



# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

<sup>1,2,3</sup>А.С. Глогов, <sup>1,2,3</sup>О.С. Глогов, <sup>1,2</sup>М.В. Москаленко,  
<sup>3</sup>В.А. Рогозкин, <sup>1</sup>Т.Э. Иващенко,  
<sup>1</sup>В.С. Баранов

<sup>1</sup>НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет;

<sup>3</sup>НИИ физической культуры, Санкт-Петербург

☼ Методом ПЦР/ПДРФ анализа в группах атлетов, долгожителей и в популяционной выборке исследован полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы: ангиотензиногена — AGT (M235T), ангиотензинпревращающего фермента — ACE (I/D), рецептора ангиотензиногена — AGT2R1 (A1166C). По сравнению с популяционной группой у гребцов отмечено увеличение частоты генотипов M/T гена AGT (46 и 34%) и I/D гена ACE (55 и 48% соответственно) и снижение частоты генотипа A/C гена AGT2R1 (38 и 51%). Показано достоверное увеличение частоты генотипа M/T гена AGT у долгожителей по сравнению с популяционной группой (56 и 34% соответственно,  $\chi^2=12,961$ ,  $df=2$ ,  $p=0,0015$ ). Полученные данные позволяют предполагать важную роль ренин-ангиотензиновой системы в процессах старения и сохранения активной физической работоспособности.

☼ **Ключевые слова:** генетическая предрасположенность; полиморфизм; ассоциация; популяция; долгожители; спортсмены; ген AGT; ген ACE; ген AGT2R1; мультифакториальные заболевания; ренин-ангиотензиновая система; сердечно-сосудистая система.

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПОПУЛЯЦИИ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ, У АТЛЕТОВ И У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ

### ВВЕДЕНИЕ

Благодаря прогрессу в изучении генома человека появилась реальная возможность не только проводить точную молекулярную диагностику всех генных болезней, но в определенной мере судить о предрасположенности человека к различным заболеваниям и даже оценивать его некоторые врожденные функциональные (физиологические) особенности [1–5]. С этой целью проводят анализ полиморфизма генов, принимающих участие в тех или иных метаболических процессах. При этом основное внимание уделяют функционально значимым полиморфным заменам нуклеотидов в молекуле ДНК, которые по-разному влияют на функциональную активность соответствующих генопродуктов. Большое значение в таких исследованиях имеет изучение полиморфизма генов, продукты которых обеспечивают различные звенья одной той же или близко сопряженных метаболических цепей, то есть входящих в одну генную сеть. Такой системный подход позволяет более адекватно оценить роль соответствующего полиморфного аллеля в формировании функционального статуса организма. Удобную модель для таких исследований представляет ренин-ангиотензиновая система. Белковые продукты ее генов играют ключевую роль в регуляции кровяного давления и гомеостатической функции почек и обеспечивают, таким образом, важнейшие компенсаторные физиологические процессы в организме.

Анализ генетического полиморфизма человека зачастую ограничивается сравнительным анализом аллельных частот и распределения генотипов в популяции и у больных с различными мультифакториальными заболеваниями, что обусловлено, прежде всего, задачами практического здравоохранения — предиктивной (профилактической) медицины [1–3]. Не меньшее значение, однако, имеет изучение особенностей генетического полиморфизма среди «условно здоровых» групп населения, таких как долгожители, спортсмены, новорожденные и другие. Предполагается, что такого рода исследования также могут дать важную информацию о роли и функциях того или иного гена в сложной генетической сети, формирующей функциональный статус организма человека. Известно, что генетический полиморфизм тесно свя-

зан с физическими возможностями человека, то есть имеет непосредственное отношение к высоким спортивным достижениям [4, 6–8]. Основные направления исследований в области спортивной генетики связаны с генами ренин-ангиотензиновой системы как основного маркера состояния сердечно-сосудистой системы. Наиболее изученным среди них является полиморфизм I/D по гену ангиотензин-превращающего фермента (ACE), для которого показана ассоциация определенных генотипов и аллелей с той или иной способностью к физической нагрузке. Имеются ориентировочные данные и о наличии ассоциации аллельных вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы с продолжительностью жизни.

