

И.Ю. Урыбин, В.А. Шенин, В.В. Долгих

## АРО В3' HVR ПОЛИМОРФИЗМ И ЭССЕНЦИАЛЬНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

С целью выявления молекулярных основ наследственной предрасположенности к развитию эссенциальной артериальной гипертензии у детей и подростков проводился анализ структурной организации гена Аро В 3' HVR. Установлена ассоциация аллелей Аро В 3' VNTR полиморфизма с меньшим количеством тандемных повторов ( $HVE \leq 35$ ) с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) у детей и подростков.

**Ключевые слова:** эссенциальная артериальная гипертензия, ген Аро В 3', предрасположенность

## АРО В 3' HVR POLYMORPHISM AND ESSENTIAL HYPERTENSION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

I.Yu. Uribin, V.A. Shenin, V.V. Dolgikh

Scientific Center of Medical Ecology ESSC SB RAMS, Irkutsk

The paper presents results of the research of distribution of the incidence of alleles polymorphous locus ApoB 3' HVR among children and adolescents with essential hypertension and the normals. The analysis of polymorphism variability showed association of alleles  $HVE \leq 35$  with essential hypertension in children and adolescents.

**Key words:** essential hypertension, ApoB 3' polymorphism, predisposition

Гипертоническая болезнь — одна из наиболее распространенных патологий. Гипертония является мультифакториальным заболеванием, в развитие которого, вносят свой вклад как внешние, так и внутренние факторы.

Важная роль генетических факторов в развитии заболевания подтверждается семейными и близнецовыми исследованиями. Установлена полигенная природа заболевания. Поиск генов-кандидатов, связанных с развитием патологии, является перспективным направлением медицинской генетики. Геном-кандидатом может оказаться такой ген, белковый продукт которого задействован в развитии заболевания. Среди генов-кандидатов, которые могут быть задействованы в развитии эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) определенный интерес представляет ген аполипротеина В.

Кодируемый геном аполипротеин В-100 является основным белковым компонентом липопротеинов низкой плотности. Белок участвует в обмене липидов, являясь лигандом LDL рецептора [13]. Ген аполипротеина В расположен на второй хромосоме, состоит из 29 экзонов и 28 интронов и имеет протяженность 43 тысячи пар оснований. Т. Knott et al. [1] обнаружили гипервариабельный район генома, названный Аро В 3' HVR. Гипервариабельный регион находится на расстоянии 300 п.н. от последнего аминокислотного кодона с 3' конца гена и в 75 п.н. от второго сигнала полиаденилирования. Хромосомная локализация локуса 2p24-p23.

Структура HVR формируется сочетанием различного числа копий тандемных повторов (VNTR).

Обнаружено два типа повторяющихся единиц с высоким содержанием А-Т пар и со средней длиной 15 п.н., внутренне гетерогенных из-за замен нуклеотидов и делеций [11].

Различаются ближайшие аллели в этом локусе на два тандемных повтора в сумме дающих разницу 30 пар оснований. Нумерация по E. Voerwinkle [11] показывает количество тандемных повторов в аллеле.

Индекс гетерозиготности данного полиморфизма варьирует от 55 до 84 % в различных популяциях. Данный маркер широко используется в сравнительно-популяционных исследованиях.

Изначально полиморфизм Аро В 3' гипервариабельного региона определялся Саузерн блот анализом различных рестриктов ДНК с использованием 3' К-ДНК в качестве гибридизационного зонда [7].

С развитием технологии полимеразной цепной реакции начал использоваться метод определения полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ анализ) [11, 9].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексное обследование было проведено у 126 детей, разделенных на группы согласно показателям уровня артериального давления.

Первая группа (дети с ЭАГ) — 86 детей русской национальности, имеющие повышение артериального давления, превышающим значение 95 перцентильного коридора согласно региональным стандартам уровня АД. Для исследования были выбраны дети и подростки 12 — 18 лет,

проживающие на территории Иркутской области. Все дети находились на стационарном обследовании и лечении в клинике ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН.

Вторую группу составляли 40 детей с нормальными показателями уровня артериального давления. Данная группа нами была использована для контроля.

