

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ACE И MTHFR В ПОВРЕЖДЕНИИ ДНК И ПРОЛИФЕРАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Е.А.Павлющик<sup>1</sup>, В.Н.Сорокина<sup>2</sup>, Т.А.Чак<sup>2</sup>, В.Ю.Афонин<sup>1</sup>, А.В.Хапалюк<sup>2</sup>,  
Ю.С.Теплоухова<sup>1</sup>, М.В.Анисович<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение "Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси", ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь, e.pavlushchik@yandex.by;

<sup>2</sup> Белорусский государственный медицинский университет, просп. Дзержинского 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь, [bsmu@bsmu.by](mailto:bsmu@bsmu.by)

Артериальная гипертензия (АГ) является актуальной проблемой кардиологии в связи с широкой распространенностью, высокой преждевременной смертностью больных и последующими осложнениями в деятельности сердечно – сосудистой системы (ССС). По данным Всемирной организации здравоохранения, в большинстве изученных популяций каждый третий представитель взрослого населения страдает артериальной гипертензией. В Республике Беларусь синдром АГ установлен у более чем 1,5 миллиона лиц. Лечение АГ преимущественно осуществляется препаратами различного механизма действия, которые в большинстве случаев эффективны, однако индивидуальный ответ предугадать не возможно. Кроме того, неоднократно поднимался вопрос о канцерогенности многих классов лекарственных средств, применяемых для лечения заболеваний ССС [1 – 2]. У больных с повышенным уровнем повреждений ДНК, что может быть по причине нарушения системы репарации, действие таких лекарственных средств способно усугубить проблему. Таким образом, целью нашей работы стоит определить влияние полиморфизмов генов ангиотензинпревращающего фермента (ACE I/D) и метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR 677C>T) на повреждения ДНК и их природу у людей с АГ. Результаты могут послужить основой для целенаправленного подбора лекарственных средств и прогнозирования индивидуального ответа на лечение.

**Методы исследования.** Обследовано 89 пациентов в возрасте от 31 до 67 лет с диагнозом артериальной гипертензии (АГ). Больные на момент их случайного отбора в исследование находились на стационарном лечении в Республиканском госпитале МВД. Для всех критерием исключения являлся женский пол. Для исследуемой группы отбирались пациенты с АГ II и III стадии. Исключали пациентов, у которых имелись подтвержденный симптоматический характер АГ, наличие осложнений, таких как ОНМК, острый коронарный синдром, ХСН, ХПН, хроническая печеночная недостаточность, нарушения ритма, стенокардия ФК III-IV.

Пробы венозной крови больных брали в пробирки типа вакутейнера с ЭДТА. Кровь замораживали при –70 °С, затем выделяли ДНК с помощью набора «ДНК-сорб-Б» (Амплисенс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ полиморфных маркеров проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием следующих праймеров: прямой праймер 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3', обратный праймер 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3' для исследования гена ACE и прямой праймер 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3', обратный праймер 5'-AGGACGGTGCAGTGAGAGTG-3' для оценки полиморфизмов гена MTHFR. Амплификацию полиморфного участка гена ACE проводили на термоциклере SureCycler8800 (Agilent Technologies, США). Продукт амплификации либо визуализировали сразу методом электрофореза, как в случае с геном ACE, или подвергали рестрикции в термостате при 37°С в течение 16 ч с 0,5 мкл (5 Ед.) рестриктазы HinfI (New England Biolabs, США) при MTHFR генотипировании.

Молекулярно-биологические показатели измеряли методом проточной цитофлуориметрии, используя лазерный проточный цитометр FC 500 (Beckman Coulter,

США). На основании гистограмм распределения содержания ДНК в клетках изучали основные показатели клеточного цикла (распределение клеток по стадиям), частоту клеток с признаками апоптоза (гиподиплоидное содержание ДНК) и микроядрами. Для анализа крови венозную кровь пациентов забирали в пробирку, содержащую гепарин (Белмедпрепараты, Республика Беларусь). 100 мкл пробы смешивали с лизирующим буфером (Beckman Coulter, Франция), по истечении 10 мин центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 3 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (Beckman Coulter, Франция), тщательно перемешивали на Vortex и снова центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Процедуру отмывки повторяли еще раз. Фиксировали клетки в 70% охлажденном этиловом спирте и оставляли на ночь в морозильной камере. К промытым ФСБ клеткам добавляли рибонуклеазу А (Sigma, Германия) и окрашивали гипотоническим раствором пропидия йодида (CarlRoth, Германия) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте в полистерольных пробирках 12\*75мм. На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10 000 клеток. Клеточные циклы G0/G1, S, G2/M определяли, используя программу Multicycle Cell Cycle.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ «STATISTICA 7». Непрерывные переменные тестировали на нормальное распределение с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для определения воздействия полиморфизмов генов ACE и MTHFR на показатели клеточного цикла, частоту клеточной гибели и лейкоцитов с микроядрами использовали односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса (ANOVA). Сравнение групп попарно проводили с помощью U-критерия Манна – Уитни. Распределение генотипов проверяли на соответствие закону Харди – Вайнберга. Нулевую гипотезу отвергали в случае  $p < 0,05$ . Значения представлены в виде медианы (M) ± стандартное отклонение (Sd).

