



# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

О.С. Глогов<sup>1,2</sup>, А.С. Глогов<sup>1,2</sup>,  
О.А. Тарасенко<sup>1</sup>,  
Т.Э. Иващенко<sup>1</sup>, В.С. Баранов<sup>1</sup>

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

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

✿ **Объективная оценка влияния генетических полиморфизмов на функциональные особенности метаболических систем организма невозможна без предварительного анализа их популяционных частот. Методом ПЦР/ПДРФ анализа исследован полиморфизм генов, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями: (I/D-ACE, 1166 A/C- AGTR1, 4a/4b-eNOS, 677C/T-MTHFR, 66A/G-MTRR, APOE E2/E3/E4) в популяционной выборке Северо-Западного региона России. Не выявлено достоверных отличий в частотах функционально-значимого полиморфизма MTHFR, MTRR, APOE, eNOS и AGTR1 генов между популяционной выборкой Северо-Западного региона России и рядом европейских популяций (Испания, Германия). Показана более низкая частота D/D генотипа и более высокая частота I/I генотипа ACE гена в популяционной выборке Северо-Западного региона России по сравнению с испанской популяцией (D/D — 29,6 и 41%, I/I — 26,1 и 15% соответственно). Можно предполагать, что различия или совпадения частот функционально-значимого полиморфизма изученных генов в определенной мере отражают популяционные особенности, связанные различными экологическими и социальными факторами.**

✿ **Ключевые слова:** генетическая предрасположенность, полиморфизм, ассоциация, популяция, ген ACE, ген AGTR1, ген eNOS, ген MTHFR, ген MTRR, ген APOE, мультифакториальные заболевания, ренин-ангиотензиновая система, сердечно-сосудистая система.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-ЗНАЧИМОГО ПОЛИМОРФИЗМА ACE, AGTR1, eNOS, MTHFR, MTRR И APOE ГЕНОВ В ПОПУЛЯЦИИ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование генетических маркеров, отвечающих за наследственную предрасположенность к мультифакториальным заболеваниям, является одной из важных задач молекулярной медицины.

Благодаря исследованиям генома человека, идентификации его генов, в том числе и генов, мутации которых приводят к наследственным болезням либо предрасполагают к наиболее частым полигенным (мультифакториальным) заболеваниям, впервые появилась реальная возможность не только проводить точную молекулярную диагностику, но и определять предрасположенность человека к тому или иному заболеванию [1].

Хорошо известно, что ранняя диагностика и своевременная профилактика различных заболеваний являются наиболее актуальными проблемами современной медицины. Как правило, пациент обращается к врачу на том этапе, когда течение болезни сопровождается яркими клиническими проявлениями и нередко уже сопутствующими осложнениями. При этом основная причина патологического процесса зачастую остается невыясненной. В этом случае самое интенсивное лечение может лишь временно улучшить состояние пациента и делает его пожизненно зависимым от симптоматических лекарственных средств [1, 3].

В последние годы быстро возрастает число работ, посвященных изучению особенностей частот функционально-значимого полиморфизма в различных популяциях. Достаточно детально изучен, в частности, полиморфизм генов, играющих роль в метастазировании злокачественных опухолей [10, 14]. Особое место в таких исследованиях принадлежит изучению полиморфизма генов, вовлеченных в сердечно-сосудистые заболевания, являющиеся главной причиной смерти во всем мире [ВОЗ, 1994]. Естественно, поэтому, что внимание, которое уделяется в настоящее время анализу полиморфизма генов, составляющих генную сеть сердечно-сосудистых заболеваний, достаточно высоко [7]. Обязательным начальным этапом таких исследований является изучение популяционных частот функционально-значимых аллелей таких генов. Особый интерес представляет изучение полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы, белковые продукты которой являются одними из наиболее важных регуляторов кровяного давления и гомеостатической функции почки, обеспечивая поддержание жизненно важных процессов в организме [3, 9]. Целью данной работы было изучение частоты генотипов и аллелей

шести генов «сердечно-сосудистой системы» в популяции Северо-Западного региона России.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Методами ПЦР и ПДРФ анализа исследован полиморфизм шести генов: I/D-ACE (ангиотензинпревращающего фермента), 1166 A/C- AGTR1 (рецептора 1 к ангиотензину II), 4a/4b-eNOS (эндотелиальной NO-синтазы), 677C/T-MTHFR (метилентетрагидрофолат-редуктазы), 66A/G-MTRR (метионинсинтетазредуктазы), APOE E2/E3/E4 (аполипопротеина E) у жителей Северо-Западного региона России. Группу обследованных составили неродственные индивидуумы в возрасте от 25 до 45 лет (59 мужчин и 58 женщин).