Основным критерием отбора было отсутствие родства между индивидами, а также отсутствие острых и сопутствующих хронических патологических процессов.

Выборка детей в первую группу проводилась по результатам многократного измерения АД, а также холтеровского мониторирования. Всем подросткам проводилось измерение роста и веса с вычислением индекса массы тела. Наличие хронических очагов инфекции, хронических патологических процессов выявлялось на основании анамнеза, клинического осмотра и анализа амбулаторной карты.

Диагноз эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) верифицировался методом исключения заболеваний и состояний, которые могли обусловить вторичное повышение уровня АД. С этой целью всем подросткам, имеющим уровень АД, превышающий значение 95 перцентильного коридора регионального норматива распределения уровня АД, проводился комплекс клинико-функциональных, биохимических и генетических исследований, позволяющий исключить многообразные патологические процессы со стороны различных органов и систем, сопровождающихся повышением уровня АД. При обследовании были исключены заболевания почек, эндокринные заболевания и нарушения обмена веществ, заболевания центральной нервной системы, врожденных пороков сердечно-сосудистой системы и т.д. Для этого детям проводились следующие диагностические мероприятия: об-

щий анализ крови и мочи, проба по Нечипоренко; ультразвуковое исследование почек и мочевыводящих путей, надпочечников; консультации эндокринолога, невропатолога, окулиста; рентгенография шейного отдела позвоночника в двух проекциях, эхоэнцефалоскопия, электроэнцефалография.

Препараты ДНК получали из венозной крови с применением ионообменной смолы Chelex-100 [15]. ПЦР амплификацию AroB3' HVR проводили с использованием набора реагентов Государственного Научного центра Российской Федерации «Гос. НИИ генетика» в условиях, предложенных производителем. Разделение продуктов реакции проводили в 2% агарозном геле, содержащем 0,05 мкг/мл этидиум бромида с использованием аллельного маркера или искусственно синтезированной псевдоаллельной «лестницы». Результаты электрофореза в геле визуализировались на фильтре трансиллюминатора и документировались фотографированием.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В различных работах показано наличие в локусе до 18 аллелей [2, 3]. Обнаружены редкие «промежуточные» аллели, отличающиеся от «основных» на 15 п.н. (длина одного тандемного повтора). С учетом этого в совокупности данных по разным популяциям количество существующих аллелей превышает 30.

Для сравнения распределения аллелей в различных популяциях нами была использована 4-аллельная модель (табл. 1).

Частоты аллелей по нашим данным близки к восточно-европейским и в целом попадают в группу европеоидных популяций, значительно отличаться от южно-азиатских.

В ряде работ показаны различия во встречаемости аллельных вариантов AroB 3' VNTR среди людей, страдающих сердечно-сосудистыми забо-

**Таблица 1**  
**Частота аллелей Aro B 3' HVR в различных популяциях по 4-аллельной модели (Alavantic D. et al., 1997)**

Страны	Частоты аллелей			
	HVE < 35	HVE 35	HVE 37	HVE > 37
Восточная Европа	0,152	0,238	0,393	0,213
Швеция	0,073	0,191	0,483	0,253
Испания	0,151	0,209	0,370	0,269
Ц. Европа	0,136	0,225	0,388	0,251
Греция	0,151	0,222	0,394	0,233
Албания	0,186	0,242	0,419	0,152
Италия	0,201	0,244	0,366	0,189
Сербия	0,326	0,287	0,212	0,174
Юж. Азия	0,220	0,364	0,252	0,164
Тайвань	0,189	0,586	0,146	0,079
Собственные данные	0,161	0,254	0,359	0,226

леваниями, по сравнению со здоровыми людьми [8, 7, 14]. В этих публикациях показано, что для аллелей с большим числом tandemных повторов, наблюдается определенная ассоциация с инфарктом миокарда и коронарной сердечной недостаточностью. В другой работе установлена ассоциация с аллелями с малым числом повторов [10]. P.R. Turner [12] и Alavantic [2] показали отсутствие корреляции с коронарной сердечной недостаточностью, но установили корреляцию с уровнем сывороточных липидов.

