

ЧАСТОТА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ *CACNA1C* У ЗДОРОВЫХ И ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Борис Сергеевич Пушкарев^{1*}, Ольга Валерьевна Большакова¹,
Татьяна Владимировна Сибирякова², Артур Сергеевич Емельянов¹,
Александр Александрович Герасимов³, Юрий Антонович Витковский¹

¹Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия;

²Забайкальское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы, г. Чита, Россия;

³Городская клиническая больница №1, г. Чита, Россия

Поступила 14.04.2017; принята в печать 02.05.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-359

Цель. Определение частоты полиморфизма гена кальциевых каналов *CACNA1C* (rs1006737) у здоровых людей и пациентов с гипертонической болезнью.

Методы. Исследованы 94 пациента с гипертонической болезнью и 102 здоровых резидента. Возраст исследуемых составлял от 18 до 35 лет. Определение SNP генов кальциевых каналов *CACNA1C* (rs1006737) проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Выполнены оценка подчинения распределения генотипов выборки равновесию Харди–Вайнберга, χ^2 -тест, а также оценён показатель отношения шансов (ОШ).

Результаты. Установлено, что аллель G гена *CACNA1C* (rs1006737) у пациентов с гипертонической болезнью встречался в 1,3 раза реже, чем в группе контроля, и его частота составила 0,58 против 0,76 соответственно ($\chi^2=14,42$, $p=0,0001$). У пациентов с гипертонической болезнью аллель A выявлялся чаще в 1,75 раза, с частотой 0,42, а у здоровых — 0,24 ($\chi^2=14,42$, $p=0,0001$). При использовании общей модели наследования установлено, что генотип G/G в группе пациентов с гипертонической болезнью встречался в 1,5 раза реже, а генотип A/A — в 3,2 раза чаще, чем у здоровых ($\chi^2=12,75$, $p=0,002$). Шанс развития гипертонической болезни оказался выше у носителей аллеля A (ОШ=2,3, 95% доверительный интервал 1,49–3,53, $p=0,0001$) и генотипа A/A (ОШ=3,9, 95% доверительный интервал 1,57–9,68, $p=0,002$) SNP гена молекулы *CACNA1C* (rs1006737).

Вывод. Аллель A и генотип A/A SNP *CACNA1C* (rs1006737) — факторы, предрасполагающие к развитию гипертонической болезни; носительство аллеля G и генотипа G/G *CACNA1C* (rs1006737) снижает вероятность развития гипертонической болезни.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, кальциевые каналы, гипертоническая болезнь, наследственная предрасположенность.

FREQUENCY OF GENETIC POLYMORPHISM OF CALCIUM CHANNELS GENE *CACNA1C* IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

B.S. Pushkarev¹, O.V. Bol'shakova¹, T.V. Sibiriyakova², A.S. Emel'yanov¹, A.A. Gerasimov³, Yu.A. Vitkovskiy¹

¹Chita State Medical Academy, Chita, Russia;

²Zabaikalie Regional Bureau of Forensic Medical Expertise, Chita, Russia;

³City clinical hospital №1, Chita, Russia

Aim. To determine the frequency of polymorphism of calcium channels gene *CACNA1C* (rs1006737) in healthy individuals and patients with hypertension.

Methods. 94 patients with arterial hypertension and 102 healthy residents were examined. The age ranged from 18 to 35 years. Detection of SNP calcium channel genes *CACNA1C* (rs1006737) was performed by real time PCR. Checking of sampling genotypes' for being in Hardy–Weinberg equilibrium and χ^2 -test were performed, and hazards ratio (OR) was evaluated as well.

Results. It was established that allele G of *CACNA1C* gene (rs1006737) was 1,3 times less frequent in patients with hypertension compared to control group, and its frequency was 0.58 vs. 0.76, respectively ($\chi^2=14.42$, $p=0.0001$). In patients with hypertension allele A was detected 1.75 times more often with the frequency 0.42, and in healthy individuals the frequency was 0.24 ($\chi^2=14.42$, $p=0.0001$). Use of general inheritance model demonstrated that G/G genotype was 1.5 times less frequent and A/A genotype was 3.2 times more frequent in patients with hypertension than in healthy individuals ($\chi^2=12.75$, $p=0.002$). The risk of hypertension development was higher in carriers of allele A (HR=2.3, 95% CI 1.49–3.53, $p=0.0001$) and genotype A/A (HR=3.9, 95% CI 1.49–9.68, $p=0.002$) of SNP gene of *CACNA1C* molecule (rs1006737).