**Результаты и обсуждение.** У больных АГ среди 89 проанализированных аллелей полиморфного маркера I/D гена ACE несколько доминировал аллель D, частота встречаемости которого составила 56 %. Частота встречаемости аллеля I, соответственно, составила 44 %. Распределение генотипов гена ACE в выборке больных соответствует распределению Харди – Вайнберга (HWE  $p > 0,05$ ). В ходе изучения влияния генотипа гена ACE на молекулярно-биологические показатели лейкоцитов установлены некоторые различия, однако статистически значимой разницы обнаружено не было (табл.1). У пациентов с генотипом I/I несколько выше уровень клеточной гибели и ниже пролиферация по сравнению с больными, обладающими генотипами I/D и D/D ( $p > 0,05$ ). Уровень микроядер не отличался у групп с разными генотипами. Однако при анализе других генетических моделей наследования установлено, что влияние I/D и D/D одинаково ведет к накоплению клеток на стадии G2/M клеточного цикла по сравнению с генотипом I/I ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1. Молекулярно – биологические показатели лейкоцитов периферической крови больных АГ в зависимости от полиморфизма гена ACE (n=89, M±Sd)

	I/I, n=16	I/D, n=46	D/D, n=27	ANOVA, p-value
Апоптоз,%	4,10±2,21	3,45±3,35	3,82±4,11	p>0,05
G1/G0,%	97,85±3,07	97,16±2,20	97,32±2,05	
S,%	0,26±3,03	0,32±2,68	0,34±1,36	
G2/M,%	0,99±1,80*	1,84±2,31	1,96±1,72	
Микроядра,%	0,84±1,55	0,83±3,05	0,84±5,68	

Примечание: \* -  $p < 0,05$  между группами больных с I/I и I/D + D/D генотипами (U - критерий Манна – Уитни);

Распределение генотипов гена MTHFR в выборке больных соответствует распределению Харди – Вайнберга (HWE  $p > 0,05$ ). Частота аллеля С составила 73,9%,

аллеля Т – 26,1%. Анализ показателей пролиферации, клеточной гибели и микроядер в зависимости от полиморфизмов гена MTHFR показал, что у пациентов с генотипом С/Т уровень апоптотических клеток значительно ниже по сравнению с больными – обладателями генотипа С/С ( $p>0,05$ ). При анализе генетических моделей наследования установлен рецессивный тип наследования апоптоза, предполагая что Т – это минорный аллель. Так, в группах пациентов с генотипами С/Т и Т/Т процент клеточной гибели значительно меньше по сравнению с пациентами с С/С генотипом ( $p<0,05$ , табл.2). Учитывая данные о связи Т/Т генотипа гена MTHFR и развития различных форм онкозаболеваний, включая злокачественные новообразования кровеносной системы [3], можно предположить, что клетки людей с таким генотипом или аллелем Т имеют тенденцию не подвергаться апоптозу – процессу, который оказывается нарушен при прогрессировании рака. В этом случае, причиной нарушения баланса гибели и размножения клеток может служить недостаточное метилирование ДНК, в том числе и онкогенов, что имеет место при сниженной активности фермента метилентетрагидрофолатредуктазы у людей с заменой С>Т в гене MTHFR. У людей больных лейкемией с генотипом С/С установлен статистически значимо увеличенный процент апоптотических В – клеток по сравнению с людьми с генотипом ТТ [4], что также соответствует полученным нами данным.

Таблица 2. Молекулярно-биологические показатели лейкоцитов периферической крови больных АГ в зависимости от полиморфизма гена MTHFR (n=89, M±Sd)

	C/C, n=50	C/T, n=33	T/T, n=6	ANOVA p-value
Апоптоз,%	4,53±3,61*	3,16±3,07^	2,86±2,93	p>0,05
G1/G0,%	97,17±2,71	97,55±3,16	96,39±2,92	
S,%	0,40±2,30	0,25±2,75	0,32±1,40	
G2/M,%	1,80±1,84	2,03±2,23	3,33±3,16	
Микроядра,%	0,86±3,50	0,84±4,68	0,59±0,83	

Примечание: ^ –  $p<0,05$  сравнение пациентов с генотипами С/С и С/Т; \* –  $p<0,05$  между группами больных с С/С и С/Т + Т/Т генотипами (U - критерий Манна – Уитни);

Установлено влияние комбинаций генов ACE и MTHFR на регистрируемый процент клеток G1/G0 стадии клеточного цикла (табл.3). Отмечен следующий характер влияния: у больных с генотипом D/D с увеличением числа «мутантных» аллелей гена MTHFR снижался процент клеток на стадии покоя G1/G0, тогда как у больных с генотипом I/D, с увеличением числа «мутантных» аллелей гена MTHFR, уровень лейкоцитов в стадии покоя увеличивался. Анализ не показал статистически значимой разницы в других показателях проточной цитофлуориметрии.