Несмотря на противоречивые данные, считается, что аллели ApoB 3' VNTR находятся в неравновесии по сцеплению с вариантами ApoB гена и таким образом связаны с обменом липидов низкой плотности. Семейный дефект ApoB 100 – наследственная болезнь обмена липопротеинов низкой плотности, вызывающая развитие гиперхолестеринемии и атеросклероза. Это одно из наиболее частых моногенных заболеваний (1/500 в отдельных европейских популяциях) связанное с R3500Q мутацией в ApoB гене. Мутация нарушает конформацию ApoB-100 в сайте связывания с LDL-рецептором, что приводит к нарушению обмена липидов [13]. Учитывая высокий уровень ApoB 3' VNTR полиморфизма и что ApoB 100 один из крупнейших мономерных белков (4536 аминокислотных остатков) можно предположить неравновесие по сцеплению и с другими мутациями, приводящими к изменению обмена LDL. P.M. Frossard et al. [5] показали достоверную корреляцию между HVE 35 аллелем ApoB 3' VNTR и эссенциальной гипертензией в популяции Объединенных Арабских Эмиратов. Данный HVE35 аллель, как и HVE37 является одним из наиболее часто встречающихся в различных исследованных популяциях [6].

Нами было исследовано распределение ApoB3' HVR аллелей в группе детей и подростков

с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) в сравнении с контрольной группой. В таблице 2 показано распределение по частотам аллелей, обнаруженных в двух группах: 86 детей с ЭАГ и 40 детей контрольной группы. Было типировано 11 аллелей с количеством повторов от 31 до 55 и 30 различных генотипов. Наиболее часто встречающимися аллелями являются HVE 37 и HVE35 и генотип 35/37. В обеих группах наблюдается тримодальное распределение аллелей с пиками HVE 31, 37, 47.

Для сравнения распределения аллелей в выборках была использована 4-аллельная модель [12]. Аллели были распределены по классам: HVE < 35, HVE35, HVE37 и HVE > 37 (табл. 3).

Частоты аллелей в классах сравнивались между группами. Доля аллелей с числом повторов < 35 в группе детей с ЭАГ в 2,2 раза превосходит таковую в контрольной группе. Установлена достоверная ассоциация аллелей HVE < 35 с ЭАГ по критерию Ф – преобразования Фишера  $P < 0,05$ . Доля аллелей HVE 35 в группе с ЭАГ (26,79 %) больше, чем в контрольной (22,50 %), но порог достоверности не достигнут. Доли аллелей HVE 37 и HVE > 37 больше в контрольной группе по сравнению с ЭАГ группой, но отдельно по каждой из них уровень достоверности не достигается.

Суммировав частоты аллелей HVE < 35 и HVE35 и соответственно HVE 37 и HVE > 37 получили два класса относительно коротких и относительно длинных аллелей (табл. 4). При сравнении групп доля коротких аллелей HVE ≤ 35 в группе детей с ЭАГ достоверно ( $P < 0,05$ ) больше чем в контрольной (46,46 % против 31,25 %) и соответственно доля аллелей с большим количеством tandemных повторов в контрольной группе больше, чем в группе с ЭАГ (68,75 % против 53,75 %).

Установлена ассоциация аллелей ApoB3' VNTR с малым количеством tandemных повторов ≤ 35

**Таблица 2**  
**Количество и частоты аллелей ApoB 3' HVR (количество повторов 31–55) наблюдаемые в исследованных группах (252 хромосомы)**

Аллели (кол-во повторов)	Контрольная группа (80 хромосом)		Дети с ЭАГ (172 хромосомы)	
	Кол-во аллелей	Частота (%)	Кол-во аллелей	Частота (%)
31	4	5,00	18	10,47
33	3	3,75	15	8,72
35	18	22,50	48	27,91
37	33	41,25	57	33,14
39	7	8,75	6	3,49
41	0	0	1	0,58
45	2	2,50	1	0,58
47	9	11,25	14	8,14
49	2	2,50	10	5,81
51	2	2,50	1	0,58
55	0	0	1	0,58

Таблица 3

Распределение аллелей Apo B 3' HVR по 4-аллельной модели в 2 группах

Аллели	Контрольная группа (%)	Дети с ЭАГ (%)
HVE < 35*	8,75	19,64
HVE 35	22,50	26,79
HVE 37	41,25	33,33
HVE > 37	27,50	20,24

Примечание: \* -  $P < 0,05$ .

