

Гены, ассоциированные с нарушениями липидного обмена и регуляции артериального давления, и психовегетативные изменения у молодых, относительно здоровых лиц

Шварц Ю. Г.¹, Елькина А. Ю.¹, Акимова Н. С.¹, Мартынович Т. В.¹, Федотов Э. А.²

¹ГБОУ ВПО “Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского”

Минздрава России. Саратов; ²ООО “Медицинский Di центр”. Саратов, Россия

Цель. Изучить связь полиморфизма генов *APOC3*, *PON1*, *AGT*, *AGTR1* и психовегетативных нарушений у молодых, относительно здоровых лиц.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 75 здоровых добровольцев европеоидной расы в возрасте 20-25 лет. Психовегетативный статус оценивался с использованием тестов для выявления панических атак, оценки уровня тревоги, а также при помощи опросника для выявления вегетососудистой дистонии (ВСД). Критерием исключения было наличие органической патологии сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Полиморфизм генов идентифицировали методом пиросеквенирования дезоксирибонуклеиновой кислоты с помощью системы генетического анализа “PyroMark Q24”.

Результаты. Наличие вегетососудистой дистонии, панических атак, а также повышенного уровня тревожности в большей степе-

ни было ассоциировано с присутствием в генотипе аллеля Т полиморфизма -482 С>Т гена *APOC3*, аллеля М полиморфизма L55M А>Т гена *PON1* и аллеля А — полиморфизма А1666С А>С гена *AGTR1*.

Заключение. Имеется связь полиморфизма генов, участвующих в обмене липидов и регуляции артериального давления, с психовегетативным статусом молодых, относительно здоровых лиц.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, панические атаки, вегетативная дистония.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2016; 15(6): 53–57
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2016-6-53-57>

Поступила 22/03-2016

Принята к публикации 08/09-2016

The genes associated with lipid metabolism disorders and with blood pressure regulation, and psychovegetative changes in the young almost healthy persons

Shvarts Yu. G.¹, Elkina A. Yu.¹, Akimova N. S.¹, Martynovich T. V.¹, Fedotov E. A.²

¹V. I. Razumovskiy Research Institute of Cardiology of Saratov Medical University. Saratov; ²ООО “Medical Center Di”. Saratov, Russia

Aim. To assess the relation of polymorphism of the genes *APOC3*, *PON1*, *AGT*, *AGTR1* and psychovegetative disorders in young, relatively healthy persons.

Material and methods. Totally, 75 healthy volunteers included, white race, aged 20-25 y.o. Psychovegetative status was assessed with tests for panic attacks revealing, anxiety level assessment, as with the questionnaire for vegetovascular dystony. The inclusion criteria was organic pathology of cardiovascular and central nervous system. Genes polymorphism was identified with the method of pyrosequencing of desoxyribonucleic acid with the genetic analysis equipment “PyroMark Q24”.

Results. The presence of vegetovascular dystony, panic attacks and increased level of anxiety was mostly associated with the presence of T polymorphism -482 С>Т gene *APOC3*, allele M polymorphism L55M А>Т gene *PON1* and allele А — polymorphism А1666С А>С gene *AGTR1*.

Conclusion. There is relation of genes polymorphism playing role in lipids metabolism and arterial pressure regulation, with psychovegetative status of the young, relatively healthy persons.

Key words: genetic polymorphism, panic attacks, vegetative dystony.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2016; 15(6): 53–57
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2016-6-53-57>

АД — артериальное давление, ВСД — вегетососудистая дистония, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, SNP — Single-nucleotide polymorphism (полиморфизм единичных нуклеотидов), PHQ — Patient Health Questionnaire Panic Screening Questions — Опросник для выявления панических атак.

