

УЧЕТ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА G894T и T786C В ПЕРВИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.В. Зинчук, д-р. мед. н., профессор, **Д.Д. Жадько**, к.б.н., **Т.Л. Степура**, к.б.н.
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Цель работы – оценка распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов G894T и T786C гена эндотелиальной синтазы оксида азота у молодых мужчин. Обследовано 79 добровольцев. При оценке встречаемости генотипов полиморфизма G894T у исследуемых установлено, что генотип GG имеется у 49,4 %, генотип GT – у 44,3 %, генотип TT – 6,3 %. Генотип TT полиморфизма T786C выявлен у 36,7 % обследуемых, генотип TC – у 48,1 %, генотип CC – у 15,2 %. Полученные результаты указывают на наличие определенных вариантов распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов G894T и T786C гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, сердечно-сосудистые заболевания, первичная профилактика.

ACCOUNTING G894T и T786C GENETIC POLYMORPHISM IN PRIMARY DISEASE PREVENTION

V.V. Zinchuk, MD, professor, D.D. Zhadko, PhD, T.L. Stepuro, PhD
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

The study objective was to assess allele and genotype frequency distribution of endothelial nitric oxide synthase gene G894T and T786C polymorphisms in males. There were examined 79 healthy young males. Assessment of prevalence of genotypes of G894T polymorphism in subjects showed that GG genotype was present in 49.4% of subjects, GT genotype – in 44.3% subjects, and TT genotype – in 6.3% of subjects. The TT genotype of T786C polymorphism was found in 36.7% of subjects was investigated, TC genotype – in 48.1% of subjects, and CC genotype – in 15.2% of males of this sample. The obtained results show presence of particular variants of allele and genotype frequency distribution the G894T and T786C polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene.

Key words: genetic polymorphism, cardiovascular diseases, primary prevention.

Введение. Монооксид азота в организме обеспечивает реализацию важных физиологических функций, а нарушение его продукции может привести к развитию заболеваний кардиологического и сосудистого профиля [1]. Важное значение в процессах образования NO имеет полиморфизм T786C (rs2070744) гена эндотелиальной синтазы монооксида азота, опосредующий замещение в позиции 786 тимина цитозином, что ведет к уменьшению продукции эндотелиального NO [2] и G894T (Glu298Asp, rs1799983), обуславливающий в 894 позиции в экзоне 7 замену гуанина тимином, что ведет к замене в 298 позиции фермента NO-синтазы глутамина аспарагином и, соответственно, снижение базальной продукции оксида азота [3].

Исследования последних лет свидетельствуют об участии данных полиморфизмов в возникновении патологии. Так, проведенный в исследовании [4] мета-анализ показал, что риск острого нарушения мозгового кровообращения с повреждением тканей мозга значительно повышен у европейцев, имеющих генотип CC в сравнении с TT (ОШ=0,53, 95% ДИ = 0,29–0,98, p=0,160), а также у афро-американцев – носителей аллеля C при сопоставлении с T-носителями (OR = 0,42, 95% ДИ = 0,21–0,87), кроме того, было отмечено значительное увеличение риска возникновения данной патологии у представителей азиатской популяции также в модели C – T (ОШ=1,14, 95% ДИ = 1,02–1,28, p=0,990), в свою очередь стратифицированный анализ среднего возраста выявил, что носители аллеля C в возрасте 60–65 лет входят в группу риска по указанному заболеванию в сравнении с носителями аллеля T (ОШ=1,16, 95% ДИ = 1,03–1,31). В исследовании [5] по поиску взаимосвязей между полиморфизмом T786C и развитием ишемической болезни сердца определено, что наличие минорного аллеля является фактором риска возникновения указанной патологии (ОШ=1,739, ДИ=1,215–2,490) по сравнению с лицами, не имеющими минорного аллеля в генотипе.