Таким образом, целью настоящей работы было комплексное изучение особенностей функционального полиморфизма нескольких генов ренин-ангиотензиновой системы, а именно ACE (I/D), AGT (M235T), AGTR1 (A1166C) у спортсменов и долгожителей в сравнении с таковыми в популяции населения Северо-Западного региона России.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использованы образцы ДНК, выделенные из клеток буккального эпителия 56-ти спортсменов-гребцов (мужчины 18–22 лет) высокого спортивного разряда (I-ый разряд, к.м.с, м.с.), и образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови 147-ми лиц старше 70-ти лет: мужчины (n=29) и женщины (n=118). В качестве контроля использованы образцы ДНК здоровых не родственных индивидуумов мужского (n=59) и женского пола (n=57) в возрасте 18–45 лет, проживающих в Северо-Западном регионе России.

Методами полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов исследован полиморфизм трех генов: AGT, ACE, AGTR1. Типы изученных полиморфных аллелей, последовательности олигопраймеров и размеры амплифицированных фрагментов приведены в табл. 1.

Реакционная смесь для амплификации, объемом 25 мкл включала 15 нМ каждого праймера, 67 мМ трис-

HCl, pH 8.8, 16,6 мМ сульфата аммония, 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 6,7 мкМ ЭДТА, 10 мМ меркаптоэтанол, 170 мкг BSA, 1,0 мМ каждого dNTP и 1 е.а. Таq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим» г.Новоси-бирск). Для амплификации использовали програм-мируемый термоциклер фирмы «Perkin Elmer», Cetus (США) или ДНК-амплификатор фирмы «ДНК-технология» (Россия). После предварительной денатурации ДНК (10 мин при 94°С) проводили амплификацию в режиме:

– для гена AGT (10 циклов): денатурация 94°С (7 мин), 10 циклов амплификации: 94°С (1 мин), 68°С (1 мин), 72°С (1 мин) и 18 циклов амплификации: 90°С (30 сек), 68°С (1 мин), 72°С (30 сек). Заключительный синтез 72°С — 10 мин.

– для гена ACE (30 циклов): денатурация при 94°С (7 мин), 30 циклов амплификации: 94°С (1 мин), 60°С (1 мин), 72°С (1 мин). Заключительный синтез 72°С — 5 мин.

– для гена AGTR1 (38 циклов): денатурация 94°С (7 мин), 38 циклов амплификации: 94°С (1 мин), 57°С (1 мин), 72°С (1 мин). Заключительный синтез 72°С — 7 мин.

Продукты амплификации подвергали гидролизу соответствующими эндонуклеазами рестрикции: Tth111I — для гена AGT (165 п.о. — М аллель, фрагменты 139 п.о. и 26 п.о. — Т аллель); BstDEI — для гена AGTR1 (165 п.о. — А аллель, фрагменты 109 п.о. и 56 п.о. — С аллель). Ферментативный гидролиз ДНК проводили согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Полноту гидролиза оценивали по результатам электрофореза в 6% полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Для статистического анализа использован стандартный метод  $\chi^2$  (программа GraphPad InStat).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты анализа частот генотипов и аллелей генов AGT, ACE и AGTR1 в популяции, в группе долгожителей и спортсменов представлены в табл. 2 и 3. Распределение соответствующих генотипов по всем генам ренин-ангиотензиновой системы в популя-

Таблица 1

Характеристика генов AGT, ACE, AGTR1, структуры олигопраймеров, используемых для их изучения

