

Активность ангиотензинпревращающего фермента и полиморфизм гена рецептора ангиотензина II типа 1 при геморрагической лихорадке с почечным синдромом

Байгильдина АА., к.м. н., кафедра биологической и биоорганической химии Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа
Исламгулов ДВ., к. м. н., лаборатория молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа
Камилов Ф.Х., д.м.н., профессор, член-корр. РАЕН, кафедра биологической и биоорганической химии Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа
Хабелова Т.А., к. м. н., кафедра инфекционных болезней Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа
Миннихметов И.Р., лаборатория молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Angiotensin-converting enzyme activity and polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene at hemorrhagic fever with renal syndrome

Baygildina A.A., Islamgulov D.V., Kamilov F.Kh., Khabelova T.A., Minniakhmetov I.R.

Резюме

Цель исследования - изучение активности ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в сыворотке крови и полиморфизма гена рецептора ангиотензина II (AT II) 1 типа при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) как возможного предиктора заболевания. Обследованы 409 больных с серологически подтвержденным методом РНИФ диагнозом ГЛПС в возрасте от 15 до 65 лет. Активность АПФ определялась кинетически с использованием набора фирмы Buhlmann (Швейцария). Геномная ДНК из периферической крови выделялась методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование локусов изучаемой ДНК проводилось методом ПЦР синтеза ДНК. Активность АПФ зависит и от формы, и от периода ГЛПС: статистически незначимое снижение наблюдается только в лихорадочный период среднетяжелой и тяжелой формы без осложнений; во все остальные периоды и при всех формах наблюдается статистически значимая гиперактивность АПФ. При тяжелой форме без осложнений наблюдаются резкие колебания активности АПФ в динамике болезни. При осложненной форме имеет место статистически значимая стабильно высокая активность фермента на всем протяжении болезни. Анализ полиморфизма гена рецептора AT II 1 типа свидетельствуют о том, что аллели *A1166 и *C1166, а также, генотипы *A1166/*A1166 и *C1166/*C1166 не ассоциированы со степенью тяжести течения ГЛПС. Повышение активности АПФ при ГЛПС не носит адаптивный характер из-за дефектов в рецепции AT II и является адекватным метаболическим ответом организма в ответ на внедрение эндотелиотропного вируса. **Ключевые слова:** ангиотензинпревращающий фермент, ген рецептора ангиотензина II 1 типа, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.

Resume

The research aimed to explore the changes of angiotensin-converting enzyme (ACE) blood activity and polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene as disease predictor at hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). In examination 409 patients at the age of 15 - 65 years were involved. ACE blood activity with the help of Buhlmann (Switzerland) ACE kinetic test was determined. Blood genomic DNA by phenol- chloroformic extraction was isolated, genetic locuses by polymerase chain reaction of DNA synthesis were researched. It was shown that the ACE blood activity at HFRS is risen and these changes the significanter the severer form of disease. Nonsignificant rising of enzyme activity only in febrile period of both ungravic and gravic forms was observed. In gravic form significant changes of ACE activity are observed, in complicated form – stable high enzyme activity during all disease took place. Analysis of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism shown that alleles *A1166 and *C1166, genotypes *A1166/*A1166 and *C1166/*C1166 are not associated with HFRS severity. Made conclusion that high ACE activity is not adaptive reaction due to defect in angiotensin II binding and it is an adequate metabolic response of an organism to endotheliotropic virus action.

Keywords: angiotensin-converting enzyme, gene of angiotensin II type 1 receptor, hemorrhagic fever with renal syndrome.

Основными детерминантами здоровья являются немодифицируемые и некорректируемые факторы риска, и ведущим среди них, помимо пола и возраста, является наследственность [1]. В настоящее время широко изучается вклад

наследственных характеристик, влияющих на тяжесть течения заболеваний, вызванных воздействием различных – физических, химических, биологических - факторов окружающей среды с целью выделения групп повышенного риска развития той или иной патологии. Не случайно в последние годы значительное количество исследований посвящено поиску генов-кандидатов, ответственных за развитие различных заболеваний, в частности заболеваний, при которых основные патологические процессы разворачиваются прежде всего на уровне эндотелия сосудов, поскольку дисфункция эндоге-

Ответственный за ведение переписки -
 Байгильдина Асия Ахметовна
 450097, г. Уфа, бульвар Х. Давлетшиной, д. 18, кв. 101.
 Email: baigildinaasia@mail.ru,
 тел. 89173484738.