Таблица 4

Распределение аллелей ApoB 3' HVR по 2-аллельной модели в 2 группах

Аллели	Контрольная группа (%)	Дети с ЭАГ (%)
HVE ≤ 35*	31,25	46,43
HVE ≥ 37*	68,75	53,57

Примечание: \* -  $P < 0,05$ .

HVE с эссенциальной артериальной гипертензией у детей и подростков.

Относительный риск RR составил — 1,9, что подтверждает факт ассоциации аллелей HVE ≤ 35 с ЭАГ у детей и подростков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene / T.J. Knott, S.C. Wallis, R.J. Pease, L.M. Powell et al. // *Nucleic Acids Res.* — 1986. — N 14. — P. 9215—9216.
2. Alavantic D. Apo B HVR Polimorfism in Healsy Population: Relationships to Serum Lipid levels / D. Alavantic, S. Glisic, I. Kandic // *Genetic Epidemiology.* — 1998. — N 15. — P. 113—122.
3. Apolipoprotein B 3' hypervariable repeat genotype: association with plasma lipid concentration, coronary artery disease, and other restriction fragment polymorphisms / J.H. Wu, M.S. Chern, S.K. Lo, M.S. Wen et al. // *Clin Chem.* — 1996. — N 42. — P. 927—932.
4. DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study / P.R. Turner, P.J. Talmud, S. Visvikis, C. Ehnholm et al. // *Atherosclerosis.* — 1995. — N 116. — P. 221—234.
5. Frossard P.M. Assotiation of an Apolipoprotein B Gene marker with Essential Hypertension / P.M. Frossard, E.N. Obineche, G.G. Lestringant // *Hypertension.* — 1999. — N 33. — P. 1052—1056.
6. Genetic variation at the Apo B Hypervariable Region in a Serbian population / D. Avalantic, S. Glisic, S. Erceg, M. Stupar // *J. Hum. Genet.* — 1997. — N 5. — P. 333—335.
7. Hegele R.A. Apolipoproteih B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction / R.A. Hegele, P.N. Herbert, C.B. Blum // *New Engl. J. Med.* — 1986. — N 315. — P. 1509—1515.
8. Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls / W. Friedl, E.H. Ludwig, B. Paulweber, F. Sandhofer et al. // *J. Lipid Res.* — 1990. — N 31. — P. 659—665.
9. Ludwig E.H. High resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene / E.H. Ludwig, W. Friedl, B.G. McCarthy // *Am. J. Hum. Genet.* — 1989. — N 45. — P. 464—488.
10. Molecular genetics of apolipoprotein and coronary heart disease / S. Deeb, A. Failor, B.G. Brown, J.D. Brunzell et al. // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* — 1986. — N 51 (pt. 1). — P. 403-409.
11. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region / E. Boerwinkle, W. Xiong, E. Fourest, L. Chan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1989. — N 86. — P. 212—216.
12. Skowasch K. Comparison of population data using 3AMPFLP systems / in Ritter C., Schneider P.M. (eds) / K. Skowasch, M. Schurenkamp, S. Rand // *Advances in Forensic Haemogenetics.* — 1994. — N 4. — P. 75—77.
13. The molekular mechnism for the genetic disorder familiar defective apolipoprotein B100 / J. Boren, U. Ekstrum, B. Argen, P. Nilsson-Ehle et al. // *The Journal of Biological Chemistry.* — 2001. — N 12. — P. 9214—9218.
14. Variation of apolipoprotein B gene is associated with myocardial infarction and lipoprotein levels in Danes / A. Tybjarg-Hansen, B.G. Nordestgaard, L.U. Gerdes, S.E. Humphries // *Atherosclerosis.* — 1991. — N 89. — P. 69—81.
15. Walsh P. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typind from forensic material // *Bio Techniques.* — 1991. — N 10. — P. 506—513.