

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Щеглова Н.Е., Калинин М.Н., 2014
УДК: [616.12-008.331.1+616.127-004]-02:612.6.05

**ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN4*, *DROSHA*
У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ
И ПОСТИНФАРКТНЫМ КАРДИОСКЛЕРОЗОМ**

Н.Е. Щеглова, М.Н. Калинин

ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России, г. Тверь

Обследовано 50 мужчин, разделенных на две группы, в зависимости от наличия верифицированного диагноза гипертонической болезни (ГБ) или постинфарктного кардиосклероза (ПИКС). Проведен анализ ассоциации полиморфизмов генов, участвующих в биогенезе микрорибонуклеиновых кислот (микроРНК), таких как *AGO1* (A/G), *DGCR8* (G/A), *GEMIN4* (A/G), *DROSHA* (A/C) с частотой встречаемости ГБ и ПИКС. Обнаружена ассоциация между генотипом AA гена *GEMIN4* и риском развития ГБ. Полученные данные свидетельствуют о важной роли данного генотипа в патогенезе ГБ, хотя механизмы реализации его эффектов остаются до конца не изучены.

Ключевые слова: полиморфизм генов, гипертоническая болезнь, постинфарктный кардиосклероз, микроРНК.

Процессы атеросклероза, тромбоза и артериальной гипертензии являются наиболее распространенными патологиями сердечно-сосудистой системы, а гипертоническая болезнь (ГБ) и ишемическая болезнь сердца (ИБС) наиболее частыми сердечно-сосудистыми заболеваниями, приводящими к смертельному исходу [5].

В свете последних представлений, в этиологию сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, ГБ и атеросклероза наряду с неблагоприятными факторами окружающей среды существенный вклад вносят генетические составляющие [3, 10]. Изучение генов, участвующих в патогенезе многофакторных заболеваний, представляет проблему из-за большого количества генов-кандидатов и сложного комплексного взаимодействия генетических и средовых факторов [4].

В современных исследованиях при изучении полиморфизмов генов особое внимание уделяется изучению генов, вовлеченных в биогенез микрорибонуклеиновых кислот (микроРНК), и, тем самым,

выраженно влияющих на микроРНК-зависимую клеточную регуляцию в условиях развития различных патологических процессов, включая атерогенез, ИБС и ГБ [13, 14]. При этом доказано, что микроРНК (класс малых некодирующих молекул рибонуклеиновых кислот) играют особую роль в патологии заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как гипертрофия и ишемия миокарда, аритмии, а также участвуют в метаболизме липопротеинов [11, 12]. В число данных генов включают *DROSHA*, *DGCR8*, *RAN*, *XPO5*, *DICER*, *AGO1*, *AGO2*, *HIWI*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *TRBP* [13, 14]. Так, анализ нокаутных мышей показывает, что потеря *DROSHA* в гладко-мышечных клетках сосудов у мышей приводит к множественным эмбриональным дефектам, включая тяжелые кровоизлияния в печень, гипоплазию сосудистой стенки и эмбриональную летальность, а прямая супрессия (knockdown) генов *DROSHA*, *DICER*, *DGCR8* – регуляторов процессинга микроРНК в клетках аденокарциномы легких

мышы – приводит к усилению пролиферации и трансформации клеток [15].

Выше сказанное свидетельствует о несомненной важности получения новых данных, расширяющих современные представления о значении генных полиморфизмов в генетическом контроле развития распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Цель исследования – изучение особенностей полиморфизмов генов (*AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN4*, *DROSHA*), участвующих в биогенезе микроРНК, в группах больных с ГБ и постинфарктным кардиосклерозом (ПИКС).

Материалы и методы

Было обследовано 50 мужчин, находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении Областной клинической больницы города Твери.

Сформированы выборки из двух групп сравнения. I группа состояла из 30 пациентов, страдающих ГБ. Средний возраст больных с ГБ составил $53 \pm 11,7$ лет. Критерии групповой принадлежности: наличие ГБ I-II стадии без систолической дисфункции миокарда левого желудочка [6] и отсутствие на момент обследования диагноза ИБС. Во II группу были включены 20 мужчин, имеющих в анамнезе подтвержденный клинически инфаркт миокарда. Средний возраст данной группы составил $59 \pm 8,1$ лет. Критерии включения в данную группу больных: наличие верифицированного диагноза ПИКС.

Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом, сопутст-

вующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови и нарушениями обмена веществ, отягощенным аллергологическим анамнезом, аллергическими заболеваниями и профессиональными вредностями.

В сыворотке крови у всех обследованных определяли содержание общего холестерина (ОХС) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП). Забор крови у пациентов производился после 14-часового ночного голодания. Концентрации ОХС и ХС ЛПВП определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе FP – 901 (Labsystems, Финляндия).

При определении оптимальных уровней показателей липидного спектра плазмы руководствовались рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов (V пересмотр, 2012) [1].