Conclusion. Allele A and genotype A/A SNP *CACNA1C* (rs1006737) are predisposing factors to the development of arterial hypertension, carriership of G allele and genotype G/G *CACNA1C* (rs1006737) reduces the risk of hypertension development.

Keywords: genetic polymorphism, calcium channels, arterial hypertension, hereditary predisposition.

В настоящее время широко изучают молекулярно-генетические основы многих заболеваний, выявление предикторов которых позволяет по-новому рассмотреть их патогенез [1, 2].

Гипертоническая болезнь (ГБ) — наиболее часто встречающаяся патология среди сердечно-сосудистых заболеваний. Известно, что генетический полиморфизм молекул ионных каналов сказывается на возбуждении и сокращении миокарда. Так S. Gյörke и соавт. [3] установили, что гене-

Мультипликативная модель наследования аллелей *CACNA1C* (rs1006737)

Аллели	ГБ	Контроль	χ^2	p	ОШ	
	n=94	n=102			значение	95% ДИ
G	0,58	0,76	14,42	0,0001	0,44	0,28–0,67
A	0,42	0,24			2,29	1,49–3,53

Примечание: тест χ^2 ; p — значимость различий между группами; ГБ — группа пациентов с гипертонической болезнью; ОШ — отношение шансов; ДИ — доверительный интервал.

Общая модель наследования для *CACNA1C* (rs1006737)

Генотипы	ГБ	Контроль	χ^2	p	ОШ	
	n=94	n=102			значение	95% ДИ
G/G	0,383	0,588	12,75	0,002	0,43	0,24–0,77
G/A	0,394	0,343			1,24	0,69–2,22
A/A	0,223	0,069			3,9	1,57–9,68

Примечание: тест χ^2 ; p — значимость различий между группами; ГБ — группа пациентов с гипертонической болезнью; ОШ — отношение шансов; ДИ — доверительный интервал.

тический полиморфизм, ведущий к изменениям белковой структуры рианодиновых каналов выхода кальция, приводит к таким заболеваниям, как аритмия. Более того, P.J. Laitinen [4] подтвердил, что некоторые нуклеотидные замены в генах сердечных кальциевых каналов приводят к наследственной тахикардии. T.Y. Ling и соавт. [5] описали значимость генетического полиморфизма *CACNB2* в развитии мерцательной аритмии.

Изучение полиморфизма молекул ионных каналов позволило бы не только выяснить предрасположенность к ГБ, но и в перспективе разработать индивидуальные программы лечения и профилактики этого заболевания в свете современной парадигмы персонализированной медицины.

Целью исследования было определение частоты полиморфизма гена кальциевых каналов *CACNA1C* (rs1006737) у здоровых и пациентов с ГБ.

В настоящее аналитическое исследование продолжительностью 3 года (2014–2017) включены 94 пациента с ГБ: 50 мужчин и 44 женщины. Контрольную группу составили 102 здоровых человека: 49 мужчин и 53 женщины. Возраст обследуемых составил от 18 до 35 лет. Все исследуемые были европеоидами.

Критерием включения служило наличие ГБ с длительностью заболевания от 3 до 15 лет. Критериями исключения пациентов из исследования были ревматизм, врождённые и приобретённые пороки развития, воспалительные заболевания сердца (перикардиты, эндокардиты, миокардиты и др.), сахарный диабет и другие эндокринные заболевания.

Определение SNP (от англ. Single Nucleotide Polimorfizm — полиморфизмы одиночных нуклеотидов) генов кальциевых каналов *CACNA1C* (rs1006737) проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени набором реактивов фирмы НПК «СИНТОЛ» (Москва, Россия). Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из лейкоцитов крови здоровых и больных осуществляли набором реагентов «Проба Рапид-Генетика» ООО «ДНК-Технология» (Москва). Амплификацию и детекцию участков гена *CACNA1C* выполняли на амплификаторе «ДТ-96» (Москва, Россия).

