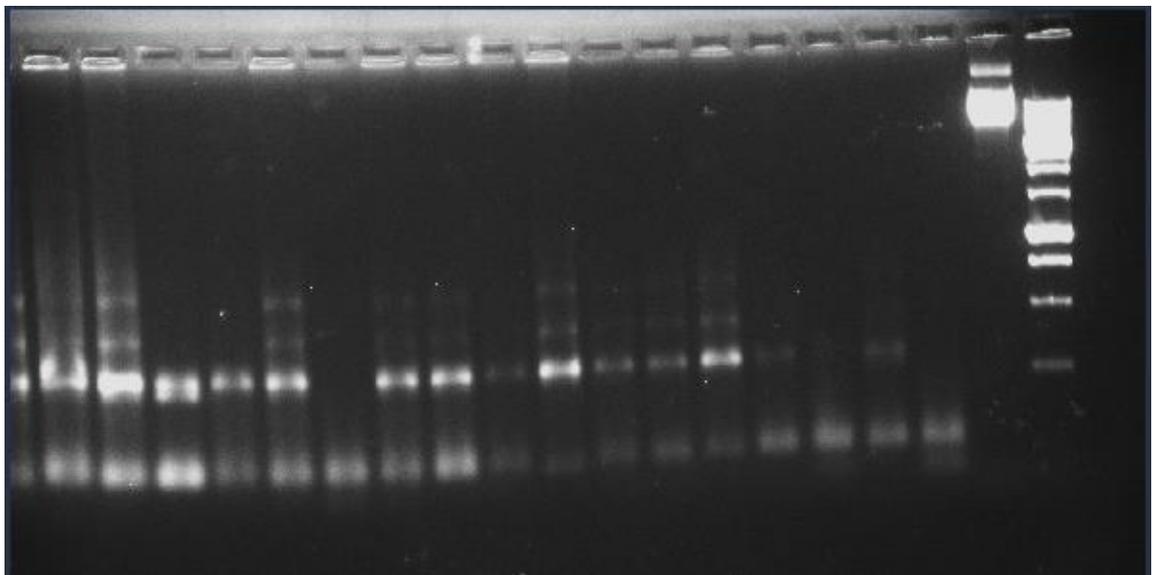


Рис.8. Результат рестрикционного анализа на мутацию 235М в гене АГТ.
Электрофорез в 2% агарозном геле. Окрашено бромистым этидием.

В 33 случае из 115, у пациентов с АГ, наблюдали образование фрагментов ДНК расчетной длины: 266 и 37 пар нуклеотидов, в свою очередь, из 35 человек

без артериальной гипертонии в анамнезе образование таких фрагментов наблюдалось в 7 образцах. Это свидетельствовало о наличии у данных пациентов и здоровых людей мутантного аллеля гена *AGT* (варианта 235M). В остальных 110 случаях наблюдали только аллели дикого типа (варианта 235T). При этом у 23 пациентов мутация проявилась в гетерозиготной форме, а в гомозиготной у 10, в группе здоровых людей это количество 4 и 3 соответственно.

Статистическая обработка данных показала, существующее различие между группами больных и здоровых указывающее на зависимость развития артериальной гипертонии в зависимости от наличия полиморфизма M235T имеет слабую значимость. При этом, частота встречаемости аллеля дикого типа, у больных, составило порядка 18,7, мутантного 81,3, у здоровых 14,3 и 85,7 соответственно. Частоты генотипов в группе больных: TT=71,3, TM=20 и MM=8,7, в контрольной группе 80, 11,4 и 8,6 соответственно. Данные по числу проб представлены в таблице 5, по частотам генотипов и аллелей – в таблице 6.

Таблица 5

Соотношение положительных и отрицательных проб по данным ПДРФ-анализа

Экспериментальная группа	Число проб				
	Всего, шт.	В том числе:			
		Положительных		Отрицательных	
		шт.	%	шт.	%
Опыт (АГ 1-3 степени)	115	33	28,7	82	71,3
Контроль (здоровые)	35	7	20,0	28	80,0

Частоты аллелей и генотипов в исследованных выборках

Экспериментальная группа	Частота генотипа, %			Частота аллеля, %	
	ТТ	ТМ	ММ	235Т	235М
Опыт (АГ 1-3 степени)	71,3	20,0	8,7	81,3	18,7
Контроль (здоровые)	80,0	11,4	8,6	85,7	14,3

Для получения более достоверного результата необходим больший массив данных и проведение полноценного популяционно-генетического исследования, в том числе с разделением по половому и этническому признаку. Однако, расчёт отношения шансов показал значение 1,67, входящее в 95% доверительный интервал, что говорит о повышенном риске развития ССЗ при наличии фактора риска.