лия может иметь генетическую основу. Есть ряд работ, свидетельствующих об ассоциации полиморфных маркеров генов, кодирующих компоненты ренин-ангиотензиновой системы (генов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), ангиотензиногена, рецептора ангиотензина II (AT II) типа 1), с развитием артериальной гипертензии [2, 3, 4], с ИБС [5, 6], с дисфункцией эндотелия [7]; с хронической почечной недостаточностью и анурией [8] и др. Однако в доступной литературе отсутствуют сведения о влиянии генетических характеристик на развитие дисфункции эндотелия при заболеваниях инфекционной природы. В этой связи целью настоящего исследования явилось изучение активности АПФ и полиморфизма гена рецептора AT II 1 типа (AGTR1) как возможного предиктора развития гипертензии различной степени выраженности при заболевании вирусной этиологии - геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС).

Материалы и методы исследования

В исследование включили 409 больных с серологически подтвержденным методом непрямым флюоресцирующим антителом диагнозом ГЛПС (346 мужчин и 63 женщины) в возрасте от 15 до 65 лет (средний возраст $33,6 \pm 3,5$ лет), находившихся на стационарном лечении в МУ «Инфекционная клиническая больница № 4» г. Уфы и в отделении гемодиализа Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова в 2003-2009 годах. Критериями исключения из групп исследования были наличие в анамнезе гипертонической болезни, болезни сердца и сосудов, сахарного диабета, ревматизма, злокачественных заболеваний, заболеваний печени и почек. При определении степени тяжести ГЛПС использовали классификацию Б.З. Сиротина. Среднетяжелая форма выявлена у 252 больных (61,6%), тяжелая без осложнений – у 109 больных (26,7%), тяжелая с осложнениями – у 48 больных (11,7%). Группу контроля составили 52 практически здоровых лица, сопоставимых по полу и возрасту.

Для определения активности АПФ взятие крови объемом 5 мл производили путем венепункции локтевой вены утром натощак. Собранныю в специальные пробирки без антикоагулянтов кровь выдерживали 2 часа при температуре 18°C, после чего центрифугировали при температуре 4°C и 1000g и собирали сыворотку. Образцы сыворотки крови для анализа хранили при температуре -20°C не более 6 месяцев. Активность АПФ в сыворотке крови определяли кинетическим методом с использованием набора фирмы Böhlmann (Швейцария). Абсорбция света регистрировалась с помощью ИФА-ридера «Bench mark» компании «Bio-Rad». Для генетического исследования пробы венозной крови брали в пробирки типа вакутейнера с ЭДТА. ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [9]. Анализ полиморфизма A1166C гена AGTR1 проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с последующим ферментативным гидролизом с использованием эндонуклеазы рестрикции BstDEI "СибЭнзим". Результаты амплификации оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромидом этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете. В результате амплификации участка гена AGTR1, содержащего нуклеотидную замену A1166C, полу-

чали ампликон длиной 225 п.о. Ампликон, содержащий аллель *C1166, несет сайт узнавания фермента рестрикции BstDEI, и, расщепляясь, образует продукты размером 110 и 115 п.о., в то время как фрагмент ДНК, содержащий аллель *A1166, остается нерасщепленным. Наличие фрагмента длиной 225 п.о. после обработки BstDEI соответствует генотипу *A1166/*A1166, двух фрагментов (110 и 115 п.о.) - генотипу *C1166/*C1166 и трех (110, 115 и 225 п.о.) – гетерозиготному генотипу *A1166/*C1166.

