

Особенности распределения полиморфизма генов *ACE*, *CHIT1*, *PON1*, *SIRT1* и *NOS3* у больных вибрационной болезнью*

Спицын В.А.¹, Кузьмина Л.П.², Макаров С.В.¹, Карапетян М.К.¹,
Попова М.В.¹, Бычкова Л.С.¹, Самохин А.С.¹, Спицына Н.Х.³

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, 1. e-mail: ecolab@med-gen.ru

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда», Москва

³ — ФГБНУ «Институт этнологии и антропологии им. Н.Н.Миклухо-Маклая», Москва

Представлены результаты молекулярно-генетического исследования полиморфизма в генах *ACE*, *CHIT1*, *SIRT1*, *NOS3* и *PON1* в группе больных вибрационной болезнью (ВБ) в сравнении с контрольной выборкой лиц преимущественно русской национальности. Среди больных ВБ установлено подобие в распределении частот генов *ACE*, *CHIT1*, *NOS3* с распространением таковых у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Получена информация о статистически значимых различиях в частотах полиморфных вариантов генов *ACE* и *NOS3* между когортами больных ВБ и контролем. Замечено своеобразие в частотах генотипов *CHIT1* у пациентов с ВБ. Не подтверждена ранее установленная связь между ВБ и генотипами *SIRT1*.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, *ACE*, *CHIT1*, *SIRT1*, *NOS3*, *PON1*, вибрационная болезнь

Введение

Наличие в производственных процессах таких технологических эффектов, как вибрация, электромагнитные волны, шум, усиливает влияние неблагоприятных факторов на здоровье лиц, в них занятых. Заболевания, обусловленные подобными факторами, отличаются своеобразием патологических процессов, полисиндромностью и наличием специфических и неспецифических симптомов, усложняющих диагностику. Систематическое воздействие вибрации на организм приводит к нарушению систем поддержания гомеостаза и развитию патологических состояний.

ВБ — профессиональное заболевание, развивающееся при воздействии ритмических колебаний на организм человека. Данное заболевание занимает одно из ведущих мест в профессиональной патологии. ВБ может рассматриваться в качестве модели системного первично-дистрофического процесса, обусловленного нарушением универсальных механизмов гомеостаза [3, 5]. Это заболевание может сопровождаться нарушениями нейрогормональной регуляции, микроциркуляции, тканевого и клеточного метаболизма [3, 5, 12]. Высоко-частотная вибрация оказывает сосудосуживающее воздействие, вплоть до проявления симптомов спазма сосудов. В зависимости от степени вибрационной чувствительности человека меняется и интенсивность выраженности спазма. С течением времени в организме развиваются изменения дистрофического характера. В целом, в основе вибрационной болезни лежит целый ряд нер-

вных и рефлекторных нарушений в системах, регулирующих тонус сосудов [2, 3]. Вибрационная болезнь в зависимости от степени выраженности действующей вибрации характеризуется тремя формами патологического процесса [2]:

- вибрационная болезнь вследствие воздействия локальной вибрации;
- вибрационная болезнь вследствие воздействия смешанной вибрации;
- вибрационная болезнь вследствие воздействия общей вибрации.

По тяжести заболевания выделяются 4 стадии заболевания: начальная, умеренно-выраженная, выраженная и генерализованная. При этом в патогенезе ВБ различают 7 синдромов: ангиодистонический (вегетососудистые нарушения в конечностях, нарушение капиллярного кровообращения), ангиоспастический (синдром «белых пальцев»), синдром вегетативного полиневрита, невротический, вегетомиофасцит, дизэнцефальный и вестибулярный.

К настоящему времени существуют лишь единичные публикации, касающиеся изучения ассоциаций генетических полиморфизмов с ВБ. В работе В.В. Карповой [7] представлены характеристики распределения серологических и генетико-биохимических маркёров при ВБ. При анализе групп крови AB0, Rh, MN, а также сывороточных маркёров HP и GC специфического для больных ВБ распределения маркёров отмечено не было. Исследование В.В. Переверзевой [10] касалось изучения

* Авторы выражают благодарность д.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека ФГБНУ Института биохимии и генетики УНЦ РАН Джемилевой Лиле Усеиновне за помощь в определении генотипов *SIRT1*. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту №14-06-00422а.

HLA-антигенов при ВБ у шахтеров Магаданской области, страдающих ВБ. У больных ВБ наблюдалось отсутствие антигенов Cw1 и B22, и при этом достоверно чаще встречался фактор B16. В рассматриваемом аспекте наиболее интересным представляется обнаружение ассоциации между вариантом ВБ — синдрома «белых пальцев» (VWF) и одним из полиморфизмов в гене сиртуина-1 (*SIRT1*) [20]. Оказалось, что только 4 из 113 полиморфизмов определяют экспрессию гена *SIRT1* и только аллель G связан с развитием синдрома VWF. Вариант ВБ — VWF, или болезнь псевдо-Рейно, — является сосудодистастическим заболеванием рук, которое выражается в нарушении кровоснабжения и иннервации пальцев рук. Коллектив авторов [20] показал, что в выборке больных однонуклеотидный полиморфизм A2191G в 9-м экзоне характеризуется следующими частотами: A/A — 70,5%, A/G — 29,5% и G/G — 0%, тогда как в популяционном контроле получены значения частот генотипов *SIRT1*: A/A — 99,7%; A/G — 0,3%, G/G — 0,5% и различия между больными ВБ и контролем достоверны. Сиртуин-1 регулирует активацию других генов — он вовлечен в регуляцию эндотелиальной синтазы окиси азота (*NOS3*).