Обнаружена ассоциация генотипа TT полиморфизма G894T со стенокардией (отношение шансов (ОШ) = 10,2; ДИ=1,51–68,8; p=0,025), в свою очередь установлена наиболее высокая встречаемость генотипа GT у лиц, имеющих в семье родственников с заболеваниями коронарных артерий [6]. Анализ литературных источников по базам данных Medline, Embase и Wangfang по состоянию на 1 января 2013 года с участием 8547 пациентов и 9117 лиц контрольной группы показал, что генотип TT полиморфизма G894T в высокой степени связан с риском развития ишемического инсульта в сравнении с генотипами, имеющими аллель G (ОШ=1,25, 95% ДИ=1,09–1,42, p<0,001) [7].

В этой связи важным является определение в молодом возрасте генотипов данных полиморфных вариантов с целью проведения профилактических мероприятий при определенном сочетании аллелей, входящем в группу риска по сердечно-сосудистым заболева-

ниям. Целью работы явилась оценка распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов G894T и T786C гена эндотелиальной синтазы оксида азота у молодых мужчин.

Материалы и методы. Объектом исследования явились здоровые молодые мужчины 18–24 лет (n=79), уроженцы Гродненской области. Добровольность участия подтверждалась письменным информированным согласием. Забирали кровь минимум через 12 часов после последнего приема пищи из локтевой вены в состоянии покоя в шприц 5 мл, содержащий 0,5 мл антикоагулянта (3,8 % раствора цитрата натрия). Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Определение полиморфных вариантов по локусам T786C и G894T, проводили методом полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени. Выделение ДНК осуществляли набором реагентов «ДНК–ЭКСПРЕСС–КРОВЬ» («Литех», РФ), предназначенным для выделения геномной ДНК из лейкоцитов цельной венозной крови. Выявление каждого полиморфного варианта гена проводили с помощью соответствующего набора реактивов производства «Синтол» (РФ). Набор реагентов состоял из нескольких компонентов, включающих Taq ДНК–полимеразу, разбавитель, 2,5–кратную реакционную смесь с двумя аллель–специфичными зондами, помеченными различными флуорофорами. Рабочую реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя, исходя из количества исследуемых образцов, а также трех положительных и отрицательного контролей. Амплификацию исследуемого локуса ДНК проводили на амплификаторе Rotor Gene–Q («Qiagen», Германия). Дискриминацию аллелей осуществляли средствами программного обеспечения амплификатора, в основе которых лежит зависимость интенсивности флуоресценции соответствующего красителя и количество копий исследуемого участка гена. В ходе анализа полученных результатов проверяли соответствие контрольных генотипов заявленным.

Распределение частот генотипов исследуемых полиморфных локусов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 Пирсона. Статистический анализ проводили общепринятыми методами с помощью программного обеспечения Statistica, Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Нами была проведена оценка распределения частот аллелей полиморфизмов G894T и T786C у мужчин. Распределение полиморфных вариантов изучаемого гена в данной выборке не отклонялось от равновесия Харди–Вайнберга, что свидетельствует об отсутствии сторонних влияний (мутации, дрейф генов, не случайное скрещивание) на генетическую структуру данной выборки. При изучении частот распределения аллелей полиморфизма G894T установлено, что из 79 испытуемых у 93,7 % в генотипе присутствует аллель G, в то время как аллель T наличествует у 50,6 % добровольцев. Оценка распределения частот аллелей полиморфизма T786C у данной категории испытуемых показала, что у 84,8 % добровольцев в генотипе имеется аллель T, в то время как аллель C был найден в генотипе 63,3 % испытуемых.