Ген	Локализация гена	Изученный полиморфизм гена	Размер амплифицированного фрагмента	Структура праймера
AGT	1q42-q43	M235T (T→C мутация)	165 п.о.	5'-CCGTTTGTGCGAGGGCCTGGCTCTC-3 5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC-3
ACE	17q23	I/D в 17 интроне	I аллель — 477 п.о. D аллель — 190 п.о.	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3 5'-ATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3
AGTR1	3q21-q23	A1166C	165 п.о.	5'-CACCATGTTTTGAGGTTGAGTGACA-3 5'-AAAGTCGGTTCAGTCCACATAATGC-3

Таблица 2

Распределение генотипов и частот аллелей генов AGT, ACE, AGTR1 в популяции, у гребцов и у лиц пожилого возраста (мужчины)

AGT	Частоты аллелей, %		$\chi^2$ : df = 2	Частоты генотипов, %			$\chi^2$ : df = 4
	M	T		MM	MT	TT	
Популяционная выборка (n = 59)	61,0 ± 5,7	39,0 ± 7,2	1,008 p = 0,6040	44,1	33,9	22,0	8,817 p = 0,0658
Гребцы (n = 56)	53,6 ± 6,4	46,4 ± 6,9		30,4	46,4	23,2	
Лица пожилого возраста (n = 29)	56,9 ± 8,6	43,1 ± 9,9		24,1	65,5	10,3	
ACE	I	D	3,31 p = 0,1911	II	ID	DD	2,489 p = 0,6466
Популяционная выборка (n = 59)	46,6 ± 6,7	53,4 ± 6,3		22,4	48,3	29,3	
Гребцы (n = 56)	47,3 ± 6,8	52,7 ± 6,5		19,6	55,4	25,0	
Лица пожилого возраста (n = 29)	56,9 ± 8,6	43,1 ± 9,9		31,0	51,7	17,2	
AGTR1	A	C	1,065 p = 0,5870	AA	AC	CC	4,432 p = 0,3507
Популяционная выборка (n = 59)	69,5 ± 5,1	30,5 ± 7,7		44,1	50,8	5,1	
Гребцы (n = 56)	75,9 ± 04,6	24,1 ± 8,2		57,1	37,5	5,4	
Лица пожилого возраста (n = 29)	74,1 ± 6,7	25,9 ± 11,3		58,6	31,0	10,4	

Таблица 3

Распределение генотипов и частот аллелей генов AGT, ACE, AGTR1 в популяции и у лиц пожилого возраста (женщины)

AGT	Частоты аллелей, %		$\chi^2$ : df = 1	Частоты генотипов, %			$\chi^2$ : df = 2
	M	T		MM	MT	TT	
Популяционная выборка (n = 57)	61,4 ± 5,8	38,6 ± 7,3	1,306 p = 0,2532	43,9	35,1	21,1	6,440 p = 0,04
Лица пожилого возраста (n = 118)	53,0 ± 4,5	47,0 ± 4,7		26,3	53,4	20,3	
ACE	I	D	0,08013 p = 0,7771	II	ID	DD	2,202 p = 0,3326
Популяционная выборка (n = 57)	49,1 ± 6,7	50,9 ± 6,6		29,8	38,6	31,6	
Лица пожилого возраста (n = 118)	47,0 ± 4,7	53,0 ± 4,5		22,0	50,0	28,0	
AGTR1	A	C	2,58 p = 0,1082	AA	AC	CC	4,802 p = 0,0906
Популяционная выборка (n = 57)	84,8 ± 3,7	15,2 ± 8,7		69,6	30,4	0	
Лица пожилого возраста (n = 118)	75,4 ± 3,2	24,6 ± 5,7		55,1	40,7	4,2	

онной группе Северо-Западного региона России, в группе гребцов и у лиц пожилого возраста соответствовало распределению Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ,  $df = 2$ , для мужчин и  $p > 0,05$ ,  $df = 2$ , для женщин соответственно).

