

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКИСИ АЗОТА — 786 T>C, 894 G>T В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

### THE ROLE OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORPHISMS — 786 T>C, 894 G>T IN THE FORMATION OF RESISTANT ARTERIAL HYPERTENSION

**E. Babakhova  
A. Bagmet  
N. Zaitseva  
V. Egorov  
T. Tautina**

*Summary.* Objective. Detection of pathological polymorphisms of endothelial synthase, causing significant damage in the gene structure in patients with resistant hypertension (RAH). Materials and methods. In our study, the main group consisted of 98 people diagnosed with resistant arterial hypertension (RAH) (mean age 60.4±7.2 years), who underwent a study to detect polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase (NOS) gene. The control group consisted of patients diagnosed with essential arterial hypertension (EG) — 62 persons (mean age 55.3±7.2 years). All patients were comparable by sex and age. In patients, genotype frequencies in the study groups were determined by PCR (polymerase chain reaction) with real-time detection of results; analysis of melting curves, qualitative analysis. Material for the study: peripheral blood. Results. The group of patients with RAH and the group of patients with EG (essential hypertension) differed in the frequency of occurrence of all genotypes. There were statistically significant differences in the incidence of heterozygous and homozygous genotypes ( $p<0.05$ ), when comparing groups of patients with RAH and EG Findings. Conclusions. The study proved that the occurrence of RAH is caused by polymorphisms of different genes, it undoubtedly requires further study of genetic factors affecting the development of RAH.

*Keywords:* resistant hypertension, polymorphism, genotype, homozygote, heterozygote, endothelial nitric oxide synthase.

**Бабахова Елена Хачатуровна**

Аспирант, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России  
kaf.polterapirostgmu@mail.ru

**Багмет Александр Данилович**

Д.м.н, профессор, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава  
России

**Зайцева Наталия Сергеевна**

Доцент, ФПК и ППС ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава  
России

**Егоров Владимир Николаевич**

Доцент, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России

**Тяютина Татьяна Владимировна**

Доцент, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России

*Аннотация.* Цель. Выявление патологических полиморфизмов эндотелиальной синтазы, вызывающих значимые повреждения в структуре гена у пациентов с резистентной артериальной гипертензией (РАГ). Материалы и методы. В нашем исследовании основную группу составили 98 человек с диагнозом резистентная артериальная гипертензия (РАГ) (средний возраст 60,4±7,2 года), которым проводилось исследование на выявление полиморфизма гена эндотелиальной синтазы окиси азота (NOS). Контрольную группу составили пациенты с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия (ЭГ) — 62 человека, (средний возраст 55,3±7,2 года). Все пациенты были сопоставимы по полу и возрасту. У пациентов были определены частоты генотипов в исследуемых группах, путем ПЦР (полимеразная цепная реакция) с детекцией результатов в режиме реального времени; анализ кривых плавления, качественный анализ. Материал для исследования: периферическая кровь. Результаты. Группа пациентов с РАГ, и группа пациентов с ЭГ (эссенциальной гипертензией) отличались между собой по частоте встречаемости всех генотипов. Наблюдались статистически значимые различия по частоте встречаемости гетерозиготных и гомозиготных генотипов ( $p<0,05$ ), при сравнении групп пациентов с РАГ и ЭГ Выводы. Исследование доказало, что возникновение РАГ обусловлено полиморфизмами различных генов, это несомненно, требует дальнейшего изучения генетических факторов влияющих на развитие РАГ.

*Ключевые слова:* резистентная артериальная гипертензия, полиморфизм, генотип, гомозигота, гетерозигота, эндотелиальная синтаза окиси азота.

### Введение

**Р**езистентная артериальная гипертензия (РАГ) — это артериальная гипертензия, при которой уровень артериального давления остается выше целевых значений, несмотря на прием 3-х и более антигипертензивных препаратов в оптимальных дозах, один из которых диуретик. Вследствие большой частоты тяжелых осложнений, определяющих высокий уровень

сердечнососудистой заболеваемости и смертности, РАГ является актуальной научно-практической проблемой [1]. У больных РАГ важна ранняя диагностика поражения органов-мишеней — сердца, мозга, почек, а также сосудов — для профилактики этих осложнений, что определяет актуальность исследований в этой области [2].

Доказано, что количество пациентов с РАГ будет с каждым годом больше в связи с увеличением продол-

жительности жизни и тенденции к ожирению и более частой заболеваемости сахарным диабетом [3,4].