Целью настоящей работы было определение роли генетической компоненты и возможного вклада полиморфизма генов *ACE*, *CHIT1*, *SIRT1*, *NOS3* и *PON1* в развитие ВБ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 96 образцов крови больных ВБ из ФГБНУ «НИИ медицины труда». В качестве контрольных выборок использовался

материал лаборатории экологической генетики ФГБНУ «МГНЦ» из популяционных выборок от лиц преимущественно восточнославянского происхождения. Сбор биоматериала одобренный Этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» осуществлялся с получением информированного согласия от каждого обследуемого на участие в исследовании. Для выделения ДНК из периферической крови использовался набор «ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в соответствии с рекомендациями производителя.

Генотипирование по инсерционно-делеционным полиморфизмам в генах *ACE* (rs1799752), *CHIT1* (rs3831317) и *NOS3* (27-п.н.-повтор в 4 интроне) производилось методом PCR-AFLP, по *MboI*-полиморфным вариантам в локусе *PON1* (rs662) — методом PCR-RFLP. Для детекции полиморфного варианта гена *SIRT1* (rs35224060) была подобрана система с тремя аллельспецифическими праймерами (*SIRT_D* 5'-TACAAGTACAGAAATAATGAAGTT-3' и два модифицированных -*SIRT_UpA* 5'-ATCAAGAGGCAATTAATGAATCTA-3' и *SIRT_UpG* 5'-ATCAAGAGGCAATTAATGAAGGTG-3'). Амплификацию *NOS3* проводили на приборе C1000 (Bio-Rad) в течение 33 циклов в 25 мкл реакционной смеси, содержащей: 0,1–100 нг ДНК; 0,2 мМ каждого dNTP; по 1 мкМ каждого праймера (5'-CTATGGTAGTGCCTTGGCTGGAGG-3' и 5'-ACCGCCCAGGGAAGCTCCGCT-3'); 0,5 ед. Taq-полимеразы, 2,5 мкл 10-кратного буфера DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific Inc.). Амплифицированные фрагменты (169 и 196 п.н. — соответствующие 4a и 4b аллелям) разделяли методом электрофореза в 3%-ном агарозном геле с последующей визуализацией в УФ свете. Детальные опи-

Численности генотипов генов *ACE*, *CHIT1*, *PON1*, *SIRT1* и *NOS3* в выборках больных вибрационной болезнью (ВБ) и в контроле

Таблица 1

Ген	Генотип	Больные В Б			Контроль		
		No	Ne	χ^2_{HW}	No	Ne	χ^2_{HW}
<i>ACE*</i>	DD	36	32,09	2,6827 d.f. = 1 p > 0,05	57	63,50	2,7342 d.f. = 1 p > 0,05
	ID	39	46,83		137	123,98	
	II	21	17,09		54	60,51	
<i>CHIT1</i>	TT	56	56,27	0,0242 d.f. = 1 p > 0,05	73	74,73	1,5507 d.f. = 1 p > 0,05
	TH	35	34,45		32	28,55	
	HH	5	5,27		1	2,73	
<i>PON1</i>	QQ	36	34,80	0,4949 d.f. = 1 p > 0,05	122	126,63	3,1274 d.f. = 1 p > 0,05
	QR	26	28,41		86	76,74	
	RR	7	5,75		7	11,63	
<i>SIRT1</i>	AA	96			138		
	AG	0			0		
	GG	0			0		
<i>NOS3</i>	BB	63	61,60	0,8356 d.f. = 1 p > 0,05	151	150,32	0,2510 d.f. = 1 p > 0,05
	AB	27	29,79		36	37,36	
	AA	5	3,60		3	2,32	

Примечание. No — наблюдаемое и Ne — ожидаемое число лиц; — χ^2 по Харди–Вайнбергу; * $\chi^2 = 8,285$ — критерий достоверности различий по генотипам между группами ВБ и контроля по гену *ACE* (критическое значение 5% доверительного интервала = 5,991 и d.f. = 2).