Смесь для амплификации объемом 25 мкл включала 67 mM трис-HCl, pH 8,8 при 25°C; 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,7 мкM ЭДТА; 10 mM 2-меркаптоэтанол, 170 мкг БСА, смесь четырех основных dNTP в концентрации 1,0 mM каждого и термостабильную ДНК-полимеразу 0,2 ед./мкл и по 0,001 оптической единицы каждого олигопраймера. Для амплификации использовали программируемый термоциклер фирмы «Perkin Elmer, Cetus» (USA) или ДНК-амплификатор фирмы «ДНК-технология» (Россия).

Условия ПЦР, структура олигонуклеотидных праймеров и размеры рестрикционных фрагментов для различных полиморфных аллелей изученных генов представлены в табл. 1.

После амплификации и рестрикции продукты реакции анализировали электрофорезом в 6,0% полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ на трансиллюминаторе Marcovue (LKB, UK).

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

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты анализа генетического полиморфизма в исследованной выборке населения Северо-Западного региона России, а также некоторых популяций стран Западной Европы (данные литературы) представлены в табл. 2. Наиболее заметные межпопуляционные различия отмечены при сравнительном анализе гена ангиотензинконвертирующего фермента (ACE) и гена рецептора ангиотензиногена (AGTR1).

В частности, зарегистрировано достоверное снижение частоты генотипа D/D и повышение частоты генотипа I/I ACE гена в популяционной выборке Северо-Западного региона России по сравнению с аналогичными данными для испанской популяции (D/D — 29,6 и 41%, I/I — 26,1 и 15% соответственно) [8,9]. При сравнении частот аллелей и генотипов ACE гена с аналогичными данными в Шотландской популяции (D/D — 31%, I/I — 20%) достоверных различий выявлено не было (табл. 2).

Таблица 1

**Условия ПЦР, структура олигонуклеотидных праймеров и размеры фрагментов**

Ген	Полиморфизм	Структура праймеров	Рестр-за	Условия ПЦР	Размеры фрагментов
ACE	I/D	5'-ctggagaccactccccctttct-3 5'-atgtggccatcacattcgta gat-3	-	94°C — 7 мин, 30 циклов 94°C — 1 мин, 62°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 10 сек Закл. синтез 72°C — 5 мин	I — 477 п.о. D — 190 п.о.
eNOS	4a/4b	5'-aggccctatggtagtgcctt-3' 5'-tctcttagtctgtggtcac-3'	-	94°C — 7 мин, 30 циклов 94°C — 1 мин, 62°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 10 сек Закл. синтез 72°C — 5 мин	«4» — 370 п.о. «5» — 397 п.о.
AGTR1	1166A/C	5'-caccatgttttgaggtgagtgaca-3 5'-aaagtcggttcagtcacata atgc-3	BstDEI	94°C — 7 мин, 30 циклов 94°C — 1 мин, 57°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 10 сек Закл. синтез 72°C — 5 мин	A — 165 п.о. C — 103+ 62 п.о.
MTHFR	677C/T	5'-tgaaggagaaggtgtctgcggga-3 5'-aggacgggtcggtgagagtg-3	HinfI	94°C — 7 мин, 30 циклов 94°C — 1 мин, 58°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 10 сек Закл. синтез 72°C — 5 мин	C — 200 п.о. T — 22+ 178 п.о.
MTRR	66G/A	5'-tgaggagtttctgttacta-3 5'-tcaaaagcacaacacgtaaa-3	FauNDI	94°C — 7 мин, 30 циклов 94°C — 1 мин, 58°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 10 сек Закл. синтез 72°C — 5 мин	G — 170 п.о. A — 106+64 п.о.
APOE	E2/E3/E4	5'-agatcggggcacgctgttcaagga-3' 5'-ccctcgcgagcccgctggtacac-3'	HspA1	98°C — 3 мин, 30 циклов 98°C — 10 сек, 58°C — 1 мин, 70°C — 50 сек Закл. синтез 70°C — 3 мин	E2-91+ 83 п.о. E3-91+ 48+ 35 п.о. E4-72+ 48+ 35 п.о.