Для выделения тотальной геномной ДНК применяли сорбентный метод с использованием набора «Diatom DNA Prep 100» («Лаборатория «Изоген», Россия). Однонуклеотидные полиморфизмы (табл. 1) типировали с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора праймеров и аллель-специфических гибридационных зондов («Applied Biosystems», США). В качестве детектирующего амплификатора использовали систему регистрации ПЦР «ABI Prism 7500» («Applied Biosystems», США).

Таблица 1

Полиморфизмы изученных генов-кандидатов, участвующих в биогенезе микроРНК

Ген	Локализация гена	Полиморфизм
<i>AGO1</i>	1p34.3	A/G (rs636832)
<i>DGCR8</i>	22q11.21	G/A (rs3757)
<i>GEMIN4</i>	3q21-q25	A/G (rs7813)
<i>DROSHA</i>	5p13.3	A/C (rs4867329)

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных подходов, используемых при прове-

дении популяционно-генетических исследований [7]. Аналогичные методы статистической обработки были использова-

ны другими авторами в своих работах для такого же количества выборки, равной 50-60 человек [2]. Сравнение частот встречаемости наблюдаемых аллелей и генотипов оценивалось на предмет соответствия закону Харди-Вайнберга с использованием метода χ^2 . Для вычисления этих показателей использовалась программа DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Оценку риска проводили с помощью показателя отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Количественные изменения показателей в ходе эксперимента оценивались по t-критерию Стьюдента для независимых переменных. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования представлены в таблицах 2 и 3.

При анализе генов-кандидатов *AGO1*, *DGCR8*, *DROSHA* достоверных различий между группами больных ГБ и ПИКС получено не было ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей полиморфизмов исследуемых генов

Ген	Генотип	Распределение генотипов, n (%)				Критерий различий при df=1, χ^2 (p)
		Больные ГБ, n = 30		Больные ПИКС, n = 20		
		N	%	N	%	
<i>AGO1</i>	AA	1	3,3	0	0	p > 0,05
	GG	27	90	19	95	p > 0,05
	AG	2	6,7	1	5	p > 0,05
<i>DGCR8</i>	GG	19	63,3	11	55	p > 0,05
	AA	4	13,3	3	15	p > 0,05
	GA	7	23,4	6	30	p > 0,05
<i>GEMIN4</i>	AA	17	56,7	4	20	5,203 (0,023)*
	GG	5	16,7	9	45	p > 0,05
	AG	8	26,6	7	35	p > 0,05
<i>DROSHA</i>	AA	9	30	2	10	p > 0,05
	CC	7	23,3	8	40	p > 0,05
	AC	14	46,7	10	50	p > 0,05

Примечание: * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$).

Как показано в таблице 3, обнаружена ассоциация между генотипом AA гена *GEMIN4* и риском развития ГБ. Частота встречаемости данного генотипа в группе больных ГБ оказалась значимо выше, чем у пациентов с ПИКС ($p = 0,01$, OR=5,23, 95% ДИ 1,40-19,42). Поэтому генотип AA гена *GEMIN4* можно рассматривать как генотип риска развития ГБ. Частота встречаемости генотипов GG и AG гена *GEMIN4* в исследуемых группах статистически значимо не различалась.

В исследованиях Wilker E.H. и др. доказано влияние полиморфизма данного

гена на уровни как систолического, так и диастолического артериального давления. Авторы отмечают, что регулирующая роль *GEMIN4* обусловлена его участием в биогенезе микроРНК, но прямые механизмы действия данного гена остаются до конца не изучены [8].

Полученные данные явились основанием для клинической оценки генотипа AA гена *GEMIN4* в исследуемых группах путем сравнения показателей ОХС и ХС ЛПВП. Анализ данных показал отсутствие связи между исследуемыми полиморфизмами и изменениями липидного

спектра крови. В группе пациентов, перенесших ПИКС, отмечалось статистически недостоверное ($p > 0,05$) повышение

уровня ОХС при отсутствии различий уровня ХС ЛПВП (табл. 3).

Таблица 3

Показатели ОХС и ЛПВП у больных ПИКС в зависимости от генотипов полиморфизма A/G гена GEMIN4

Полиморфизм A/G гена GEMIN4	ОХС, ммоль/л		ХС ЛПВП, ммоль/л		Различия достоверны <i>p</i>
	ГБ	ПИКС	ГБ	ПИКС	
Генотип AA	5,32±1,57	5,97±0,84	1,09± 0,35	1,05±0,17	$p > 0,05$
Генотип GG	5,79±0,93	5,96±0,94	1,17± 0,23	1,19±0,14	$p > 0,05$
Генотип AG	5,66±0,93	5,88±0,82	1,17±0,24	1,23±0,19	$p > 0,05$

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что изучаемые полиморфизмы генов не различаются по влиянию на липидный обмен. Можно предположить, что статистически значимое повышение частоты генотипа AA гена GEMIN4 у больных ГБ является отражением его преимущественного участия в механизмах ангиогенеза [9].