Обработку результатов исследования проводили с использованием стандартного статистического пакета программ Statistica 7.0 и SPSS 13. Результаты исследования активности АПФ оценивали методами непараметрической статистики: определяли медиану (Me), интерквартильный интервал (Q1 и Q3), достоверность межгрупповых различий средних величин оценивали при помощи критерия Манна-Уитни. Результаты исследования представляли как Me [Q1;Q3]. При сравнении частот генотипов, аллелей в группах больных ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания использовали критерий 2 (хи-квадрат) Пирсона. Для всех видов анализа различия принимали за значимые при $p < 0,05$.

Результаты

Определение активности АПФ в сыворотке крови больных ГЛПС показало, что она в равной степени зависит и от периода заболевания, и от степени его тяжести (табл. 1). Лихорадочный период заболевания при среднетяжелой форме характеризуется статистически незначимой тенденцией к снижению активности АПФ, в остальные периоды данной формы наблюдается статистически значимый рост активности фермента с пиком в период полиурии – в 3,1 раза выше значений для контроля (рис. 1). Аналогичная тенденция к изменению изучаемого показателя имеет место и при тяжелой форме болезни без осложнений. Однако, несмотря на сходную со среднетяжелой формой динамику, активность фермента в полиурический период и в период восстановленного диуреза неосложненной формы ГЛПС достигает более высоких значений (в 3,5 раз выше контрольных значений) вплоть до статистически значимых различий в последний период не только с группой контроля, но и между данными группами больных при восстановлении диуреза. Осложненная форма ГЛПС имеет отличную от остальных форм болезни динамику изменения активности АПФ: гиперактивность энзима без значительных колебаний от периода к периоду регистрируется в течение всей болезни также с максимумом в полиурический период – в 3,3 раза выше контрольных значений – и со статистически незначимой тенденцией к снижению в период восстановленного диуреза. При присоединении осложнений статистически значимыми становятся не только различия с контролем, но различия со среднетяжелой и неосложненной формами болезни. Нормализации изучаемого показателя к периоду восстановленного диуреза при всех формах тяжести ГЛПС на фоне базисной терапии не происходит.

Тип полиморфизма, последовательность праймеров и номенклатура аллелей анализируемых полиморфных локусов гена рецептора ангиотензина II (AGTR1) I типа представлены в таблице 2. Результаты оценки распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса A1166C гена

Таблица 1. Активность АПФ в сыворотке крови больных ГЛПС различной степени тяжести на фоне базисной лекарственной терапии (мкмоль/лЧмин)

период заболевания	форма заболевания		
	среднетяжелая	тяжелая без осложнений	тяжелая с осложнениями
лихорадочный	12,4 [8,8; 18,2] p>0,07	9,7 [1,1; 14,1] p>0,06; p ₁ >0,9	49,0 [42,4; 50,3] p<0,002; p ₂ <0,006; p ₃ <0,006
олигоанурический	36,2 [28,2; 54,7] p<0,006	28,2 [21,2; 47,7] p<0,019; p ₁ >0,38	50,8 [45,9; 63,5] p<0,003; p ₂ <0,03; p ₃ <0,009
полиурический	55,0 [35,3; 71,5] p<0,0006	60,9 [50,6; 77,6] p<0,0002; p ₁ >0,2	59,2 [45,9; 70,6] p<0,0001; p ₂ >0,4; p ₃ >0,5
восстановленного диуреза	38,0 [34,4; 45,9] p<0,0001	56,5 [44,1; 59,0] p<0,0004; p ₁ <0,02	49,4 [42,4; 58,3] p<0,0001; p ₂ <0,03; p ₃ >0,14
контроль 18,05 [15,0; 21,5]			

Примечание: p – значимость различий с группой контроля;
 p₁ – значимость различий между среднетяжелой формой и тяжелой формой без осложнений;
 p₂ – значимость различий между среднетяжелой формой и тяжелой формой с осложнениями;
 p₃ – значимость различий между тяжелой формой без осложнений и тяжелой формой с осложнениями

AGTR1 у больных ГЛПС в зависимости от степени тяжести заболевания представлены в таблице 3. Во всех изученных выборках распределение частот генотипов соответствует распределению Харди - Вайнберга. Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфного локуса A1166C гена AGTR1 не выявил статистически значимых различия между группами больных с различной степенью тяжести ГЛПС (p>0,05). Имеет место равнозначное распределение частот генотипа *C1166/*C1166 в группах больных со средней и тяжелой формой UKGC (54% и 60% соответственно). Гетерозиготный генотип *A1166/*C1166 встречается почти на 10% больше у больных с средней тяжестью (42%) по сравнению с тяжелой формой ГЛПС (33%). У больных более тяжелой формой ГЛПС отмечается почти в 2 раза увеличение частоты генотипа *C1166/*C1166 (6,7%) по сравнению со средней степенью тяжести заболевания (3,9%) (рис.2).