Таблица 2

## Частоты генотипов значимых полиморфизмов MTHFR, MTRR, APOE, eNOS и AGTR1 генов в различных популяциях

Гены	Генотипы	Частоты генотипов в популяциях, %				
		Северо-Запад России (n=117)	Испания	Германия (n=100)	Шотландия (n=128)	США (n=139)
MTRR	G/G	27				23
	A/G	57	—	—	—	49
	A/A	14				28
MTHFR	C/C	41,7	41			
	C/T	50,4	45	—	—	—
	T/T	8,1	14 (n=95)			
ACE	I/I	26,1	15		20	
	I/D	44,3	44	—	48	—
	D/D	29,6	41 (n=400)		31	
AGTR1	A/A	55,2	51			
	A/C	42,2	38	—	—	—
	C/C	2,6	11* (n=200)			
eNOS	5/5	63,7	74	69		
	4/5	34,5	24	28		
	4/4	1,8	2 (n=400)	3		
APOE	E2/E3	16,8	9			
	E2/E4	3,9	1			
	E3/E3	63,6	75	—	—	—
	E3/E4	15,7	15 (n=200)			

Примечание: # — при  $p < 0,01$  достоверное отличие от популяции Северо-Запада России.

Известно, что D/D генотип ACE гена обуславливает повышение уровня ангиотензинконвертирующего фермента и ассоциирован с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Наши данные свидетельствуют о существовании популяционных особенностей в распределении генотипов ACE гена. Исходя из функциональной значимости данного полиморфизма, можно предполагать наличие популяционных различий в частоте сердечно-сосудистых заболеваний между населением Северо-Западного региона России и жителями Испании. Нельзя также исключить, что удельный вес полиморфных вариантов данного гена в возникновении сердечно-сосудистой патологии в разных популяциях варьирует.

Сравнительный анализ частот генотипов гена рецептора ангиотензиногена (AGTR1) между популяционной выборкой Северо-Западного региона России (A/A — 55,2%, A/C — 42,2%, C/C — 2,6%) и испанской популяцией (51, 38, 11% соответственно) [9] также выявил достоверное снижение C/C генотипа ( $p < 0,01$ ) в отечественной популяции (табл. 2). В то же время частоты генотипов и аллелей генов MTHFR, MTRR, APOE и eNOS в популяционной выборке Северо-Западного региона России и в ряде европейских популяций (Испания и Германия) не отличались [8, 9, 11, 13].

Как известно, продукт гена рецептора 1 ангиотензина II (AGTR1) также участвует в функционировании ренин-ангиотензиновой системы. Гомозиготы по аллельному варианту (C) этого рецептора содержат цитозин в позиции 1166 (C/C генотип) и имеют более высокое сродство к ангиотензину II. Имеются данные, что у гомозигот по C-аллели, в отличие от A/A гомозигот, повышен риск гипертрофии левого желудочка и артериальной гипертензии [9]. Полученные результаты свидетельствуют о 4-кратном уменьшении частоты C/C генотипов у населения Северо-Западного региона России по сравнению с данными испанских авторов [9].

В исследованной нами выборке Северо-Западного региона России по сравнению с испанской популяцией также обнаружено некоторое снижение частоты T/T генотипа — гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), ассоциированного с повышенным уровнем гомоцистеина и сердечно-сосудистыми заболеваниями [13]. Ранее отмеченное и другими авторами повышение частоты T/T генотипа в испанской популяции связывают с этническими и географическими особенностями страны.

Такое предположение вполне согласуется с существующими представлениями о том, что различия и сходства в частотах функционально-значимого

полиморфизма в разных популяциях зависят от географических условий, региона проживания, особенностей пищевого рациона, расовой и этнической принадлежности и многих других факторов, учитываемых в популяционной генетике человека [4, 5, 6, 12]. Не вызывает сомнения, что удельный вклад одного и того же генетического полиморфизма в этиологию и патогенез любого мультифакториального заболевания в разных популяциях и этнических группах может быть различным [1, 2, 4]. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости и актуальности продолжения масштабных популяционных исследований особенностей функционально значимых полиморфизмов генов «предрасположенности» как в плане этногенетики, так и для решения задач предиктивной медицины.

Авторы выражают благодарность за помощь в выполнении данной работы Москаленко М.В. 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 Минобразования России 2003–2004 гг. (гранты № А03-2.12-13, № А03-2.12-14 и № А03-2.12-16).

#### Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Генетика человека и гены «предрасположенности» (Введение в предиктивную медицину). — СПб.: Издательство «Интермедика». — 2000.
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.: ИКФ «Фолиант», 2001. — 48 с.
4. Степанов В.А. Этногеомика населения Северной Евразии // Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2002. — 244 с.
5. Степанов В.А., Пузырев В.П. Анализ аллельных частот семи микросателлитных локусов Y-хромосомы в трех популяциях тувинцев // Генетика. — 2000. — Т. 36. — С. 241–248.
6. Хуснутдинова Э.К., Фатхлисламова Р.И., Хидиятова И.М. и др. Рестрикционно-делеционный полиморфизм V-области митохондриальной ДНК в популяциях народов Волго-Уральского региона // Генетика. — 1997. — Т. 33. — С. 996–1000.
7. Шварц Е.И. Современные возможности молекулярной генетики в клинической практике // Матер. симпозиума «Вопросы фармакотерапии в клинической практике: прошлое, настоящее, будущее». — СПб., 1997. — С. 3–6.
8. Alvarez R., Alvarez V., Lahoz C.H., Martinez C., Pena J., Sanchez J.M., Guisasaola L.M., Salas-Puig J., Moris G., Vidal J.A., Ribacoba R., Menes B.B., Uria D., Coto E. Angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase DNA polymorphisms and late onset Alzheimer's disease // J. Neurol Neurosurg Psychiatry 1999; Vol. 67:733–736.
9. Batalla A., Alvarez R., Reguero J.R., Hevia S., Iglesias-Cubero G., Alvarez V., Cortina A., Gonzalez P., Celada M.M., Medina A. and Coto E. Synergistic Effect between Apolipoprotein E and Angiotensinogen Gene Polymorphisms in the Risk for Early Myocardial Infarction // Clinical Chemistry 46, 2000. — Vol. 12:1910–1915.
10. Garte S. et al. Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, December 2001. — Vol. 10:1239–1248.
11. Hobbs C.A., Sherman S.L., Yi P., Hopkins S.E., Torfs C.P., Hine R. Jean, Pogribna M., Rozen R., and S. Jill James. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism as Maternal Risk Factors for Down Syndrome // Am. J. Hum. Genet., 2000. — Vol. 67: 623–630.
12. Nebert D.W., Carvan M.J. Ecogenetics: from Biology to Health / / Toxicol. Industr. Health. — 1997. — Vol. 13:163–192.
13. Pinto X., Vilaseca M.A., Garcia-Giral N., Ferrer I., Pala M., Meco J.F., Mainou C., Ordova J.M., Grinberg D., Balcells S. and the Baix Llobregat. Homocysteine Study Group Homocysteine and the MTHFR 677C-T allele in premature coronary artery disease. Case control and family studies // European Journal of Clinical Investigation. — 2001. — Vol. 31:24–30.
14. Yoshimura K., Hanaoka T., Ohnami Sh., Ohnami S., Kohno T., Liu Y., Yoshida T., Sakamoto H., Tsugane S. Allele frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 40 candidate genes for gene-environment studies on cancer: data from population-based Japanese random samples // J. Hum Genet. — 2003. — Vol. 48:654–658.

#### Analysis of ACE, AGTR1, eNOS, MTHFR, MTRR and APOE genes polymorphisms in the population of North-West of Russia

O.S. Glotov<sup>1,2</sup>, A.S. Glotov<sup>1,2</sup>, O.A. Tarasenko<sup>1</sup>, T.E. Ivaschenko<sup>1</sup>, V.S. Baranov<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ott's Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS, St-Petersburg, Russia;  
<sup>2</sup>St-Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

✿ SUMMARY: Estimation of population-specific frequencies of relevant polymorphisms in normal control population remains the major prerequisite of these studies. The polymorphisms of seven genes (ACE, AGTR1, eNOS, MTHFR, MTRR, APOE) associated with some multifactorial diseases (cardiovascular diseases, diabetes) were studied by PCR-RFLP analysis in North-West population of Russia. The group consisted of unrelated individuals of middle age (25–45) (59 men and 58 women). Distribution of relevant polymorphisms frequencies for MTHFR, MTRR, APOE, eNOS and AGTR1 genes was similar in our samples compared to these ones in some and European populations (Spain and Germany). Low frequency of D/D genotype and high frequency of I/I genotype were found in Russian compared to Spain population (D/D — 29,6 and 41%, I/I — 26,1 and 15%, respectively). No significant statistical differences in distribution of ACE polymorphisms were found between Russian and Scotland populations (D/D — 31%, I/I — 20%). This population specific differences for the polymorphisms of some genes and its obvious similarity for the other ones were disclosed.

✿ KEY WORDS: genetic predisposition, polymorphism, association, population, gene ACE, gene AGTR1, gene ENOS, gene MTHFR, gene MTRR, gene APOE, multifactorial disease, renin-angiotensin system, cardiovascular system.