Выводы

В проведенном исследовании показано отсутствие статистического различия между частотой встречаемости полиморфизмов генов AGO1, DGCR8, DROSHA и риском развития ГБ и ПИКС у мужчин. Также не установлена связь между данными заболеваниями и количеством гомозигот по минорному аллелю G и гетерозигот гена GEMIN4. Только частота гомозиготного носительства мажорного аллеля A гена GEMIN4 оказалась значимо выше у больных ГБ в сравнении с группой пациентов с диагнозом ПИКС.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли генотипа AA гена GEMIN4 в патогенезе ГБ, хотя механизмы реализации его эффектов остаются до конца не изучены. Не исключено, что данный генотип может рассматриваться в качестве кандидата генотипа риска в развитии ГБ.

Литература

1. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации V пересмотр.

ВНОК, секция атеросклероза // Российский кардиологический журнал. – Приложение I. – 2012. – № 4(96).

2. Полиморфизм гена транспортера дофамина DAT1 и индивидуальная вариабельность оборонительного рефлекса сердца у человека / Л.И. Афтанс [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, №12. – С. 815-819.

3. Роль генетического полиморфизма в формировании атеросклероза сосудов нижних конечностей / М.Н. Катина [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. 93, № 3. – С. 513-516.

4. Структурные маркеры атеросклероза и генетические полиморфизмы в прогнозировании риска коронарных событий / Г.И. Назаренко [и др.] // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2008. – № 6. – С. 119-127.

5. Торшин И.Ю. Сосудистые заболевания сердца, мозга и молекулярные гены. Ассоциативные исследования и патофизиология сосудистых заболеваний / И.Ю. Торшин, О.А. Громова // Трудный пациент. – 2008. – №2-3. – С. 15-19.

6. Чазова И.Е. Диагностика и лечение артериальной гипертензии (Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертонии и Всероссийского научного общества кардиологов) / И.Е. Чазова, Л.Г. Ратова, С.А. Бойцов // Системные гипертензии. – 2010. – № 3. – С. 5-27.

7. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility / J.H. Moore [et al.] // *Journal of Theoretical Biology*. – 2006. – Vol. 241. – P. 252-261.
8. Black Carbon Exposures, Blood Pressure, and Interactions with Single Nucleotide Polymorphisms in MicroRNA Processing Genes / E.H. Wilker [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. – 2010. – Vol. 118, №7. – P. 943-948.
9. Genetic Variants in the MicroRNA Machinery Gene GEMIN4 Are Associated with Risk of Prostate Cancer: A Case-control Study of the Chinese Han Population / Liu J. [et al.] // *DNA AND CELL BIOLOGY*. – 2012. – Vol. 31, №7. – P. 1296-1302.
10. Kovacic S. Genetic Susceptibility to Atherosclerosis / S. Kovacic, M. Bakran // *Stroke Research and Treatment*. – 2012. – Vol. 2012: 362941.
11. Meola N. microRNAs and genetic diseases / N. Meola, V.A. Gennarini, S. Banfi // *PathoGenetics*. – 2009, 2:7. doi: 10.1186/1755-8417-2-7.
12. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism / N. Horie [et al.] // *J. Atheroscler Thromb*. – 2013. – Vol. 21. – P. 17-22.
13. miRNA Biogenesis Enzyme Drosha Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Survival / P. Fan [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8(4): e60888.
14. Mishra P.J. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine / P.J. Mishra, J.R. Bertino // *Pharmacogenomics*. – 2009. – Vol. 10(3). – P. 399-416.
15. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity / D. Gibbins [et al.] // *Nat Cell Biol*. – 2012. – Vol. 14(12). – P. 1314-1321.

SPECIFICS OF POLYMORPHISMS OF GENES OF *AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN4*, *DROSHA* IN PATIENTS WITH HYPERTENSION AND POST-INFARCTION CARDIOSCLEROSIS

N.E. Shcheglova, M.N. Kalinkin

A total of 30 men with hypertension and 20 men with post-infarction cardiosclerosis were examined. The analysis of association of polymorphisms of genes which participate in a biogenesis of microRNAs (miRNAs), such as *AGO1* (A/G), *DGCR8* (G/A), *GEMIN4* (A/G), *DROSHA* (A/C) with a frequency of hypertension and post-infarction cardiosclerosis is carried out. The association between a genotype of AA of a gene of *GEMIN4* and risk of development of hypertension is found. The results indicated about important role of this genotype in pathogenesis of hypertension, but mechanisms of realization of its effects aren't studied.

Keywords: *polymorphisms of genes, miRNAs, hypertension, post-infarction cardiosclerosis.*

Щеглова Наталья Евгеньевна – аспирант кафедры патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России».
170100, г. Тверь, ул. Советская, д. 4.
E-mail: natali.sh45@mail.ru.

Калинкин Михаил Николаевич – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой патологической физиологии, ректор, ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздрава России».
170100, г. Тверь, ул. Советская, д. 4.
E-mail: mnkalinkin@yahoo.com.