Полученные данные в целом согласуются с рядом практических исследований, проведенных ранее, среди кавказской популяции. Кроме того, наши результаты в общем коррелируют с данными мета-анализов, охватывающих не только кавказский регион, но и азиатский и европейский [Angiotensinogen-M235T as a risk ..., p. 351-362; The L-arginine/NO Pathway..., p. 1853-1863]. В мета-анализе 39 исследований проведенном Хуан Нан Лаи и др. были показаны отношения шансов от 1,47 до 1,78 в зависимости от генотипа (гомо-, либо гетерозиготная) и в общем 1,46 между аллелем дикого и мутантного типа, которые входят в 95% доверительный интервал и показывают увеличение риска проявления признака (артериальной гипертензии) при наличии фактора риска.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод определения полиморфизма M235T в гене ангиотензиногена (*AGT*) с применением ПЦР-ПДРФ-анализа:
 - 1.1. Подобраны праймеры для амплификации целевого участка гена *AGT* с помощью полимеразной цепной реакции;
 - 1.2. Установлена оптимальная температура отжига для данных праймеров – 60°C.
 - 1.3. Метод успешно испытан в ходе анализа 150 образцов крови от пациентов.
2. Частота встречаемости мутантного аллеля (235M) в опытной группе составила 18,7%, в контрольной – 14,3%, аллеля дикого типа (235T) – 81,3% и 85,7% соответственно.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. A genome-wide scan search for susceptibility loci to human hypertension. / Sharma P. [et al.] // Hypertension. 2000. V.35. P. 1291–1296.
2. A metaanalysis of genome-wide linkage scans for hypertension: The National Heart, Lung and Blood Institute Family Blood Pressure Program. / Province M.A. [et al.] // J. Hypertens. 2003. V.16(2). P.144–147.
3. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. / Sharma A.M. [et al.] // J. Clin. Invest. 1997. V.99. P.1786–1797.
4. Angiotensinogen-M235T as a risk factor for myocardial infarction in Asian populations:a genetic association study and a bioinformatics approach. / Raygan F. [et. al.] // Croat Med. J. 2016. V.57. P.351–362.
5. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systemic review and methodological appraisal. / R. Kunz [et al.] // Hypertension. 1997. V.30. P.1331–1337.
6. Association of angiotensinogen haplotypes with angiotensinogen levels but not with blood pressure or coronary artery disease:the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. / Renner W. [et. al.] // J. Mol. Med. 2005. V.83. P.235–239.
7. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. / J. Jingji [et. al.] // Hipertonsion. 2003. V.41(1). P.163–167.
8. Association of renin-angiotensin system genes polymorphisms and risk of premature ST elevation myocardial infarction in young Mexican population. / Isordia-Salas I. [et. al.] // Blood Coagul Fibrinolysis. 2018. V.29. P.267–274.
9. Associations between angiotensinogen M235T polymorphisms and the risk of diabetic nephropathy: A meta-analysis. / Zhou Bo. [et. al.] // Diabetes Res Clin Pract. 2018. V.142. P.26–36.

10. Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity. / Hopkins P.N. [et al.] // *J. Hypertens.* 1996. V.14. P.199–207.
11. Case-control association study of polymorphisms in the angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genes and coronary artery disease and systemic artery hypertension in African-Brazilians and Caucasian-Brazilians. / Bonfim-Silva R. [et. al.] // *J. Genet.* 2016. V.95. P.63–69.
12. Endothelial nitric oxide synthase genetic variation and essential hypertension risk in Han Chinese: the Fangshan study. / Wenquan Niu [et al.] // *J. Hypertens.* 2008. V.23(2). P.136-139.
13. Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. / Asai T. [et. al.] // *Hipertonsion.* 2001. V.38(6). P.1321–1324.
14. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. / Schiffrin E.L. [et al.] // *J. Hypertens.* 1997. V.15. P.57–63.
15. Evaluation of Angiotensinogen M235T and T174M Polymorphisms, Demographic and Clinical Factors in New-Onset Diabetes after Liver Transplantation in Iranian Patients. / Mottagi S. [et. al.] // *Int J Organ Transplant Med.* 2019. V.3. P.137–143.
16. Family Blood Pressure Program. Positional identification of hypertension susceptibility genes on chromosome 2. / Barkley R.A. [et al.] // *Hypertension.* 2004. V.43(2). P.477–482.
17. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. / Julier C. [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V.6(12). P.2077–2085.
18. Genome scan among Nigerians linking blood pressure to chromosomes 2, 3, and 19. / Cooper R.S. [et al.] // *Hypertension.* 2002. V.40(5). P629–633.
19. Implication of an AGT haplotype in a multigene association study with pregnancy hypertension. / Levesque S. [et. al.] // *Hypertension.* 2004. V.43. P.71–78.