Введение

Вегетативные и психологические расстройства у лиц молодого возраста, безусловно, сказываются на качестве жизни, и увеличивают риск развития артериальной гипертензии и проявлений атеро-

склероза [1]. Наряду с этим очевидна вероятность “обратного” влияния ведущих факторов кардиоваскулярного риска на проявление психовегетативных расстройств, при этом данные расстройства, в частности — вегетососудистая дистония (ВСД),

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел.: +7 (987) 832-22-34

e-mail: hromyh.anastasiya@mail.ru

[Шварц Ю. Г. д.м.н., профессор, зав. кафедрой факультетской терапии лечебного факультета, Елькина А. Ю.* — интерн кафедры, Акимова Н. С. — д.м.н., ассистент кафедры, Мартынович Т. В. — ассистент кафедры, Федотов Э. А. — зав. отделением лабораторной диагностики].

часто создают диагностические и лечебные проблемы для практикующего кардиолога.

Вероятно, одним из факторов, влияющих на психовегетативный статус, может быть метаболизм липидов, поскольку холестерин является важным структурным компонентом головного мозга, обеспечивающим его нормальное функционирование. Холестерин участвует в образовании клеточных мембран, миелиновых оболочек, синтезе ряда гормонов [2]. Лабильность артериального давления (АД), в частности наследственно обусловленная, также играет не последнюю роль в возникновении психовегетативных нарушений.

Перспективным направлением в этом контексте является изучение генома человека и идентификация генов, мутации которых предрасполагают к развитию психовегетативных и сосудистых нарушений, и, в частности исследование влияния полиморфизма генов, участвующих в обмене липидов и регуляции АД, на вероятность развития подобных расстройств.

Наиболее частой причиной различий в структуре генов являются точечные мутации — замены единичных нуклеотидов, или, так называемый, полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP — single-nucleotide polymorphism) [3]. Появляется все больше сообщений, что именно SNP, за счет формирования специфических аллелей генов, вносят важный вклад в фенотипические различия между людьми, в т.ч. касающиеся психовегетативного статуса и предрасположенности к целому ряду заболеваний [4]. В этой связи анализ полиморфизма нуклеотидов генов, ассоциированных с факторами кардиоваскулярного риска, при развитии психовегетативных нарушений может быть весьма интересен.

Цель исследования — изучить связь полиморфизма генов *APOC3*, *PON1*, *AGT*, *AGTR1* и психовегетативных нарушений у молодых, относительно здоровых лиц.

Материал и методы

В исследовании после информированного согласия приняли участие 75 здоровых добровольцев в возрасте 20–25 лет (средний возраст — 21,4 лет), из них 36 мужского пола. Результаты проведенного обследования сообщались участникам только по их желанию. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом.

Учитывая индивидуальность генетической структуры различных популяций, в исследование включались только лица европеоидной расы. Психовегетативный статус оценивали с использованием тестов для выявления панических атак PHQ (Patient Health Questionnaire Panic Screening Questions), для оценки уровня тревоги, а также при помощи опросника для выявления вегетативных изменений (Вейн А. М., 1998г). Критерием исключения стало наличие органической патологии сердечно-сосудистой и центральной нервной систем, выявление которой проводилось путем сбора жалоб, анамнеза и объективного обследования.

Полиморфизм генов идентифицировали методом пиросеквенирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с помощью системы генетического анализа “РугоMark Q24”. Пиросеквенирование — метод определения нуклеотидной последовательности в режиме реального времени, основанный на детекции высвобождающегося пирофосфата при элонгации цепи ДНК в результате синтеза второй цепи ДНК на матрице одноцепочечной ДНК. Высвобождающийся пирофосфат проходит серию ферментативных реакций, в результате чего регистрируется хемилюминесцентный сигнал. Совокупность сигналов соответствует нуклеотидной последовательности анализируемого генетического локуса [5].

