

В.В. Долгих¹, С.Е. Большакова¹, Е.С. Филиппов², М.В. Гомелля²**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА У ДЕТЕЙ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**¹ ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)² ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (Иркутск)

Проведено определение полиморфных вариантов генов фолатного цикла (C677T, A1298C, A66G) у детей с эссенциальной артериальной гипертензией, имеющих отягощенный и неотягощенный наследственный анамнез по тромбозам. Частота встречаемости низко функциональных аллелей полиморфизмов C677T и A1298C не превышала распространенность в общей популяции и согласовалась с данными, полученными в других исследованиях, при этом неблагоприятный генотип GG гена A66G встречался чаще, чем в популяции. Во всех группах обследованных детей наиболее часто имело место носительство в каком-либо одном из полиморфных генов, однако сочетание двух и даже трех неблагоприятных аллелей также встречалось с достаточной высокой частотой. Статистически значимых различий в распределении генотипов между группами выявлено не было.

Ключевые слова: гипертензия, полиморфизмы генов, гомоцистеин, гипергомоцистеинемия

VARIABILITY OF GENES OF FOLATE CYCLE IN CHILDREN WITH ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSIONV.V. Dolgikh¹, S.E. Bolshakova¹, E.S. Philippov², M.V. Gomellya²¹ Scientific Centre of Family Health Problems and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

We realized the definition of polymorphic variants of genes of folate cycle (C677T, A1298C, A66G) in children with essential hypertension, having the burdened and not burdened hereditary anamnesis of thrombosis. Frequency of the incidence of low functional allele polymorphisms C677T and A1298C didn't exceed ubiquitous in the general population and in agreement with those obtained in other studies, with an unfavorable genotype GG A66G gene was more frequent than in the population. In all groups of children studied most often occurred in the carriage of any one of the polymorphic genes, but the combination of two or even three adverse alleles also met with relatively high frequency. No statistically significant differences in the distribution of genotypes between groups were found.

Key words: hypertension, gene polymorphisms, homocysteine, hyperhomocysteinemia.

В структуре заболеваемости и смертности населения экономически развитых стран лидирующее место занимают заболевания сердечно-сосудистой системы. По данным ВОЗ, одним из основных заболеваний данной группы является эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ), которая среди детского населения выявляется с частотой 2,4–18% [5, 9]. В результате проведенных исследований установлено, что важным фактором развития и прогрессирования ЭАГ является развитие протромботических изменений (ПТИ) в системе гемостаза, что может привести к возникновению тромботических осложнений [6].

В последние годы в качестве одной из причин развития ПТИ гемостаза рассматривают гипергомоцистеинемия (ГГЦ). Исследователями в течение последних 15 лет установлено, что гомоцистеин (ГЦ) является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) — инфаркта миокарда, инсульта, венозной тромбоэмболии [11, 14]. Повышенный уровень ГЦ усиливает тромбообразование. Показано, что при увеличении уровня ГЦ в плазме на 2,5 $\mu\text{моль/л}$ риск инфаркта миокарда возрастает на 10%, а риск инсульта — на 20%. Также установлено, что ГГЦ является серьезным предиктором смертности людей с предшествующими ССЗ [3, 13].

Важным фактором, способствующим росту ГЦ в крови, является наследственная предрасположенность, обусловленная дефицитом основных ферментов, участвующих в фолатном обмене — 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), метионинсинтазы-редуктазы (MTRR), метионинсинтазы (MTR). Полиморфизмы генов, кодирующих данные ферменты, вместе с генами II и V факторов свёртываемости крови, вносят большой вклад в развитие тромботических состояний [7].

Поиск генетических вариантов, предрасполагающих к ГГЦ и повышенному риску тромбоза, является актуальной задачей. В этой связи особый интерес представляет аллельный полиморфизм генов, продукты которых непосредственно вовлечены в процессы метаболизма ГЦ.

Цель исследования: определить частоту встречаемости и распределение генотипов полиморфизмов C677T, A1298C гена MTHFR и A66G гена MTRR у детей с ЭАГ, отягощенным и неотягощенным наследственным анамнезом по развитию тромбозов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 80 детей, страдающих ЭАГ, в возрасте от 9 до 18 лет, находившихся на лечении в педиатрическом отделении клиники ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН г. Иркутска в период с 2007 по