Выделяют истинно-резистентную и псевдорезистентную артериальную гипертензии (АГ). В основном РАГ это — псевдорезистентная АГ. Если устранить причины резистентности, достигается целевой уровень артериального давления (АД). Об истинно-резистентной гипертензии можно говорить, устранив все обратимые факторы резистентности и адекватном режиме лечения [5].

Истинно-резистентной артериальная гипертензия является, только у 5–10% пациентов, у которых не удается достигать целевых значений артериального давления [6,7]. Встречаемости истинно-резистентной гипертензии достигает 25–30% у некоторых пациентов, например находящихся на лечении в стационаре [8]. Невыявленная вторичная АГ лежит в основе истинно-резистентной АГ. При выявлении вторичной АГ не всегда удается достичь нормальных цифр уровня АД, что связано как с тяжелым течением основного заболевания, так и с тяжестью самой гипертензии. Устранив этиологический фактор развития РАГ, удается преодолеть резистентность больных с вторичной АГ к терапии [9, 10]. Наиболее частыми причинами РАГ, которые обусловлены вторичными гипертензиями являются — почечная недостаточность, реноваскулярная АГ, синдром Кушинга, паренхиматозные заболевания почек, феохромоцитомы, гиперкальциемия первичный альдостеронизм [11].

При артериальной гипертензии встречаются случаи абсолютной резистентности к терапии антигипертензивными препаратами, чаще всего при поражении органов-мишеней и при не леченной артериальной гипертензии в начале заболевания.

На сегодняшний день общепризнано, что резистентная артериальная гипертензия является мультифакторным заболеванием [12]. Основную роль в ее возникновении отводят генетическим факторам. У 50% пациентов выявляется наследственная предрасположенность к РАГ. Развитие заболеваний, в том числе и РАГ, связано с полиморфизмом определенных генов, из — за этого считается, что перспективным направлением в молекулярной генетике является поиск полиморфных маркеров генов-кандидатов и выявление их ассоциаций с развитием патологических изменений [13].

Возможно, что резистентная артериальная гипертензия и многие другие заболевания, возникают из-за однонуклеотидного полиморфизма [14]. Однонуклеотидный полиморфизм (SNPs) — это отличия в последовательности ДНК размером в один нуклеотид в геноме представителей одного и того же вида или между гомологичными

участками гомологичных хромосом индивида. Однонуклеотидный полиморфизм (SNPs) используют для сравнения участков генома между исследуемыми группами в биомедицинских исследованиях (например, одна группа — люди с определенным заболеванием, а вторая — без него) [15, 16]. Исследования однонуклеотидного полиморфизма, поможет в понимании фармакокинетики и фармакодинамики действия различных лекарств на человека [16,17].

Если происходит замена в нуклеотидной последовательности ДНК, то возникают три варианта генотипов: гомозиготы, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов. Наличие гетерозиготного генотипа подавляет эффект вредных летальных рецессивных аллелей, которые могут вызвать нежелательные мутации под влиянием соответствующего доминантного аллеля, и только при переходе этого гена в гомозиготное состояние у носителей гетерозиготных генотипов может развиваться патологическое состояние, которое характеризуется более тяжелым течением. Если в генотипе обнаруживаются две одинаковые аллели, контролирующие свойства гена, то они оказывают повреждение в конструкции гена, что приводит к более тяжелому течению заболевания [5].

Выделен наиболее значимый ген, обуславливающий полиморфизм регуляторных ферментативных систем при РАГ, это — эндотелиальная NO-синтаза (eNOS или NOS3), обеспечивающая поддержание нормального сосудистого тонуса. Нарушение продукции NO — синтазы ведет к повышению АД. NOS3 кодируется геном, расположенным на длинном плече 7-й хромосомы 7q36.1. Выделяют два полиморфизма эндотелиальной синтазы (NOS3): –786 T>C синтаза окиси азота и 894 G>T синтаза окиси азота [4].

Цель исследования — выявление патологических полиморфизмов эндотелиальной синтазы, вызывающих повреждение в структуре гена у пациентов с резистентной артериальной гипертензией (РАГ).