При оценке встречаемости генотипов полиморфизма G894T у обследуемых лиц нами было выявлено, что гомозиготный доминантный генотип (GG) имеется у 49,4 % выборки. Гетерозиготный генотип изучаемого полиморфизма был определен у 44,3 % тестируемых лиц. Частота встречаемости рецессивного гомозиготного генотипа (TT) у данного контингента составляет всего 6,3 %. Результаты свидетельствуют, что в данной выборке генотип TT встречается в 7,8 раза реже, чем генотип GG, и в 7,0 раза реже, чем генотип GT. При этом при сравнении наличия генотипов GG, GT, содержащих доминантный аллель G, с испытуемыми, имеющими гомозиготный рецессивный генотип TT видно, что частота его встречаемости в 14,8 раз ниже, чем генотипов, имеющих доминантный аллель G. В свою очередь, количество лиц, имеющих в генотипе рецессивный аллель T практически равно числу добровольцев, обладающих доминантным гомозиготным генотипом GG.

Оценка частоты распределения генотипов полиморфизма T786C у лиц, участвовавших в исследовании, показала, что гомозиготный генотип, включающий два доми-

нантных аллеля Т присутствует у 36,7 % обследуемых. Гетерозиготный генотип полиморфизма Т786С у данного контингента встречается в 48,1 % от всех изучаемых образцов крови, а генотип, имеющий два рецессивных аллеля С – всего у 15,2 % мужчин данной выборки. Следует отметить, что у изучаемой когорты испытуемых количество генотипов имеющих аллель Т (ТТ, ТС) в 5,6 раза больше, чем генотипа СС. В свою очередь, гомозиготный доминантный генотип ТТ наблюдается в 1,7 раза реже, чем генотипы имеющие аллель С. В целом, гетерозиготный генотип полиморфизма Т786С у обследуемых встречается в 1,3 раза чаще, чем гомозиготный доминантный генотип, и в 3,2 раза чаще, чем гомозиготный рецессивный генотип.

Изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов G894Т и Т786С проводится на различных популяционных выборках. Так, у представителей Китая (n=262) встречаемость генотипов GG, GT и TT полиморфизма G894Т была найдена как 46,2%, 37,8% и 16,0%, а частота аллелей G/T составила 34,9/65,1 [8]. У здоровых мужчин – жителей Египта (n=69) генотип GG присутствует у 53,6% обследованных, генотипы GT и TT – у 36,2, и 10,2%, соответственно, частоты аллелей G и T изучаемого полиморфизма составили 71,7% и 28,3% [9]. В работе [10] у греков (n=48) частота аллелей полиморфизма G894Т G vs T составила 65,8% vs 34,2%, генотипов в модели GG vs GT+TT составила 10,4% vs 89,6%, в модели TT vs GG+GT – 47,9% vs 52,1%. У уроженцев Польши (n=626) распределение генотипов GG, GT и TT составило 351 (56%), 225(36%) и 50 (8%), соответственно, частота аллелей G/T была установлена как 927 (0,74%) / 325 (0,26%) [11]. Частота генотипов GG, GT и TT у индийцев в исследовании [12] была найдена как 74,3%, 25,7% и 0% процентов, соответственно. У здоровых европейцев (n=306) в исследовании [13] распределение генотипов GG, GT и TT было выявлено как 135 (44,7), 130 (43,1), 37 (12,2), частота аллелей G/T составила 400 (66,2)/204 (33,8).

В исследовании на популяции греков [10] частота аллелей T/C полиморфизма Т786С была установлена как 31,3%/68,7%, встречаемость генотипов в модели TT vs TC+CC составила 10,4%/89,6%, в модели CC vs TT+TC – 47,9%/52,1%. У поляков (n=626) распределение генотипов TT, TC и CC составило 250 (40%), 276 (44%) и 100 (16%), соответственно, частота аллелей T/C была найдена как 776 (0,62%) / 476 (0,38%) [11]. Обширное исследование этногенетического разнообразия изучаемых полиморфизмов показало распределение генотипов TT, TC и CC полиморфизма Т786С у африканцев (n=189) – 77 (40,7%), 26 (13,8%) и 6 (3,2%), афроамериканцев (n=499) – 330 (61,1%), 160 (32,1%) и 9 (1,8%), европейцев (n=165) – 64 (38,8%), 77 (46,7) и 24 (14,5%), в то время как частота аллелей T/C была установлена как 180 (47,6)/38 (10,1), 740 (74,1)/98(9,8), 205 (62,1)/125 (37,9) у африканцев (n=378), афроамериканцев (n=998) и европейцев (n=330), соответственно [14]. У европейцев (n=306) распределение генотипов TT, TC и CC полиморфизма Т786С было выявлено как 101 (35,0), 148 (51,2), 40 (13,8), частота аллелей T/C составила 350 (60,6)/228 (39,4) [13].