2009 г. Все больные были разделены на группы: I группа — 46 детей с ЭАГ и отягощенной наследственностью по эпизодам тромбоза, средний возраст — $15,33 \pm 0,20$ лет; II группа — 34 ребенка с ЭАГ и неотягощенным наследственным тромботическим анамнезом, средний возраст — $15,01 \pm 0,21$ лет. Контрольная группа (III группа) включала 33 практически здоровых ребенка с неотягощенным генеалогическим тромботическим анамнезом, средний возраст — $15,88 \pm 0,0639$ лет. Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Сбор анамнеза осуществлялся при беседе с ребенком и его родителями, а также с помощью анализа данных амбулаторной карты (Ф112у). В ходе опроса выяснялось наличие ишемического инсульта, инфаркта миокарда, варикозного расширения вен, тромбозов поверхностных и глубоких вен, а также наличие данных заболеваний в возрасте до 50—55 лет, у родственников I, II, III степени родства. Для выделения геномной ДНК были использованы образцы венозной крови. Определение полиморфизмов генов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-экспресс» фирмы «Литех» по протоколу производителя. Амплификацию полиморфных участков генов проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Полученные амплификаты разделяли методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в течение 15 минут, в присутствии бромистого этидия. Визуализация результатов электрофореза осуществлялась с помощью УФ-транслюминатора «Vilber Lourmat».

В исследовании использовались вычислительные методы математической статистики, реализованные в лицензионном интегрированном статистическом пакете комплексной обработки данных STATISTICA 6.1 (Stat-Soft Inc., США) (правообладатель лицензии — ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Низкофункциональные варианты генов MTHFR и MTRR, по мнению ряда авторов, могут рассматриваться как фактор риска развития отдельных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистой патологии [3, 11, 14].

Наиболее распространенным и клинически значимым молекулярным дефектом, приводящим к развитию ГЦ, является полиморфизм C677T гена MTHFR, в котором нуклеотид цитозин (С) в позиции 677 заменен тимидином (Т). При исследовании данного полиморфизма установлено, что у 5—16% популяции наблюдается гомозиготность по носительству аллеля Т, который обуславливает термолабильность и снижение активности кодируемого фермента и приводит к почти 10-кратному повышению риска ГЦ [10]. В исследовании Е.А. Калашниковой (2006) у русских, не имевших в анамнезе эпизода тромбоза, гетерозиготная форма данного полиморфизма была выявлена в 39,06% случаев, гомозиготная — в 8,51%. При сосудистых заболе-

ваниях неблагоприятный генотип встречается с частотой от 17 до 28%. Большое число исследований посвящено изучению взаимосвязи полиморфизма C667T гена MTHFR с риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [15]. Имеются данные об ассоциации полиморфизма C667T с венозными и артериальными тромбозами, риск развития которых особенно возрастает у гомозигот по низкофункциональному аллелю Т [14].

В результате проведенного нами молекулярно-генетического исследования полиморфизма C677T в гене MTHFR у детей с ЭАГ и отягощенным наследственным анамнезом по развитию тромбозов нормальный генотип С/С обнаружен у 26 обследованных (56,5%). Гетерозиготная форма мутации (генотип С/Т), частота которой в популяции, по данным различных источников, достигает 40—60% [10], среди обследованных пациентов была определена у 20 человек (43,5%). Носителей гомозиготного патологического генотипа Т/Т, при котором отмечается выраженное снижение активности фермента (до 70% от нормы), что значительно повышает риск развития ГЦ, среди детей с ЭАГ и отягощенным анамнезом отмечено не было.

У подростков, страдающих ЭАГ, но имеющих неотягощенный генеалогический анамнез по развитию тромбозов, частота носительства генотипа С/С была выше, чем среди детей I группы и составила 61,8% ($p > 0,05$). При этом 1 пациент (2,9%) из данной группы имел гомозиготную форму Т/Т, ассоциированную с высоким риском развития сердечно-сосудистых осложнений. Носителями полиморфного варианта гена в гетерозиготном состоянии (С/Т-генотип) (снижение активности кодируемого фермента происходит на 30—35%) были 35,3% обследованных.

В группе практически здоровых детей с неотягощенным анамнезом аллель Т в гомозиготном состоянии выявлен не был. Частота встречаемости того же аллеля в гетерозиготном состоянии (С/Т-генотип) была ниже, чем в группах детей, страдающих ЭАГ (43,5% и 35,3% в I и II группах соответственно при 33,3% в III группе), однако достоверности данные различия не имели. Генотип С/С, обеспечивающий достаточную функциональную активность фермента MTHFR, у данной категории обследованных встречался в 66,7% случаев.

Таким образом, вероятность снижения активности фермента MTHFR и развития ГЦ был выше у детей с ЭАГ и отягощенным наследственным анамнезом, чем у здоровых подростков.