Оценка статистической значимости выполнена с помощью программы Statistica 10.0. Проведены оценка подчинения распределения генотипов выборок равновесию Харди–Вайнберга и χ^2 -тест, а также оценён показатель отношения шансов (ОШ).

В работе с исследуемыми лицами соблюдали этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki; 1964 г., 2013 г. — поправки) и правилами клинической практики в Российской Федерации, утверждёнными приказом Минздрава Российской Федерации №266 от 19.06.2003.

Для полиморфизма *CACNA1C* (rs1006737) получены все искомые генотипы и аллели в подчинении равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Установлено, что аллель G гена *CACNA1C* (rs1006737) у пациентов с ГБ встречался в 1,3 раза реже, чем в группе контроля, и его частота составила 0,58 против 0,76 соответственно ($\chi^2=14,42$, $p=0,0001$; табл. 1). У больных ГБ аллель A выявлялся

чаще в 1,75 раза, с частотой 0,42, а у здоровых — 0,24 ($\chi^2=14,42$, $p=0,0001$).

В группе пациентов с ГБ гетерозиготный вариант G/A SNP гена молекулы *CACNA1C* выявлен с частотой 0,394, а гомозиготные G/G — с частотой 0,383, A/A — с частотой 0,223 (табл. 2), что подчинялось закону Харди–Вайнберга ($\chi^2=3,47$, $p=0,06$).

Распределение частот генотипов среди здоровых оказалось следующим: G/G — 0,588, G/A — 0,343, A/A — 0,069 ($\chi^2=0,37$, $p=0,55$).

При использовании общей модели наследования установлено, что генотип G/G в группе пациентов с ГБ встречался в 1,5 раза реже, а генотип A/A — в 3,2 раза чаще, чем у здоровых ($\chi^2=12,75$, $p=0,002$). Исходя из полученных данных, шанс развития ГБ оказался выше у носителей аллеля A (ОШ=2,3, 95% ДИ 1,49–3,53, $p=0,0001$) и генотипа A/A (ОШ=3,9, 95% ДИ 1,57–9,68, $p=0,002$) SNP гена молекулы *CACNA1C* (rs1006737).

Ген *CACNA1C* кодирует последовательность аминокислот в молекуле белка α_1 -субъединицы сердечных потенциал-управляемых кальциевых каналов. Субъединица α_1 — одна из пяти формирующих канал субъединиц. Она представляет собой трансмембранный белок и формирует проводящую пору канала. Эта структура обеспечивает основную, а другие субъединицы канала (α_2 , δ , β и γ) — вспомогательные функции [6].

Сердечные кальциевые потенциал-управляемые каналы участвуют в механизме сокращения миокарда. Их блокада ингибиторами кальциевых каналов вызывает отрицательный инотропный сердечный эффект [7]. Такие изменения приводят к снижению системного артериального давления.

Известно, что SNP гена молекулы *CACNA1C* (rs1006737) расположен в интронной части первичной матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК). Можно было бы предположить, что вырезание интронов, дальнейший сплайсинг экзонов и формирование зрелой мРНК не окажут влияния на первичную последовательность транслируемого белка — α_1 -субъединицы $Ca_v1.2$. Однако, как стало известно, в некоторых случаях интроны или их участки могут сохраняться в зрелой мРНК и в будущем выступать в качестве матрицы для биосинтеза, определяя первичную аминокислотную последовательность полипептидной цепи.

Таким образом, один и тот же ген может формировать более чем одну мРНК, обуславливая синтез нескольких белков [8].

Благодаря альтернативному сплайсингу в зрелой мРНК могут оставаться интроны или их части. Это позволяет нам утверждать, что единичные нуклеотидные замены в участке ДНК, кодирующей интронную часть мРНК, способны изменить первичную последовательность α_1 -субъединицы $Ca_v1.2$, что в конечном итоге отразится на функции кальциевого канала.