Обсуждение

Основная часть АПФ синтезируется в эндотелии сосудов, в норме около 90% фермента фиксировано на эндотелиальной мембране и только около 10% его активности приходится на плазму крови. При ГЛПС, вызываемом эндотелiotропным вирусом, имеет место как гиперактивация, так и повреждение эндотелия [10, 11], что ведет, с одной стороны, к усиленной экспрессии АПФ, а с другой, - к отщеплению молекул фермента от поврежденных эндотелиоцитов и, как следствие, - к повышению пула плазменного АПФ. Нельзя исключить также усиленную экспрессию АПФ по принципу обратной связи вследствие отсутствия его прессорного эффекта в результате нарушения рецепции продукта катализируемой им реакции - АТ II. Нами выявлены значительные сдвиги в активности данного фермента в зависимости от тяжести ГЛПС и наличия осложнений: среднетяжелая форма характеризуется наименее выраженной по сравнению с осталь-

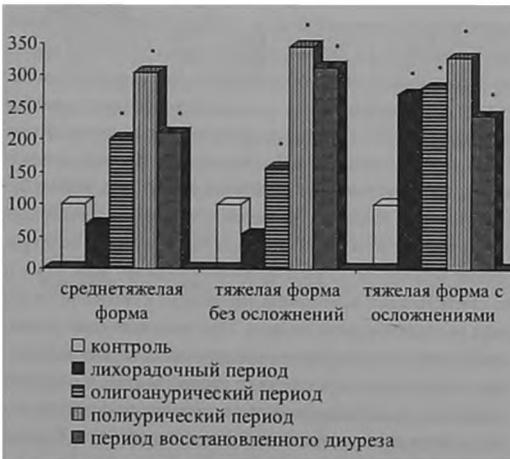


Рис. 1. Активность АПФ в сыворотке крови больных ГЛПС в зависимости от тяжести заболевания (% к контролю); * - статистическая значимость различий с контролем

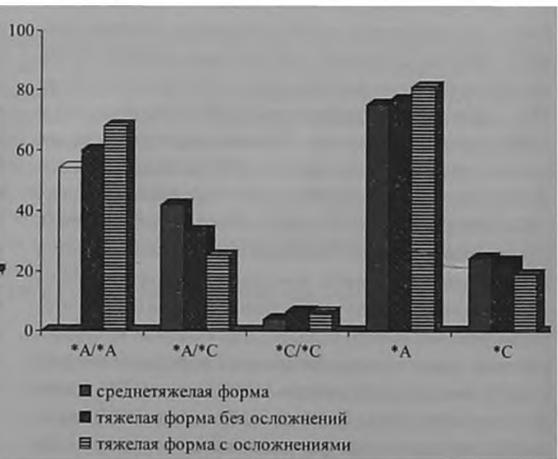


Рис. 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса A1166C генома AGTR1 у больных ГЛПС в зависимости от тяжести заболевания (%)

Таблица 2. Тип полиморфизма, последовательность праймеров и номенклатура аллелей анализируемых полиморфных локусов

Ген (ОМIM), локализация	Полиморфизм (аллели)	Праймеры (фермент рестрикции)
AGTR1 [106165] 3q21-q25	A1166C *A1166 - 225 п.о. *C1166 - (110 п.о.+115 п.о.)	5' GCACCATGTTTTGAGGTTGA 3' 5' TGTGGCTTTGCTTTGCTTG 3' (BstDEI)

Таблица 3. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса A1166C генома AGTR1 у больных ГЛПС различной степени тяжести заболевания