Другим полиморфным вариантом гена MTHFR является замена аденина (А) на цитозин (С) в позиции 1298. Причастность аллеля С к патологии, вызываемой повышенным уровнем ГЦ, окончательно не установлена. Ряд исследователей считают, что аллель С снижает активность фермента, хотя и не так значительно, как аллель Т полиморфизма C677T [2, 3, 8]. Также установлено, что индивидуумы, являющиеся компаунд-гетерозиготами по аллелям 677T и 1298C (генотип 677CT/1298AC), согласно некоторым исследованиям, имеют снижение активности

фермента на 40 – 50 % и биохимический профиль, схожий с профилем гомозиготных носителей аллеля 677Т [10]. Однако результаты, полученные в ходе других работ, свидетельствовали об отсутствии влияния как самого аллеля 1298С, так и его комбинации с аллелем 677Т на активность фермента, не приводя к ГГЦ [12].

В нашем исследовании носителями клинически значимого аллеля С в гетеро- и гомозиготном состоянии оказались 41,3 % и 8,7 % детей I группы, 38,3 % и 17,6 % обследованных II группы и 48,5 % и 12,1 % подростков III группы соответственно. Данные показатели распространенности генотипов между группами не имели статистически значимых различий. Нормальный генотип А/А чаще встречался у детей с ЭАГ и отягощенным тромботическим наследственным анамнезом (50 %), в то время как у подростков с неотягощенным анамнезом (II и III группы исследования) он был отмечен в 44,1 % и 39,4 % случаев соответственно ($p > 0,05$). Таким образом, полученные показатели распространенности неблагоприятных генотипов были сопоставимы с результатами других исследований по частоте встречаемости данного полиморфизма [1, 7].

Мутации в гене метионинсинтазы-редуктазы (MTRR), обеспечивающей обратное превращение ГЦ в метионин, также могут приводить к ГГЦ и высокому риску сердечно-сосудистых заболеваний. Так, полиморфизм А66G в гене MTRR в 4 раза снижает активность белка и приводит к развитию некоторых форм патологии, вызванных накоплением ГЦ в плазме [13]. Частота гетерозиготных носителей аллеля G в гене MTRR составляет около 45 – 50 %, а гомозиготных – 15 – 25 %. Преобладающим генотипом в популяции является генотип А/G. Имеются данные, свидетельствующие о том, что аллель G также усиливает ГГЦ, вызываемую полиморфизмом С677Т в гене MTHFR [11].

При определении данного полиморфизма у обследованных нами детей преобладающим генотипом также оказался А/G. Его частота в группах составила 45,6 %, 50,0 % и 57,6 % соответственно ($p > 0,05$). При этом показатели распространенности гомозиготной формы неблагоприятного полиморфного аллеля G превышали распространенность в общей популяции (I группа – 34,8 %; II группа – 41,2 %; III группа – 30,3 %) ($p > 0,05$). Таким образом, частота встречаемости генотипа А/А, обеспечивающего достаточную активность кодируемого фермента MTRR, оказалась несколько ниже, чем в общей популяции во всех трех группах исследования и составила 19,6 %, 8,8 % и 12,1 % соответственно.

Сочетание полиморфных аллелей в разных генах может значительно влиять на развитие той или иной патологии и усугублять ее течение. Рядом исследователей было отмечено значительное увеличение риска развития патологий, связанных с повышенным уровнем ГЦ в крови в случае наличия полиморфных аллелей в нескольких генах фолатного цикла по сравнению с полиморфизмом только в одном гене [4, 8]. Исходя из этого, нами был проведен анализ полученных результатов и уста-

новлено, что среди всех обследованных носителями нормальных генотипов во всех полиморфных генах (С677Т, А1298С, А66G) являлись только 4,3 % детей с ЭАГ и отягощенной наследственностью и 6,1 % детей из группы контроля ($p > 0,05$). Случаев носительства нормального генотипа по трем полиморфизмам у детей с ЭАГ и неотягощенным анамнезом выявлено не было. Мутацию только в одном из трех полиморфизмов имели 39,2 %, 35,3 % и 21,2 % детей I, II и III групп исследования соответственно ($p > 0,05$).

В литературе имеются данные о том, что неблагоприятные аллели С и G в меньшей степени, чем аллель Т, снижают активность ферментов, участвующих в фолатном обмене, и усиливают ГГЦ при сочетании с аллелем Т полиморфизма С677Т [13]. В нашем исследовании подобное сочетание в I, II и III группах исследования наблюдалось в 13,0 %, 14,7 % и 18,2 % случаев соответственно. Причем сочетание с аллелем G было отмечено с большей частотой, нежели с аллелем С ($p > 0,05$).