Учитывая различия частоты SNP гена кальциевого канала *CACNA1C* (rs1006737) у пациентов с ГБ и здоровых, можно утверждать, что отдельные аллельные варианты этого генетического полиморфизма определяют предрасположенность к ГБ.

ВЫВОДЫ

1. Наличие аллеля A и генотип A/A SNP *CACNA1C* (rs1006737) являются факторами, предрасполагающими к развитию гипертонической болезни.

2. Носительство аллеля G и генотипа G/G *CACNA1C* (rs1006737) снижает вероятность развития гипертонической болезни.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Логунов Н.А., Никитин Я.О., Собанчев Е.В. и др. Влияние полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота на толщину слоя нервных волокон сетчатки при различных схемах гипотензивной терапии у больных глаукомой. *Мед. генетика*. 2014; 13 (1): 27–31. [Logunov N.A., Nikitin Ya.O., Sobanchev E.V. et al. Effect of polymorphism of endothelial nitric oxide synthase on the thickness of the retinal nerve fiber layer in various schemes of antihypertensive therapy in patients with glaucoma. *Meditsinskaya genetika*. 2014; 13 (1): 27–31. (In Russ.)]
2. Сахарова Д.А., Марковский А.В., Витковский Ю.А. Генетический полиморфизм C-159T гена рецептора CD14 у больных хроническим вирусным гепатитом С. *Забайкальский мед. вестн.* 2015; (3): 61–66. [Sakharova D.A., Markovskiy A.V., Vitkovskiy Yu.A. Genetic polymorphism of C-159T CD14 receptor gene in patients with chronic viral hepatitis C. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2015; (3): 61–66. (In Russ.)]
3. Györke S., Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovascular. Res.* 2008; 77 (2): 245–255. DOI:10.1093/cvr/cvm038.
4. Laitinen P.J., Brown K.M., Piippo K. et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2001; 103 (4): 485–490.
5. Ling T.Y., Wang X.L., Chai Q. et al. Regulation of cardiac CACNB2 by microRNA-499: Potential role in atrial fibrillation. *BBA Clin.* 2017; 7: 78–84. DOI: 10.1016/j.bbacli.2017.02.002.
6. Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Кальциевые ионные каналы. Часть II. *Забайкальский мед. вестн.*

2016; (1): 93–104. [Pushkarev B.S., Vitkovskiy Yu.A. Calcium channels. Part II. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2016; (1): 93–104. (In Russ.)]

7. Mannhardt I., Breckwoldt K., Letuffe-Brenière D. et al. Human engineered heart tissue: Analysis of contractile force. *Stem. Cell Reports*. 2016; 7 (1): 29–42.

DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.04.011.

8. Дымшиц Г.М., Саблина О.В. «Разорванные» гены и сплайсинг. *Вавиловский ж. генетики и селекции*. 2014; 18 (1): 71–80. [Dymshits G.M., Sablina O.V. «Split» genes and splicing. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2014; 18 (1): 71–80. (In Russ.)]

УДК 616.9-053.34-037: 575.174.015.3: 616.002.1

© 2017 Рагимова Н.Д., Гулиев Н.Д.

КЛИНИКО-ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НОВОРОЖДЁННЫХ С ПЕРИНАТАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Наиля Джалил кызы Рагимова*, Насиб Джафар оглы Гулиев

НИИ педиатрии им. К. Фараджевой, г. Баку, Азербайджан

Поступила 10.04.2017; принята в печать 24.04.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-362

Цель. Изучение цитокинового статуса и ассоциации полиморфизма промоторных регионов генов интерлейкинов -6, -10 и 18 у новорождённых с перинатальными инфекциями.

Методы. Проведено комплексное обследование 743 новорождённых с перинатальными инфекциями. Определение уровня интерлейкинов-1β, -6, -10, -18 и фактора некроза опухоли α выполняли стандартным методом твердофазового («сэндвич»-вариант) иммуноферментного анализа. Полиморфные варианты генов анализировали методами полимеразной цепной реакции и полиморфизма длины рестриционных фрагментов.