Материалом для исследования являлась венозная кровь, взятая в вакуумную пробирку с антикоагулянтом K_2 ЭДТА. Для экстракции ДНК использовали набор реагентов “ДНК-сорб-В” (производство ЦНИИ Эпидемиологии, г. Москва, кат. номер 103-20) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

После экстракции ДНК проводили амплификацию исследуемых генетических локусов со специфическими биотинилированными праймерами. Использовали коммерческие наборы реагентов производства ЦНИИ Эпидемиологии, г. Москва “АмплиСенс Пироскрин ЛИПО-скрин-Д” и “АмплиСенс Пироскрин ТОНО-скрин” (кат. номера РМQ-013-50-Ф и РМQ-004-50-Ф, соответственно). Амплификацию проводили на приборе MAXYGENE (Axugen, США) по программе: 95° — 15 мин (1 цикл); 95° — 15 сек, 60° — 15 сек, 72° — 20 сек (45 циклов); 72° — 2 мин (1 цикл).

Продукты амплификации связывали с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином, для очистки и получения одноцепочечных фрагментов ДНК. Затем определяли нуклеотидную последовательность исследуемых генетических локусов в реакции пиросеквенирующей синтеза на приборе РугоMark Q24 (Qiagen, Германия) с использованием набора реагентов РугоMark Gold Q24 (Qiagen) и секвенирующих праймеров из соответствующих наборов “АмплиСенс Пироскрин” (указаны выше). При исследовании полиморфизмов применяли следующие последовательности для анализа:

APOC3-455 C>T (rs2854116): CAC/TCCCCCAGCCCAAG
APOC3-482 C>T (rs2854117): CT/CGGTCTTCTGT
PON1 L55M A>T (rs854560): A/TGTCTTTCAGA
PON1 Q192R A>G (rs662): T/CGTAAAGTAGG
AGT T207M C>T (rs4762): G/ATGGACAGCA
AGT M268T T>C (rs699): A/GTCAGGGAGCA
AGTR1 A1666C A>C (rs5186): A/CTTAGCTACT

Поскольку объектом исследования являются охарактеризованные полиморфные локусы в геноме человека и положение однонуклеотидного полиморфизма известно, автоматическая обработка результата программным обеспечением прибора на основании относительной высоты пиков на пирограмме определяет гомо- или гетерозиготное состояние по полиморфному локусу со 100% специфичностью и чувствительностью.

Ген *APOC3* кодирует аполипопротеин C3, который входит в состав липопротеинов очень низкой плотности, ингибирует липазы печени, тем самым участвуя в процессе распада триглицеридов и развитии атеросклероза и другой кардиоваскулярной патологии [6–9]. Анализировались две точечные мутации гена *APOC3*: -455 T>C (rs2854116) и -482C>T (rs2854117).

Таблица 1

Взаимосвязь панических атак, уровня тревожности, наличия ВСД и полиморфных вариантов генов *APOC3*, *PON1*, *AGT*, *AGTR1*

	<i>APOC3</i> -482 C>T rs2854117	<i>PON1</i> L55M A>T rs854560	<i>PON1</i> Q192R A>G rs662	<i>AGT</i> T207M C>T rs4762	<i>AGT</i> M268T T>C rs699	<i>AGTR1</i> A1666C A>C rs5186
Панические атаки	0,372*	0,417*	-0,133	-0,009	0,054	0,095
Уровень тревожности	0,561*	0,488*	-0,318	0,128	-0,016	-0,428*
ВСД (Вейн)	0,467*	0,641*	0,232	-0,012	-0,132	-0,309

Примечание: * — статистическая значимость корреляции ($p < 0,05$).

Ген *PON1* кодирует фермент параоксоназу 1, ответственный за гидролиз широкого спектра фосфорорганических соединений [10, 11]. Показано, что параоксоназа 1 обладает антиокислительным и антиатерогенным свойствами, препятствуя окислению липидов в липопротеины низкой плотности, дифференцировке моноцитов в макрофаги, захвату макрофагами окисленных липопротеинов низкой плотности и превращению их в пенистые клетки [12]. Изучался полиморфизм L55M A>T (rs854560) гена *PON1*.