## Материалы и методы

В нашем исследовании основную группу составили 98 человек с диагнозом резистентная артериальная гипертензия (РАГ) (средний возраст  $60,4 \pm 7,2$  года), прошедшие обследование на базе МУЗ ЦРБ Мясниковского района Ростовской области, которым проводилось исследование на выявление полиморфизма гена эндотелиальной синтазы окиси азота (NO3). Контрольную группу составили пациенты с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия (ЭГ) — 62 человека, (средний возраст  $55,3 \pm 7,2$  года). Все пациенты были сопоставимы по полу и возрасту. У пациентов были определены ча-

Таблица 1. Носительство гомозиготных и гетерозиготных генотипов в исследуемых группах

Группы	Полиморфизмы NO3			
	- 786 T>C		894 G>T	
	гетерозигота	гомозигота	гетерозигота	гомозигота
ЭГ (62 чел.)	48 (77,4%) *	14 (22,5%)	43 (69,3%) *	19 (30,6%)
РАГ (98 чел.)	11 (11,2%)	87 (88,7%) •	14 (14,2%)	84 (85,7%)•

Примечание: NO3 — эндотелиальная синтаза; ЭГ — эссенциальная гипертензия; РАГ — резистентная артериальная гипертензия;  
—  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, \* —  $p < 0,05$  по сравнению с основной группой.

стоты генотипов в исследуемых группах, путем ПЦР (полимеразная цепная реакция) с детекцией результатов в режиме реального времени; анализ кривых плавления, качественный анализ. Материал для исследования: периферическая кровь.

У пациентов основной группы были выявлены заболевания сердечно — сосудистой системы (ССС), как, ишемическая болезнь сердца (ИБС), стенокардия напряжения (ФК III) у 78 (79,5%) пациентов, хроническая сердечная недостаточность (ХСН IIa ФК III) у 65 (66,3%) больных. По результатам ЭхоЭКГ гипертрофия левого желудочка (ЛЖ) была выявлена — у 98 (100%) пациентов. Сопутствующие заболевания, как сахарный диабет был выявлен у 82 (83,6%) пациентов; дисциркуляторная энцефалопатия у 68 (69,3%) человек, алиментарно — конституционное ожирение — у 80 (81,6%) пациентов. У пациентов группы контроля были выявлены заболевания сердечно — сосудистой системы (ССС), как, ишемическая болезнь сердца (ИБС), стенокардия напряжения (ФК III) у 37 (59,6%) пациентов, хроническая сердечная недостаточность (ХСН IIa ФК III) у 21 (33,8%) больных. По результатам ЭхоЭКГ гипертрофия левого желудочка (ЛЖ) была выявлена — у 42 (67,7%) пациентов. Сопутствующие заболевания, как сахарный диабет был выявлен у 50 (80,6%) пациентов; дисциркуляторная энцефалопатия у 38 (61,2%) человек, алиментарно — конституционное ожирение — у 49 (79,0%) пациентов.

Все пациенты были сопоставимы по полу и возрасту. У всех лиц было получено письменное информированное согласие. Из исследования исключились пациенты с симптоматическим АГ; с плохой приверженностью к лечению и ошибками в измерении артериального давления. Материалом для исследования полиморфизма NOS3 гена служила ДНК, выделенная из образцов венозной крови, смешанной с антикоагулянтом.

Для оценки роли полиморфизмов гена NOS3 в развитии РАГ у пациентов были определены частоты генотипов в исследуемых группах (single nucleotide polymorphisms — SNPs).

Данные обрабатывались с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.1 (StatSoft, USA). Межгрупповую разницу определяли при помощи непараметрических методов статистики: для двух независимых групп использовали критерий Фридмана ANOVA и Кенделла. Значимой считалась разница при уровне погрешности не выше 5% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждения

Во всех группах пациентов наблюдались носители всех возможных генотипов. Соотношение частот генотипов в исследованных группах пациентов распределилось следующим образом.

В контрольной группе, состоящей из 62 пациентов, генотип ТТ встречался у 10 (16,1%) пациентов, генотип ТС у 48 (77,4%) человек ( $p < 0,05$ ), генотип СС у 4 (0,6%) больных. С гетерозиготным генотипом полиморфизма эндотелиальной синтазы — 786 T>C было 48 (77,4%) человек ( $p < 0,05$ ), с гомозиготным — 14 (22,5%) человек [табл. 1]. В основной группе пациентов с РАГ, состоящей из 98 человек генотип ТТ встречался у 22 (22,4%) пациентов, генотип ТС у 11 (11,2%) человек, генотип СС у 65 (66,3%) пациентов ( $p < 0,05$ ). С гетерозиготным генотипом полиморфизма эндотелиальной синтазы — 786 T>C было 11 (11,2%) человек, с гомозиготным — 87 (88,7%) ( $p < 0,05$ ) [табл. 1].