Таблица 3. Молекулярно-биологические показатели лейкоцитов периферической крови больных АГ в зависимости от числа «мутантных» аллелей ACE и MTHFR (n=89, M)

№ п/п	Число «мутантных» (D и T) аллелей		n	Апоптоз	G1/G0	S	G2/M	Микроядра
	ACE	MTHFR						
1	0	0	11	4,53	96,7 $p_{1-4}=0,047$	0,89	0,99	1,52
2	1	0	25	3,73	96,8 $p_{2-4}=0,02$	0,33	1,86	0,76
3	2	0	14	4,71	98,1	0,4	1,53	0,67
4	0	1	5	2,11	98,6 $p_{4-9}=0,03$	0,14	0,99	0,72

5	0	2	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
6	1	1	18	3,45	97,4 p <sub>6-4</sub> =0,04	0,37	2,12	0,93
7	1	2	3	1,89	98,6 p <sub>7-9</sub> =0,049	0,29	0,51	0,68
8	2	1	10	2,6	96,5 p <sub>8-4</sub> =0,03	0,12	2,27	1,4
9	2	2	3	3,82	95,1 p <sub>3-9</sub> =0,03	0,34	4,87	0,4
ANOVA p-value				0,46	0,046	0,97	0,12	0,58

**Заклучение.** Полученные данные свидетельствуют о формировании в периферической крови больных артериальной гипертензией определенных «клеточных фенотипов», которые проявляются на уровне молекулярно-биологических маркеров, регистрируемых методом проточной цитометрии. Так, отмечается наличие определенных ассоциаций отдельных генотипов гена MTHFR с клеточной гибелью лейкоцитов и гена ACE с G2/M стадией клеточного цикла. Комбинации полиморфизмов генов ACE и MTHFR оказывают влияние на G1/G0 стадию. Дополнительные исследования различных популяций желательны для подтверждения и определения роли генов ACE и MTHFR в гибели и пролиферации лейкоцитов.

#### Литература:

- [1] Grossman E, Messerli FH, Goldbourt U. Carcinogenicity of cardiovascular drugs. *Curr Hypertens Rep* 1999;1:212-8.
- [2] Sica DA. Diuretic-related side effects: development and treatment. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2004 Sep;6(9):532-40.
- [3] Jiang N, Zhu X, Zhang H, Wang X, Zhou X, Gu J, Chen B, Ren J. The relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and hematological malignancy. *Clin Lab*. 2014;60(5):767-74.
- [4] Nüchel H, Frey UH, Dürig J, et al. Nieman DC, Miller AR, Henson DA, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 677C>T and 1298A>C polymorphisms are associated with differential apoptosis of leukemic B cells in vitro and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. // *Leukemia* 2004 Nov;18(11):1816-23.

### GENE POLYMORPHISMS ACE AND MTHFR AGAINST DNA DAMAGE AND PROLIFERATION IN LEUKOCYTES OF HYPERTENSIVE PATIENTS

O.O.Pavlyushchik<sup>1</sup>, V.N.Sarokina<sup>2</sup>, T.A.Chak<sup>2</sup>, V.Yu.Afonin<sup>1</sup>, A.V.Khapaliuk<sup>2</sup>,  
Y.S.Tseplavukhava<sup>1</sup> M.V.Anisovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Bioorganic chemistry, NASB, the Republic of Belarus, National Academy of Science, Pharmacogenetics department, Minsk, Belarus, e.pavlushchik@yandex.by;*

<sup>2</sup> *Belarusian State Medical University, Clinical pharmacology, Minsk, Belarus, bsmu@bsmu.by*

This study aims to explore the probable relation between angiotensin converting enzyme (ACE I/D) or methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) alleles and proliferation, cell death and micronuclei of leukocytes in hypertensive patients. We genotyped and determined the parameters in 89 individuals with stage II or III essential hypertension. Combination of genotypes I/D + D/D leads to the increased level of cells in G2/M phase of cell cycle compared to I/I genotype. The frequency of cell death was found to be higher in C/C patients compared with the group of C/T genotype and compared with genotypes C/T + T/T (p<0,05). Combined effect of ACE and MTHFR genes on G1/G0 phase of cell cycle was noted.