Что касается гена, кодирующего ангиотензиновые рецепторы 1 типа (*AGTR1*), описано >50 его полиморфных вариантов, однако наибольшее клиническое значение имеет полиморфизм A1666C A>C (rs5186), который учитывался в настоящем исследовании.

Для обработки результатов использовались непараметрический корреляционный анализ (коэффициент Gamma), однофакторный и многофакторный дисперсионный анализы “ANOVA”, посредством программы Statistica-6.0. Распределение частот генотипов изучаемых генов у обследуемых лиц проверялось на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 .

Учитывая тот факт, что к изменению конечного продукта гена приводит наличие “мутантного” аллеля, находящегося в гомозиготном или гетерозиготном состоянии, а также относительно низкую частоту распространения в популяции гомозигот по “мутантному” аллелю, для статистической обработки полученных данных генотипы с наличием “мутантного” аллеля (гетерозиготы и гомозиготы) были объединены в одну группу, а дикие гомозиготы — в другую. Для корреляционного анализа гомозиготы по дикому гену кодировались как 1, гетерозиготы и гомозиготы по мутантному аллелю — 2.

Результаты

Распределение частот генотипов исследуемых генов у здоровых лиц соответствовало ожидаемому с учетом равновесия Харди-Вайнберга ($p > 0,98$).

У обследуемых лиц с ВСД, панические атаки и повышенный уровень тревожности часто выявлялись одновременно. Такие расстройства встречались у 53,3%, 68% и 66,7% обследуемых, соответственно.

Тесную взаимосвязь между данными психовегетативными нарушениями подтверждает статистический (коэффициент Gamma колебался от 0,78 до 0,83) и клинический анализы. Частота указанных

нарушений в представленном исследовании была существенно выше, чем в популяции [13].

При корреляционном анализе были выявлены статистически значимые взаимосвязи наличия ВСД, панических атак, а также уровня тревожности с полиморфными вариантами изученных генов (таблица 1). Было установлено, что наличие в генотипе исследуемых мутантного аллеля Т полиморфизма -482 C>T (rs2854117) гена *APOC3* ассоциировано с более частой распространенностью ВСД, панических атак и повышенным уровнем тревожности у молодых, относительно здоровых лиц. Подобные результаты были выявлены и при наличии “аллеля риска” в генотипе полиморфизма L55M (rs854560) гена *PON1*. В то же время, наличие аллеля С полиморфизма A1666C A>C (rs5186) гена *AGTR1* имело отрицательную корреляционную зависимость с уровнем тревожности. Достоверная взаимосвязь полиморфизма T207M C>T и M268T T>C гена *AGT* с наличием психовегетативных нарушений отсутствовала.

Результаты корреляционного анализа были дополнены и подтверждены анализом распределения частот полиморфных вариантов генов в зависимости от особенностей психовегетативного статуса. Наличие ВСД, панических атак, а также повышенного уровня тревожности в большей степени было ассоциировано с наличием в генотипе мутантных аллелей полиморфизма -482 C>T гена *APOC3* и L55M A>T гена *PON1* и диких — полиморфизма A1666C A>C гена *AGTR1* (таблица 2).

Обсуждение

Распределение частот полиморфизма -482 C>T (rs2854117) гена *APOC3*; L55M (rs854560) гена *PON1*; A1666C A>C (rs5186) гена *AGTR1* у обследованных позволяет считать выборку в основном репрезентативной. Типичность описываемого контингента также подтверждается взаимосвязью между ВСД, паническими атаками и уровнем тревожности. Высокая частота распространения психовегетативных изменений у обследуемых лиц по сравнению с распространенностью данных нарушений в популяции, возможно, связана с особенностью контингента, а именно: молодой возраст обследуемых,

Таблица 2

Взаимосвязь наличия панических атак, ВСД, повышенного уровня тревожности у лиц с “диким” и “мутантными” аллелями полиморфизма генов *APOC3*, *PON1*, *AGTRI*