Результаты. Результаты полученных данных свидетельствуют об общей тенденции повышения уровня цитокинов как у доношенных, так и у недоношенных детей с перинатальными инфекциями. Проведённое нами исследование позволило установить значимость аллельных вариантов интерлейкина-6 в позициях -174 G/C, -572 G/C, -597 G/A, интерлейкина-10 в позициях -1082 G/C, -819 T/C, интерлейкина-18 в позициях -656 T/G, -137 G/C в риске возникновения и развития инфекций. Установлено, что носительство аллеля G интерлейкина-6 в позиции -174 и -572, аллеля C интерлейкина-10 в позиции -819, аллеля C интерлейкина-18 в позиции -137 и аллеля G в позиции -656 ассоциировано с риском перинатальных инфекций у новорождённых.

Выводы. У новорождённых с перинатальными инфекциями выявлено наличие дисбаланса в цитокиновом профиле, подтверждающееся повышением уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкины-1β, -6, -18, фактор некроза опухоли α) и снижением уровня противовоспалительного цитокина (интерлейкин-10) в сравнении с неинфицированными детьми. Аллельные варианты генов цитокинов интерлейкина-6 в позиции -572 G/C, интерлейкина-10 -819 T/G и интерлейкина-18 -652 T/G и 137 G/C имеют значимую ассоциацию с инфекционными заболеваниями. Повышенный риск развития внутриутробных инфекций формируют генотипы GG интерлейкина-6, TT интерлейкина-10, а также TT и GG интерлейкина-18. Определение частот гаплотипов и гаплогенотипов в популяциях здоровых и больных детей выявило благоприятные гаплотипы: GCC и GGG интерлейкина-6, ATA интерлейкина-10, AGG и CGC интерлейкина-18.

Ключевые слова: перинатальные инфекции, новорождённые, цитокины, полиморфизмы генов, прогноз.

CLINICAL AND IMMUNOGENETIC FEATURES OF NEONATES WITH PERINATAL INFECTIONS

N.Dzh. Ragimova, N.Dzh. Guliev

Scientific Research Institute of Pediatrics named after K. Faradzheva, Baku, Azerbaijan

Aim. Investigation of cytokine status and the association between promoter regions polymorphism of interleukin-6, -10 and -18 genes in neonates with perinatal infections.

Methods. Complex examination of 743 neonates with perinatal infections was conducted. The level of interleukin-1β, -6, -10, -18, and TNFα was measured with the use of standard method of enzyme-linked immunosorbent assay («sandwich» variant). Polymorphic variants of genes were analyzed with the methods of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

Results. The results of the received data are indicative of the general tendency to increasing level of cytokines both in full-term and preterm infants with perinatal infections. Our study revealed the role of allelic variants at positions -174 G/C, -572 G/C, -597 G/A of interleukin 6, at positions -1082 G/C, -819 T/C of interleukin-10 and at positions -656 T/G, -137 G/C of interleukin-18 genes in the risk of development and progression of infections. It was determined that the presence of G allele at -174 and -572 positions of interleukin-6 gene, C allele at -819 and -137 positions of interleukin-10 and -18 genes, respectively, and G allele at -656 position of interleukin-18 gene was associated with the risk of perinatal infections in newborns.

Conclusions. In neonates with perinatal infections imbalance of cytokine profile was revealed, that can be confirmed by increased level of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1β, -6, -18, and TNFα) and decreased level of anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) compared to uninfected neonates. Allelic variants of cytokine gene of interleukin-6 at position -572 G/C, interleukin-10 at position -819 T/G and interleukin-18 at position -652 T/G and 137 G/C are significantly associated with infectious diseases. Increased risk of prenatal infections is associated with genotypes GG of interleukin-6, TT of interleukin-10 and TT and GG of interleukin-18. Detection of haplotypes and haplogenotypes in the population of healthy and infected neonates revealed favorable haplotypes: GCC and GGG of interleukin-6, ATA of interleukin-10 and AGG and CGC of interleukin-18.

Keywords: perinatal infections, newborns, cytokines, gene polymorphisms, prognosis.