В контрольной группе состоящей из 62 пациентов генотип GG встречался у 8 (12,9%) человек, генотип GT у 43 (69,3%) пациента ( $p < 0,05$ ), генотип ТТ у 11 (17,7%) [табл. 2]. С гетерозиготным генотипом полиморфизма эндотелиальной синтазы 894 G>T было 43 (69,3%) пациентов ( $p < 0,05$ ), с гомозиготным 19 (30,6%) больных [табл. 1]. В основной группе пациентов с РАГ, состоящей из 98 человек генотип GG встречался у 25 (25,5%) пациентов, генотип GT у 14 (14,2%) человек, генотип ТТ у 59 (60%) пациентов ( $p < 0,05$ ) [табл. 2]. С гетерозиготным генотипом полиморфизма эндотелиальной синтазы 894 G>T, было 14 (14,2%) человек, с гомозиготным 84 (85,7%) ( $p < 0,05$ ) [табл. 1].

Таблица 2. Носительство генотипов в исследуемых группах

Генотипы NOS3 полиморфизма — 786 T>C			
Группы	Генотипы		
ЭГ	ТТ 10 (16%)	ТС 48 (78%) *	СС 4 (6%)
РАГ	ТТ 22 (22,4%)	ТС 11 (11,2%)	СС 65 (66,4%) •
Генотипы NOS3 полиморфизма (894 G>T)			
Группы	Генотипы		
ЭГ	GG 8 (12,9%)	GT 43 (69,3%) *	ТТ 11 (17,8%)
РАГ	GG 25 (25,5%)	GT 14 (14,2%)	ТТ 59 (60,3%) •

Примечание: NOS3 — эндотельальная синтаза; ЭГ — эссенциальная гипертензия; РАГ — резистентная артериальная гипертензия; • —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, \* —  $p < 0,05$  по сравнению с основной группой.

Таблица 3. Носительство неблагоприятных аллелей

Генотипы NOS3 полиморфизма — 786 T>C					
Группы	p <sup>2</sup>	p	q <sup>2</sup>	q	2pq
ЭГ	0,52	0,75	0,06	0,25	0,38
РАГ	0,04	0,19	0,66	0,81	0,3
Генотипы NOS3 полиморфизма (894 G>T)					
Группы	p <sup>2</sup>	p	q <sup>2</sup>	q	2pq
ЭГ	0,34	0,59	0,17	0,41	0,48
РАГ	0,05	0,23	0,6	0,77	0,35

Примечание: NOS3 — эндотельальная синтаза; ЭГ — эссенциальная гипертензия; РАГ — резистентная артериальная гипертензия; p<sup>2</sup> — доля гомозигот по одному из аллелей; p — частота этого аллеля; q<sup>2</sup> — доля гомозигот по альтернативному аллелю; q — частота соответствующего аллеля; 2pq — доля гетерозигот.

Обе группы по частоте встречаемости всех генотипов отличались между собой.

Сравнивая группы пациентов с РАГ и ЭГ наблюдались статистически значимые различия по частоте встречаемости гетерозиготных и гомозиготных генотипов ( $p < 0,05$ ). В группе пациентов с РАГ, в отличие от группы контроля, преобладали носители гомозиготных генотипов. Генотипы ТТ и СС (полиморфизм NOS3–786 T>C) встречались в 22,4% и 66,3% ( $p < 0,05$ ), а генотипы GG и ТТ (полиморфизм NOS3: 894 G>T) встречались в 25,5% и 60% ( $p < 0,05$ ) соответственно. По данным различных авторов среди пациентов с РАГ гомозиготный по делетированному аллелю генотип СС вызывает повреждения в структуре гена, что обуславливает тяжелое течение заболевания [2].

В нашем исследовании он встречался чаще всего в группе пациентов с РАГ, насчитывающей 98 человек,

обнаруживался у 65 (66,3%) больных ( $p < 0,05$ ). В группе пациентов с ЭГ генотип ТС наблюдался у 48 (77,4%) больных ( $p < 0,05$ ), тогда как группе пациентов с РАГ всего лишь у 11 (11,2%) человек. Таким образом, сравнительный анализ распространенности частоты генотипов в исследованных группах показал, что в группе с РАГ статистически значимо чаще наблюдался гомозиготный генотип СС (66,3%) ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой пациентов с ЭГ.

Существует закон открытый английским математиком Дж. Харди и немецким врачом — генетиком Г. Вайнбергом. В 1908 году, звучит он так: «В популяции из бесконечно большого числа свободно скрещивающихся особей в отсутствие мутаций, избирательной миграции организмов с различными генотипами и давления естественного отбора первоначальные частоты аллелей сохраняются из поколения в поколение».