Достоверных различий в частотах аллелей генов ренин-ангиотензиновой системы между группой гребцов и популяционной группой не обнаружено ( $p > 0,3908$ ,  $df = 1$ ). Вместе с тем у гребцов по сравнению с популяционной группой отмечена тенденция к увеличению частоты генотипов M/T по гену AGT и I/D по гену ACE (46 и 34% для гена AGT и 55 и 48% для гена ACE соответственно). Эти различия, однако, оказались недостоверными ( $\chi^2 = 2,59$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,2739$  и  $\chi^2 = 0,5746$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,7503$ , для генов AGT и ACE соответственно). Для гена AGTR1 была выявлена обратная тенденция — уменьшение частоты гетерозигот (A/C) у атлетов (38% у гребцов по сравнению с 51% такого генотипа в контроле,  $\chi^2 = 2,132$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,3444$ ). Частоты генотипов, предраспола-

гающих к повышенному артериальному давлению (T/T по гену AGT, D/D по гену ACE и C/C по гену AGTR1) в группе гребцов и в популяции практически не отличались ( $p > 0,7292$ ,  $df = 1$ ). Таким образом, проведенный анализ не позволил обнаружить существенных отличий частот аллелей и генотипов у атлетов-гребцов, в сравнении с популяционной выборкой. Вместе с тем представляет интерес выявленная тенденция к увеличению числа гетерозигот по генам AGT и ACE у спортсменов при одновременном снижении в этой группе гетерозигот по гену рецептора ангиотензиногена AGTR1.

Анализ полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы не выявил различий в частотах соответствующих аллелей у долгожителей (как у мужчин, так и у женщин) и в популяционной группе ( $p > 0,2532$ ,  $df = 1$ ). При этом, однако, частота генотипа M/T по гену AGT у лиц пожилого возраста оказалась почти в два раза выше по сравнению с таковой в популяции и составила 65,5% у лиц мужского пола

и 53,4% у лиц женского пола. В контрольной группе мужчин и женщин частоты М/Т генотипа составляли 33,9% ( $\chi^2 = 7,877$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,005$ ) и 35,1% ( $\chi^2 = 6,44$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,04$ ) соответственно. В группе долгожителей выявлено также некоторое увеличение частоты гено-типа I/D по гену ACE. Однако данные различия оказались недостоверными ( $p > 0,2272$ ,  $df = 2$ ). Кроме того, у долгожителей мужского пола отмечено уменьшение частоты гетерозиготного генотипа (A/C) гена AGTR1 (3% у долгожителей и 5% в контроле,  $\chi^2 = 3,354$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,1869$ ), тогда как для долгожителей женского пола выявлена обратная тенденция — увеличение гетерозиготных генотипов ( $\chi^2 = 4,802$ ;  $df = 2$ ,  $p = 0,0906$ ). Частота данного аллеля у долгожительниц оказалась в 2 раза ниже, чем у долгожителей ( $\chi^2 = 6,452$ ;  $df = 1$ ,  $p = 0,011$ ).

Полученные данные свидетельствуют о наличии ассоциации определенных генотипов по генам ренин-ангиотензиновой системы с долгожительством и с повышенной физической работоспособностью. Особенно четко прослеживается такая связь в отношении полиморфизма M235T по гену AGT. При этом доминирующим среди долгожителей оказался генотип (M/T). Частота его оказалась заметно повышенной и среди спортсменов.

Такое увеличение числа гетерозигот M/T по гену AGT представляется вполне логичным. Известно, что ренин, воздействуя на ангиотензиноген (продукт гена AGT), превращает его в ангиотензин I, который, в свою очередь, служит субстратом для ангиотензин-превращающего фактора (продукт гена ACE), конвертирующего ангиотензин I в ангиотензин II. Последний обладает активным сосудосуживающим эффектом и повышает артериальное давление. Считают, что ангиотензин II играет роль в патогенезе гипертонической болезни, увеличивая периферическое сосудистое сопротивление, а также вызывает гипертрофию левого желудочка [1, 2, 6–8, 12].