Носителями же мутаций одновременно во всех полиморфизмах в гомо- или гетерозиготной формах оказались 21,7 % детей I группы исследования, 20,6 % подростков II группы, 24,2 % детей III группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты, полученные в ходе проведенного нами исследования, согласуются с результатами предыдущих работ в этой области, направленных на определение распространенности полиморфизмов фолатного обмена. Частота встречаемости низко функциональных аллелей полиморфизмов С677Т и А1298С в нашем исследовании не превышала распространенность в общей популяции и согласовалась с данными, полученными в других исследованиях, при этом неблагоприятный генотип GG гена А66G встречался чаще. Во всех группах обследованных детей наиболее часто имело место носительство в каком-либо одном из полиморфных генов, однако сочетание двух и даже трех неблагоприятных аллелей также встречалось с достаточно высокой частотой. Статистически значимых различий в распределении генотипов между группами выявлено не было.

Несмотря на отсутствие у детей клинически значимых тромбозов, ПТИ в системе гемостаза, риск развития которых увеличивается при наличии неблагоприятного генотипа, ведущего к развитию ГГЦ, является потенциально опасным, создавая реальные предпосылки для возникновения тромбозов, особенно на фоне течения ЭАГ.

Активное выявление больных с наследственной предрасположенностью к тромбозам необходимо для своевременного проведения у них наиболее эффективных профилактических мер по предупреждению развития тромботических осложнений, особенно в ситуациях повышенного риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетически обусловленные тромбофилические состояния как фактор риска ишемических на-

рушений мозгового кровообращения у пациентов молодого возраста / И.В. Зорилова, С.Н. Иллариошкин, О.Ю. Реброва [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. — 2006. — № 18. — С. 17–25.

2. Генетические факторы риска развития венозных тромбозов в молодом возрасте / А.М. Шейдина, О.В. Сироткина, С.Н. Пчелина [и др.] // Вопросы современной педиатрии. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 42–46.

3. Гомоцистеин — предиктор патологических изменений в организме человека / И.И. Мирошниченко, С.Н. Птицына, Н.Н. Кузнецова [и др.] // РМЖ. — 2009. — № 4, Т. 17. — С. 224–228.

4. Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Коваленко Т.Ф. Частоты мутаций в генах фактора V (FV Leiden), протромбина (G20210A) и 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (C677T) у русских // Медицинская генетика. — 2006. — № 7. — С. 37–39.

5. Мелигицкая А.В., Яковлева Л.В., Бурангулова А.В. Факторы риска артериальной гипертензии у детей и подростков // Казанский медицинский журнал. — 2007. — Т. 88, № 5. — С. 444–446.

6. Нечесова Т.А. Антигипертензивная терапия и профилактика инсультов // Медицинская панорама. — 2004. — № 4. — С. 32–34.

7. Популяционное исследование частоты полиморфизма C677T гена метилентетрагидрофолатредуктазы в Якутии / М.Г. Спиридонова, В.А. Степанов, Н.Р. Максимов [и др.] // Генетика. — 2004. — Т. 40, № 5. — С. 704–708.

8. Современные подходы к диагностике наследственных форм тромбофилии / Е.С. Вашукова,

А.С. Готов, Т.Э. Иващенко [и др.] // Российский педиатрический журнал. — 2008. — № 5. — С. 48–53.

9. Типы гемодинамики при артериальной гипертензии, их изменения под влиянием физической нагрузки / А.Н. Мухтарова, А.Г. Автандилов, Н.Н. Никитина [и др.] // Клиническая медицина. — 2007. — № 12. — С. 39–43.

10. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity / I. Weisberg, P. Tran, B. Christensen [et al.] // Mol. Genet. Metab. — 1998. — Vol. 64. — P. 169–172.

11. Moat S.J. Plasma total homocysteine: instigator or indicator of cardiovascular disease? // Ann. Clin. Biochem. — 2008. — Vol. 45. — P. 345–348.

12. No association between the MTHFR A1298C and transcobalamin C776G genetic polymorphisms and hyperhomocysteinemia in thrombotic disease / H. Zetterberg, A. Coppola, A. D'Angelo [et al.] // Thromb. Res. — 2002. — Vol. 108. — P. 127–131.

13. Potter K. Homocysteine and cardiovascular disease: should we treat? // Clin. Biochem. Rev. — 2008. — Vol. 29. — P. 27–30.

14. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population — results from the HUNT 2 study / I.A. Naess, S.C. Christiansen, P.R. Romundstad [et al.] // Br. J. Haematol. — 2008. — Vol. 141. — P. 529–535.

15. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk // J. Appl. Genet. — 2008. — Vol. 49. — P. 267–282.

Сведения об авторах

Долгих Владимир Валентинович — доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

Большакова Светлана Евгеньевна — младший научный сотрудник лаборатории клинической генетики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; e-mail: bolgleb@mail.ru)

Филиппов Евгений Семенович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии ФПК и ППС ГБОУ ДПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1)

Гомелля Марина Владимировна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры педиатрии ФПК и ППС ГБОУ ДПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1)