Закон Харди — Вайнберга в медицинской генетике позволяет оценить популяционный риск генетически обусловленных заболеваний. Рассчитать структуру аллелофонда и предсказать риск развития резистентной артериальной гипертензии, возможно, зная частоты неблагоприятных аллелей.

В нашем исследовании неблагоприятные аллели чаще всего встречались в группе пациентов с РАГ [таб.3].

В настоящее время участие нарушения генерации NOS3 в развитии дисфункции эндотелия и РАГ доказанный факт. Только механизмы эндотелиальной дисфункции разные у всех пациентов и зависят от возникновения и происхождения гипертензии, дальнейшие исследования в этой области помогут узнать, насколько

снизится АД при нормальном синтезе NO и позволят узнать новые подходы к лечению и предупреждению РАГ.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, не вызывает сомнений, что на мультифакториальную природу РАГ также оказывает влияние полиморфизм различных генов, которые участвуют в реализации молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование заболевания.

Дальнейшее изучение генома больных РАГ будет способствовать выявлению новых генов — кандидатов, расширению знаний о геноме, применению новых технологий, развитию и внедрению персонализированной предиктивной медицины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Юрьев К. Л. (2007) К вопросу о преимуществах комбинированной терапии при артериальной гипертензии. Экватор. Укр. мед. часопис, 1(57): 50–56.
2. Безродная Л. В. (2010) Резистентная (рефрактерная) артериальная гипертензия. В кн.: В. М. Коваленко, Е. П. Свищенко, Ю. М. Сиренко (ред.). Руководство по артериальной гипертензии. МОРИОН, Киев, с. 262–269.
3. Агуйлера М. Т., А. де-ла-Сьерра, Кока А. и соавт. (1999) влияние алкоголя воздержание на артериальное давление: оценка на 24-часовое амбулаторное мониторирование артериального давления. Гипертензия, 33(2): 653–657.
4. Сиренко Ю. Н. (2008) Симптоматические формы артериальной гипертензии. В кн.: В. М. Коваленко (ред). Руководство по кардиологии. МОРИОН, Киев, с. 482–522.
5. Альпер В. А., Кэлхун А. Д. (1999) современный менеджмент рефрактерной гипертензии. Сигг. Hypertensn Респ., 1(5): 402–407.
6. Swales J. D., Bing R. F., Heagerty A. et al. Treatment of refractory hypertension // Lancet. — 1982. — 1. — 894–896.
7. Erdine S., Arat-uzkan A. Resistant hypertension. European Society of Hypertension Scientific Newsletter: Update on Hypertension Management. — 2003. — 4. — 15.
8. Elliot P. Observational studies of salt and blood pressure // Hypertension. — 1991. — 17 (Suppl. 1). — 3–18.
9. Bencheffrits S., Bethelin J., Podjarny E. Normokaliemic hyperaldosteronism in patients with resistant hypertension // Isr. Med. ASSOC. J. — 2002. — 1. — 17–20.
10. Pickering T. C., James G. D., Boddie C. et al. How common is white coat hypertension? // JAMA. — 1988. — 259. — 225–228.
11. Staessen J. A., Fagard R., Thijs L. et al. For the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur). Trial Investigators. Randomised double blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension // Lancet. — 1999. — 350. — 57–64.
12. Huang Z., Willett W. C., Manson J. E. Body weight, weight change and risk for hypertension in women // Ann. Intern. Med. — 1998. — 128. — 81–88.
13. Vidt D. G. Contributing factors in resistant hypertension: Truly refractory disease is rarely found in a properly conducted workup // Postgrad. Med. — 2000, May I. — 107. — 5.
14. Kaplan N., Victor G. R. Kaplan's Clinical Hypertension. — 10th edition: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. — 560.
15. Gifford R. W., Tarazi R. C. Resistant hypertension: diagnosis and management // Ann. Intern. Med. — 1978. — 88. — 661–665.
16. Petrovic D., Bidovec M., Peterlin B. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and essential arterial hypertension in childhood // Folia Biol (Krakow). — 2002; 50 (1–2): 53–6.
17. Camci L. et al. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism frequency in normotensive children with a positive family history of essential hypertension // J. Paediatr. Child. Health. — 2009; 45 (12): 742–6.
18. Spiering W. et al. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor 1166C polymorphism in essential Hypertensives on a high sodium diet // Hypertension. — 2000; 36: 411–6