Складывается впечатление, что с возрастом происходит элиминация из популяции гомозигот M/M и T/T по гену AGT. В группе гребцов также выявлено увеличение числа индивидуумов с генотипом M/T, что косвенно свидетельствует о связи между нагрузкой, сочетающей силу и выносливость, и тенденцией к долгожительству. Таким образом, гетерозиготность по генам AGT и ACE можно рассматривать как наследственный фактор, ассоциированный с долгожительством и способностью к активному занятию спортом.

В настоящее время в геномной сети сердечно-сосудистых заболеваний ориентировочно насчитывается около 150 генов. Гены ренин-ангиотензиновой системы только одна, хотя и очень важная группа этих генов. Требуется дальнейшие исследования на больших популяционных выборках, чтобы оценить значение

функционально значимого полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы как молекулярных маркеров потенциальных возможностей сердечно-сосудистой системы, от состояния которой зависят не только спортивные рекорды, но что еще более важно — качество и продолжительность жизни.

Работа выполнена при поддержке гранта CRDF «Молекулярно-биологические основы здоровья человека и окружающей среды Северо-Запада России» (ST-012-0) и персональных грантов поддержки научно-исследовательской работы аспирантов вузов МО РФ 2003–2004 гг. (грант № A03-2.12-14 и № A03-2.12-16).

### Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности» (Введение в предиктивную медицину) — СПб.: Интермедика, 2000 г.
2. Баранов В.С. Молекулярная медицина: молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 684–695.
3. Определение генетической предрасположенности к наследственным и мультифакториальным заболеваниям. Генетический паспорт: Методические рекомендации. — СПб.: Фолиант, 2001. — 48 с.
4. Rogozkin V.A. Расшифровка генома человека и спорт // Теория и практика физической культуры. — 2001. — №. 6. — С. 60–63.
5. Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. — Томск: Печатная мануфактура, 2002. — 244 с.
6. Karjalainen J., Kujala U.M., Stolt A., Mantysaari M., Viitasalo M., Kainulainen K., Kontula K. Angiotensinogen gene M235T polymorphism predicts left ventricular hypertrophy in endurance athletes // J. Am. Coll. Cardiol. — 1999. — Vol. 34. — P. 494–499.
7. Nazarov I.B., Woods D.R., Montgomery H.E., Shneider O.V., Kazakov V.I., Tomilin N.V., Rogozkin V.A. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes // Eur. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 9. — P. 797–801.
8. Montgomery H.E., Marshall R., Hemingway H., et al. Human gene for physical performance // Nature. — 1998. — Vol. 21. — P. 221–222.

### Analysis of genes polymorphisms of renin-angiotensin systems in population, athletes and elderly people

<sup>1,2,3</sup>Glotov A.S., <sup>1,2,3</sup>Glotov O.S., <sup>1,2</sup>Moskalenko M.V., <sup>1,2</sup>Rogozkin V.A., <sup>3</sup>Ivashchenko T.E., <sup>1</sup>Baranov V.S.

<sup>1</sup>Ott's Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS, St.-Petersburg, <sup>2</sup>St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, <sup>3</sup>St.-Petersburg Scientific Research Institute of Physical Culture, St.-Petersburg; Russia

☼ SUMMARY: We analyzed AGT (M235T), ACE (I/D), AGTR1 (A1166C) genes polymorphisms of renin-angiotensin systems in population, athletes and elderly people by PCR/RFLP methods. It was shown increasing of M/T genotype of AGT gene in rowers compared with population group (46 and 34%, accordantly), I/D of ACE (55 and 48%, accordantly) and decreasing of A/C genotype of AGTR1 gene (38 and 51%). It was detected significantly increasing of M/T genotype of AGT gene elderly people compared with population group (56 and 34%, accordantly,  $\chi^2=11,828$ ,  $p=0,0006$ ). The received data allow to make the assumption of a possible role renin-angiotensin systems in process of ageing and active physical working capacity.

☼ KEY WORDS: genetic predisposition; polymorphism; association; population; elderly people; rowers; gene AGT; gene ACE; gene AGTR1; multifactorial disease; renin-angiotensin system; cardiovascular system.