Ген	<i>APOC3</i> -482 C>T rs2854117			p	<i>PON1</i> L55M A>T rs854560		p	<i>AGTRI</i> A1666C A>C rs5186		p
	Аллель гена	Дикий аллель	Мутантный аллель		Дикий аллель	Мутантный аллель		Дикий аллель	Мутантный аллель	
Панические атаки	Отсутствие %	57,1	42,9	0,08	60,0	40,0	0,16	60,0	40,0	0,5
	Наличие %	38,4	61,5		46,1	53,9		57,5	42,5	
Уровень тревожности	Отсутствие %	66,6	33,3	0,03	62,5	37,5	0,17	48,0	52,0	0,1
	Наличие %	38,0	62,0		48,0	52,0		64,0	36,0	
ВСД (Вейн)	Отсутствие %	61,5	38,5	0,04	73,0	26,9	0,01	48,0	52,0	0,1
	Наличие %	39,6	60,4		41,7	58,3		64,0	36,0	

а также с нарастанием в последние десятилетия частоты психологических расстройств [14].

По данным литературы, наличие в генотипе аллеля риска 482Т гена *APOC3* играет важную роль в развитии атеросклероза и метаболического синдрома, а также в увеличении риска развития ишемической болезни сердца [6-9]. Возможно, ассоциированное с присутствием мутантного аллеля данного полиморфизма гена *APOC3* наличие ВСД, панических атак и повышенного уровня тревожности обусловлено его опосредованным влиянием на нервную систему, через участие в регуляции процесса распада триглицеридов.

Полиморфизм L55M A>T (rs854560) гена *PON1* определяет содержание параоксоназы 1 в крови, а именно, наличие аллеля 55L в генотипе связано с более низким содержанием фермента по сравнению с вариантом 55M [10]. Однако более высокое содержание параоксоназы 1 у лиц-носителей аллеля 55M приводит к понижению стабильности параоксоназы 1, что может резко снижать ее активность, особенно под действием внешних факторов, например, таких, как курение [15]. Психовегетативные нарушения, ассоциированные с присутствием в генотипе 55M аллеля полиморфизма L55M A>T гена *PON1*, у обследованных лиц, вероятно, могут быть обусловлены меньшей стабильностью фермента параоксоназы в сыворотке крови, и, следовательно, снижением антиокислительных и антиатерогенных свойств данного фермента, что, в свою очередь, приводит к изменению функционирования нервной системы и развитию ее дисфункции. Необходимо отметить, что данных о непосредственной взаимосвязи этих полиморфизмов с какими-либо характеристиками центральной нервной системы в современной литературе обнаружить не удалось. Нельзя при этом исключить, что известное негативное значение тревожности в отношении прогноза развития кардиоваскулярных катастроф реализуется опосредованно, в т.ч. за счет ассоциации психовегетативных

нарушений с указанными генетическими факторами риска.

Что касается генов, связанных с регуляцией АД, то логично было бы предположить, что наличие в генотипе молодых лиц аллелей риска генов *AGT* и *AGTRI*, ассоциированных с повышенным содержанием ангиотензина II, что, как известно, негативно отражается на функции эндотелия и тоне сосудов, может быть связано с повышенным уровнем тревожности, наличием панических атак, ВСД [16]. Однако полученные результаты свидетельствуют об обратной зависимости данных психовегетативных изменений от полиморфизма A1666C A>C гена *AGTRI*. Возможно, при повышении активности рецептора, по механизму обратной связи, происходит снижение выработки ангиотензина II, что предупреждает появление психовегетативных нарушений в молодом возрасте. Очевидно, этот вопрос требует дальнейшего изучения, в т.ч. и с определением уровня ангиотензина II в сыворотке крови.