20. Increased basal concentrations of plasma endothelin in borderline hypertension. / Lemne C.E. [et al.] // *J. Hypertens.* 1994. V.12. P.1069–1074.
21. Ji Jin J., Nakura J. Association of Endothelin-1 Gene Variant With Hypertension. // *Hypertension.* 2003. V.41. P.163–167.
22. Lander E.S., Schork N.J. Genetic dissection of complex traits. // *Science.* 1994. V.265(5181). P.2037–2048.
23. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. / Shimkets R.A. [et al.] // *Cell.* 1994. V.79. P.407–414.
24. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. / Staessen J.A. [et al.] // *J. Hypertens.* 1999. V.17. P.9–17.
25. M235T polymorphism in the angiotensinogen gene and cardiovascular disease: An updated meta-analysis of 39 case–control comparisons. / Chuannan Z. [et.al.] // *Anatol J. Cardiol.* 2019. V.4. P.222–232.
26. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. / Jeunemaitre X. [et al.] // *Cell.* 1992. V.71. P.169–180.
27. NO at work. / Schmidt H.H. [et. al.] // *Cell.* 1994. V.78(6). P.919-925.
28. Non-modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. / Williams G.H. [et al.] // *Hypertension.* 1992. V.20. P.788–796.
29. Procopcius, L. Angiotensinogen gene M235T variant and pre-eclampsia in Romanian pregnant women. / Procopcius L. [et. al.] // *J. Cell Mol. Med.* 2002. V.3. P.383-388.
30. QTL influencing blood pressure maps to the region of PPH1 on chromosome 2q31–34 in Old Order Amish. / Hsueh W.C. [et al.] // *Circulation.* 2000. V.101(24). P.2810–2816.
31. Strong association of the renin TaqI polymorphism with essential hypertension in Chinese Han and Tibetan populations. / Qi Y. [et al.] // *J. Hum. Hypertens.* 2007. V.25. P.145–151.
32. Takahashi N., Smithies O., Gene targeting approaches to analyzing hypertension // *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999. V.10. P.1598–1605.

33. Tanira M., Balushi A. Genetic variations related to hypertension: a review // *Hypertension*. 1998. V.35. P.786–795.
34. The L-arginine/NO Pathway and Homoarginine Are Altered in Duchenne Muscular Dystrophy and Improved by Glucocorticoids. / Horster I. [et. al.] // *Amino Acids*. 2015. V.9. P.1853-1863.
35. The role of genetic variants in angiotensin I converting enzyme, angiotensinogen and the angiotensin II type-1 receptor in the pathophysiology of heart muscle disease. / Raynolds M.V. [et. al.] // *EurHeart J*. 1995. V.16. P.23–30.
36. Timberlake D.S., O’Conner D.T., Parmer R.J. Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Opin Nephrol Hypertens*. 2001. V.10. P. 71–79.
37. World Health Organization: Global status report on noncommunicable diseases / A. Alwan [et al.] N.-York.: World Health Organization, 2010. 162 p.
38. World Health Organization: Global status report on noncommunicable diseases / A. Alwan [et al.]. N.-York.: World Health Organization, 2014. 165 p.
39. Xiaoqing Li. Associations between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis of 132 case-control studies. // *Eur. J. Prev. Cardiol*. 2019. V.2. P.160-170.
40. Болдуева С.А., Архаров И.В. Учебное пособие по кардиологии. СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2006. 138 с.
41. Глезер Г. А., Глезер М.Г. Артериальная гипертензия. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1986. 80 с.
42. Горбачев В.В. Ишемическая болезнь сердца. Минск.: Высш. шк., 2008. 479 с.
43. Жанна Д. К., Котовская Ю.В., Моисеев В.С. Артериальная гипертензия: ключи к диагностике и лечению. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 864 с.
44. Заболеваемость населения России в 2007 году. Статистические материалы. Часть 1 / Какорина Е.П. [и др.] М.: ФГУ Центральный научно-

исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения Росздрава, 2008. 120 с.

45. Клинико-статистический анализ артериальной гипертензии, осложненной гипертоническим кризом, в Москве за 2005–2009 гг. / Н.И. Гапонова [и др.] М.: Кардиология, 2011. №2. С. 40–44.

46. Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д., Уразова О.И. Патопфизиология: монография в 2 т. 4-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2009. Т. 1. 848 с.

47. Оганов, Р.Г. Школа здоровья. Артериальная гипертония. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР -Медиа, 2008. 192 с.

48. Поздняков Ю.М., Красницкий В.Б. Практическая кардиология М.: Издательство БИНОМ, 2007. 776 с.

49. Сафроненко А.В. Генеологические и молекулярно-генетические аспекты артериальной гипертензии // Современные проблемы науки и образования. 2012. №1. С. 67-76.

50. Чазова И.Е., Жернакова Ю.В. от имени экспертов. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертонии. Системные гипертензии. 2019; Т: 16 (1). С. 6–31.