Таблица 2

**Частоты аллелей генов *ACE*, *CHIT1*, *PON1*, *SIRT1* и *NOS3*
в выборках больных вибрационной болезнью (ВБ) и в контроле**

Ген	Аллель	Больные ВБ	Контроль
<i>ACE</i>	<i>ACE</i> *D	0,5781 ± 0,0356	0,5060 ± 0,0224
	<i>ACE</i> *I	0,4219 ± 0,0356	0,4940 ± 0,0224
<i>CHIT1</i>	<i>CHIT1</i> *T	0,7656 ± 0,0306	0,8396 ± 0,0252
	<i>CHIT1</i> *H	0,2344 ± 0,0306	0,1604 ± 0,0252
<i>PON1</i>	<i>PON1</i> *Q	0,7101 ± 0,0386	0,7674 ± 0,0204
	<i>PON1</i> *R	0,2899 ± 0,0386	0,2326 ± 0,0204
<i>SIRT1</i>	<i>SIRT1</i> *A	1,0000	1,0000
	<i>SIRT1</i> *G	0,0000	0,0000
<i>NOS3</i> #	<i>NOS3</i> *4B	0,8053 ± 0,0287	0,8895 ± 0,0161
	<i>NOS3</i> *4A	0,1947 ± 0,0287	0,1105 ± 0,0161

Примечание. # — статистически значимые различия в частотах аллелей *NOS3**4B и *NOS3**4A между когортой больных ВБ и контролем при $\chi^2 = 5,39$ при d.f. = 1

сания процедур для генов *ACE*, *CHIT1*, и *PON1* изложены предыдущих публикациях [6, 8, 9].

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Проверка на достоверность различий частот встречаемости генотипов в исследуемых группах осуществлялась посредством программы «Тест».

Результаты и обсуждение

Распределение генотипов генов *ACE*, *CHIT1*, *SIRT1*, *NOS3*, *PON1* в выборках больных ВБ и в контроле представлено в табл. 1. Во всех изученных локусах частоты встречаемости генотипов соответствовали равновесным по Харди—Вайнбергу.

В табл. 2 представлены частоты аллелей по генам *ACE*, *CHIT1*, *PON1*, *SIRT1* и *NOS3* в группах больных ВБ и в контроле.

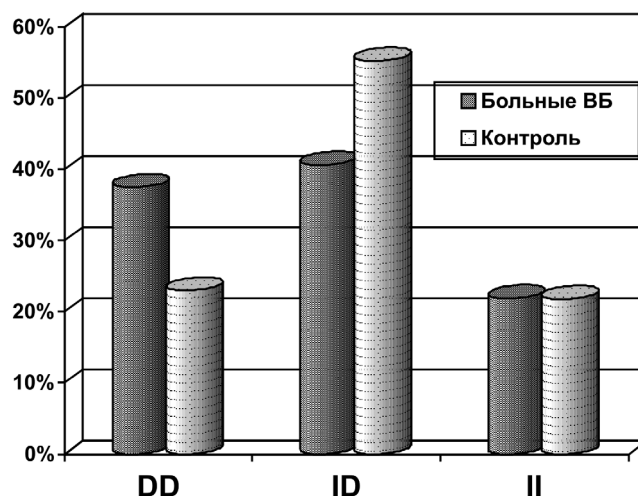
Обращает на себя внимание наличие статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей *ACE* между больными ВБ и контролем (в табл. 1, 2 и на рисунке при $\chi^2 = 8,285$, d.f. = 2). Среди больных ВБ статистически значимо преобладает гомозиготный генотип *ACE* DD (37,5%) при дефиците гетерозигот *ACE* ID (49,6%). В контроле частоты *ACE* DD и *ACE* ID составляют соответственно 23,00% и 55,2% (рисунок).

При идентификации ID (инсерционно-делеционного) полиморфизма гена *ACE* наличие делеции, как правило, ассоциируется с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, таких, как эссенциальная гипертензия, инфаркт миокарда, гипертрофия левого желудочка, ишемическая болезнь сердца, диабетическая нефропатия [15, 18, 19 и др.]. При этом следует подчеркнуть, что раннее клиническое проявление ВБ также связано с ранним появлением симптомов изменения характера сердечной деятельности. У пациентов с ВБ отмечается увеличение общей лабильности сердечного ритма. Особенностью коронарного кровообращения у больных ВБ является наличие безболевого ишемии миокарда в 39%

случаев, что может свидетельствовать о поражении мелких коронарных сосудов. При ВБ нарушение функционального состояния миокарда сопровождается диастолической дисфункцией при сохранении систолической функции. У изученных больных с ВБ регистрируются неспецифические изменения ЭКГ, характерные для диффузно-дистрофических изменений миокарда [1].

Как было упомянуто выше, до настоящего времени однонуклеотидный полиморфизм A2191G гена *SIRT1* являлся единственным маркером, ассоциированным с синдромом VWF, являющимся разновидностью ВБ.

Наши исследования не подтвердили связи полиморфизма A2191G гена *SIRT1* с развитием ВБ (табл. 1 и 2). Это обстоятельство может быть обусловлено сложностью патогенеза ВБ и разнообразием её клинического проявления. Но, учитывая наличие функциональной связи *SIRT1* с *NOS3*, мы сочли целесообразным исследовать полиморфизм в гене *NOS3*.



Распределение частот генотипов *ACE* в группе больных вибрационной болезнью и контроле.