Как видно, полученные нами данные о распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма G894Т и Т786С у жителей Беларуси в целом сопоставимы с результатами аналогичных исследований с участием представителей европейского, азиатского и американского регионов.

Выводы. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов G894Т и Т786С гена эндотелиальной NO–синтазы в исследуемой популяции сопоставимы с данными других исследований. Особенности распределения генотипов данных полиморфизмов необходимо учитывать при первичной профилактике сердечно–сосудистых заболеваний.

Список литературы:

1. Vasudevan D. et al. Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes // Nitric Oxide. – 2016. – № 59. – P. 54–62.
2. Cruz–González I. Et al. Association between –T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study // BMC Cardiovasc Disord. – 2009. – Vol. 9. – P. 35.
3. Mahmoodi K. et al. Association of Nitric Oxide Levels and Endothelial Nitric Oxide Synthase G894T Polymorphism with Coronary Artery Disease in the Iranian Population // Vasc Specialist Int. – 2016. – Vol. 32, №3. – 105–112.

4. Liu R. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and ischemic stroke susceptibility: a meta-analysis // *Int J Neurosci.* – Vol. 124, №9. – P. 642–651.

5. Han Y. Et al. T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population // *Pharmacology.* – 2010. – Vol. 85, №4. – P. 211–216.

6. García-González I. Et al. G894T (NOS3) and G1958A (MTHFD1) gene polymorphisms and risk of ischemic heart disease in Yucatan, Mexico // *Clin Investig Arterioscler.* – 2015. – Vol. 27, №2. – P. 64–73.

7. Guo X. Endothelial nitric oxide (eNOS) gene G894T and VNTR polymorphisms are closely associated with the risk of ischemic stroke development for Asians: meta-analysis of epidemiological studies // *Mol Biol Rep.* – 2014. – Vol. 41, №4. – P. 2571–2583.

8. Zhang G.P. et al. Correlation between polymorphism of endothelial nitric oxide synthase and avascular necrosis of femoral head // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. – Vol. 8, №10. – P. 18849–18854.

9. Gad M.Z. et al. Endothelial nitric oxide synthase (G894T) gene polymorphism in a random sample of the Egyptian population: comparison with myocardial infarction patients // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2012. – Vol. 16, №7. – P. 695–700.

10. Armenis I. Et al. Data on eNOS T786 and G894T polymorphisms and peripheral blood eNOS mRNA levels in Sick Cell Disease / *Data Brief.* – 2017. – Vol. 10. – P. 192–197.

11. Wrzosek M. Et al. Impact of obesity and nitric oxide synthase gene G894T polymorphism on essential hypertension // *J Physiol Pharmacol.* – 2015. – Vol. 66, № 5. – P. 681–689.

12. Nishevitha N.S., Angeline T., Jeyaraj N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298→Asp polymorphism (G894T) among south Indians // *Indian J Med Res.* – 2009. – Vol. 129, №1. – P. 68–71.

13. Kitsios G.D., Zintzaras E. An NOS3 Haplotype is Protective against Hypertension in a Caucasian Population // *Int J Hypertens.* – 2010. – [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2958494/>. – (дата обращения 25.03.2017).

14. Thomas B.N. et al. Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms // *Gene Regul Syst Bio.* – 2013. – Vol. 7. – P. 1–10.