форма заболевания		генотипы			аллели	
		*A/*A	*A/*C	*C/*C	*A	*C
среднетяжелая	n	84	65	6	233	77
	pi±Sp, CI%	54,19±4,0	41,94±3,96	3,87±1,55	75,16±2,45	24,84±2,5
тяжелая без осложнений	n	54	30	6	138	42
	pi±Sp, CI%	60,0±5,16	33,33±4,97	6,67±2,63	76,67±3,15	23,33±3,2
тяжелая с осложнениями	n	32	12	3	76	18
	pi±Sp, CI%	68,09±6,8	25,53±6,36	6,38±3,57	80,85±4,06	19,15±4,1

Примечание: n – абсолютное число генотипов (аллелей); pi – частота; Sp – ошибка pi; 2 – xi квадрат; p – уровень значимости; df – число степеней свободы

ными формами болезни активностью фермента и отсутствием его «скачков» в динамике, при тяжелой форме заболевания без осложнений имеет место выраженный подъем активности к периоду развития полиурии, а при наличии осложнений гиперактивность АПФ наблюдается на всем протяжении заболевания со статистически значимыми межгрупповыми различиями. Изучение полиморфизма гена рецептора AT II типа показало, что аллели *A1166 и *C1166, а также генотипы *A1166/*A1166, *A1166/*C1166 и *C1166/*C1166 не ассоциированы с со степенью тяжести течения ГЛПС, что позволяет сделать вывод о том, что гиперактивация АПФ при ГЛПС не обусловлена нарушенной рецепцией AT II из-за отсутствия вазкулярного эффекта и может быть расценена как вполне адекватная реакция макроорганизма в ответ на метаболические изменения, первоначально обусловленные действием хантавируса – возбудителя ГЛПС.

Выводы

1. У больных ГЛПС выявлено статистически значимое повышение в крови активности АПФ, зависящее от периода и от степени тяжести заболевания.

2. Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфного локуса A1166C гена ангиотензина II AGTR1 не выявил статистически значимых различия между группами больных с различной степенью тяжести ГЛПС.

3. Повышение активности АПФ при ГЛПС, особенно выраженное при тяжелой форме, не носит адаптивный характер из-за дефектов в рецепции AT II при ГЛПС и является адекватным метаболическим ответом организма в ответ на внедрение эндотелиотропного вируса. ■

Литература:

1. Stronks K., Van de Mheen H., Loomon J. et al. Behavioural and structural factors in health: an empirical analysis. *Sociology of health and illness* 1996; 18: - 653-74.
2. Fan H., Li S., Gu W. et al. Association between angiotensin II type 1 receptors gene and human essential hypertension. *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chi* 1998; 1015 (2): 101-3.
3. Jiang X., Sheng H., Li J. et al. Jiang, X. Association between renin-angiotensin system gene polymorphism and essential hypertension: a community-based study. *J Hum Hypertens* 2009; 3: 176-81.
4. Palatini P., Ceolotto G., Dorigatti F. et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts development of hypertension and metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2009; 2: 208-14.
5. Bonnardeaux A., Tiret L., Poirier O. et al. Synergistic effects on angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor gene polymorphism on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344 (3): 910-13.
6. van Geel P.P., Pinto Y.M., Zwinderman A.H. et al. Synergistic effects of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on ischemic events. *XX Congress of the European society of Cardiology [abstract]*; p. 386.
7. Беркович О.А., Баженова Е.А., Вахрамеева Н.В. и др. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы и дисфункции эндотели у мужчин, перенесших инфаркт миокарда в молодом возрасте. *Артериальная гипертензия* 2008; 14 (3): 239-44.
8. Gribouval O., Gonzales M., Neuhaus R. et al. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nature Genet* 2005; 37: 964-8.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М: Мир; 1984.
10. Камиллов Ф.Х., Байгильдина А.А. Состояние целостности эндотелия сосудов при ГЛПС. *Морфологи* 2008; 4: 72.
11. Камиллов Ф.Х., Байгильдина А.А. Экспрессия VCAM-1 как отражение активации эндотелия при ГЛПС. *Морфологи* 2008; 2: 57.