Учитывая сложность взаимодействия аллельных и неаллельных генов между собой, наличие множества средовых факторов, способных вносить изменения в психовегетативный статус и экспрессию генов, а также сложность формирования психовегетативных показателей, нельзя с уверенностью говорить о прямой зависимости данных характеристик от полиморфизма изучаемых генов. Вместе с тем, выявленные мутации могут являться маркером риска развития психовегетативных расстройств. Установленные в работе ассоциации — достаточное основание для дополнительных исследований механизмов развития сосудистой дистонии и артериальной гипертензии. С учетом числа обследованных эта работа может быть только “пилотной”, но при этом весьма полезной для проведения более масштабных исследований клинико-генетических ассоциаций.

Заключение

ВСД, панические атаки, а также повышенный уровень тревожности, вероятно, ассоциированы

с наличием в гено типе мутантных аллелей полиморфизма -482 C>T гена *APOC3* и L55M A>T гена *PON1* и диких — полиморфизма A1666C A>C гена *AGTR1*, что может свидетельствовать о прямом или опосредованном влиянии на регуляцию сосудистого тонуса и психовегетативный статус полиморфизма генов, участвующих в обмене липидов и контроле АД у молодых, относительно здоровых лиц.

дованном влиянии на регуляцию сосудистого тонуса и психовегетативный статус полиморфизма генов, участвующих в обмене липидов и контроле АД у молодых, относительно здоровых лиц.

Литература

- Allgulander C. Anxiety as a risk factor in cardiovascular disease. *Pub Med* 2016; 29(1): 13-7.
- Cathcart K, Patel A, Dies H, et al. Effect of Cholesterol on the Structure of a Five-Component Mitochondria-Like Phospholipid Membrane. *Pub Med*; 2015; 5(4): 664-84.
- Wang Z. SNP's, protein structure and disease. *Hum Mutat* 2001; 17: 263-70.
- Otowa T, Hek K, Lee M, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of anxiety disorders. *JAMA Psychiatry* 2015; 72(7): 642-50.
- Mironov KO, Dunaeva EA, Dribnohodova OP. Detection of genetic polymorphisms using genetic analysis systems based on pyrosequencing. *Modern medical technologies* 2011; 3: 39-41. Russian (Миронов К. О., Дунаева Е. А., Дрибноходова О. П. Детекция генетических полиморфизмов с помощью систем генетического анализа на основе пиросеквенирования. *Современные медицинские технологии* 2011; 3: 39-41).
- Olivieri O, Martinelli N, Girelli G, et al. Apolipoprotein C III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 463-71.
- Barrett HR, Chan DC, Ooi EMM, et al. Apolipoprotein C III: understanding an emerging risk factor. *Clin Sci* 2008; 114: 611-24.
- Crosby J, Peloso GM, Auer PL, et al. Loss-of-function mutations in *APOC3*, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med* 2014; 371(1): 22-31.
- Mendivil CO, Rimm EB, Furtado J, et al. Low-density lipoproteins containing apolipoprotein C-III and the risk of coronary heart disease. *Circulation* 2011; 124(19): 2065-72.
- Kurdjukov ID. Paraoxonase-1: genetic, biochemical and toxicological aspects. *Toxicological Review* 2011; 1:48-55. Russian (Курдюков И. Д. Параоксоназа-1: генетические, биохимические и токсикологические аспекты. *Токсикологический вестник* 2011; 1: 48-55).
- Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular disease: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16(4): 393-9.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286(1): 152-4.
- Fursova MV. Complex treatment of panic disorder. *Medical Scientific J* 2006; 3: 84-6. Russian (Фурсова М. В. Комплексное лечение панического расстройства. *Медицинский научно-практический журнал* 2006; 3: 84-6).
- Terri L, Kathryn P. The Experience of Panic Symptoms across Racial Groups in a Student Sample. *J Anxiety Disord* 2010; 24(8): 873-8.
- Mouhamed HD, Ezzaher A, Mechri A, et al. Effect of cigarette smoking on paraoxonase 1 activity according to PON1 L55M and PON1 Q192R gene polymorphisms. *Environ. Health Prev Med* 2012; 17(4): 316-21.
- Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the *AGTR1* 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007; 81(2): 405-13.