

# Полиморфизм +1675G>A гена *AGTR2* ассоциирован с развитием ишемического инсульта

Стецкая Т.А.<sup>1</sup>, Полоников А.В.<sup>1</sup>, Солдатов В.О.<sup>1</sup>, Бирюков А.Е.<sup>2</sup>,  
Ласков В.Б.<sup>1</sup>, Иванов В.П.<sup>1</sup>, Бушуева О.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации, Курск, Россия.

Кафедра биологии, медицинской генетики и экологии; кафедра неврологии и нейрохирургии. E-mail: olga.bushueva@inbox.ru.

<sup>2</sup> Бюджетное медицинское учреждение «Курская областная клиническая больница» комитета здравоохранения Курской области, Курск, Россия

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система является ключевым регулятором сосудистого тонуса. Целью исследования было изучение ассоциации полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* (*rs1403543*) с риском развития ишемического инсульта (ИИ) на фоне артериальной гипертензии у русских жителей Центрального Черноземья. Материалом для исследования послужили 717 образцов ДНК: 414 пациентов с ИИ и 303 относительно здоровых индивидов соответствующего пола и возраста с нормальным уровнем артериального давления (АД). Генотипирование полиморфизма +1675G>A проводили методом аллельной дискриминации с помощью TaqMan-зондов. При стратифицированном анализе установлено, что гомозиготный генотип +1675AA ассоциирован с повышенным риском развития ИИ у женщин (OR = 2,09, 95%CI = 1,20–3,62; p = 0,01). При этом носительство гетерозиготного генотипа +1675GA ассоциировано с пониженным риском возникновения ИИ (OR = 0,49, 95%CI = 0,31–0,78; p = 0,002). Таким образом, в исследовании обнаружена ассоциация полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* с развитием ИИ у женщин Центрального Черноземья.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, наследственная предрасположенность, ген рецептора ангиотензина II 2 типа, ренин-ангиотензин-альдостероновая система, половой диморфизм.

## Polymorphism +1675G>A in gene encoding *AGTR2* is associated with the development of ischemic stroke

Stetskaya T.A.<sup>1</sup>, Polonikov A.V.<sup>1</sup>, Soldatov V.O.<sup>1</sup>, Biryukov A.E.<sup>2</sup>,  
Laskov V.B.<sup>1</sup>, Ivanov V.P.<sup>1</sup>, Bushueva O.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation, e-mail: olga.bushueva@inbox.ru

<sup>2</sup> Kursk Regional Hospital, Kursk, Russian Federation

The renin-angiotensin system is a major regulator of blood pressure. The aim of this study was to investigate the association of polymorphisms +1675G>A (*rs1403543*) of *AGTR2* gene with the risk of ischemic stroke (IS) in the population of Central Russia. We studied DNA samples obtained from 717 subjects, including 414 IS patients and 303 sex- and age-matched healthy individuals. The polymorphisms were genotyped by polymerase chain reaction TaqMan allele discrimination (+1675G>A) assays. The gender-stratified analysis showed that +1675AA genotype associated with an increased risk of ischemic stroke in women (OR = 2,09; 95%CI 1,20–3,62, p = 0,01) while the heterozygous +1675GA genotype associated with a reduced risk of IS (OR = 0,49 95% CI from 0,31–0,78; p = 0.002). This study was the first to demonstrate the association of the +1675G>A (*rs1403543*) polymorphism of *AGTR2* gene with the risk of ischemic stroke in woman from Central Russia.

**Keywords:** ischemic stroke, genetic predisposition, angiotensin II type 2-receptor gene, renin-angiotensin-aldosterone system, sexual dimorphism.

### Введение

В настоящее время цереброваскулярная патология занимает 2-е место в структуре смертности и 1 место в структуре причин инвалидизации во всем мире. В Российской Федерации, частота возникновения мозгового инсульта составляет 350–400 случаев на 100 тыс. населения и этот показатель отрицательно сказывается на продолжительности жизни пациентов и их трудоспособности [1].

Ишемический инсульт (ИИ) представляет собой комплексную, мультифакториальную патологию, развивающуюся вследствие взаимодействия генетических

факторов и факторов внешней среды. Одним из ведущих факторов риска ИИ является артериальная гипертензия (АГ). В многокомпонентном механизме регуляции артериального давления (АД), значимая роль отводится генам ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС). При этом наиболее активным регулятором сосудистого тонуса является октапептид — ангиотензин II (АТII). Его сосудистые эффекты преимущественно опосредованы через два специфических типа рецепторов — ангиотензиновый рецептор 1-типа (АТ1) и ангиотензиновый рецептор 2-типа (АТ2), экспрессирующихся во многих органах. Поскольку основные гипер-

тензивные и пролиферативные эффекты РААС реализуются через рецептор АТ1, ген рецептора к ангиотензину II 1 типа (*AGTR1*) наиболее широко изучен относительно его взаимосвязи с развитием ИИ [2].

Рецептор АТ2 является антагонистом рецептора АТ1, и через стимуляцию этого типа рецептора реализуются преимущественно депрессорные и вазодилатирующие эффекты [3]. В гене рецептора ангиотензина II 2 типа (*AGTR2*) установлено несколько вариабельных участков, однако одним из наиболее функционально значимых является полиморфный вариант +1675G>A, локализованный на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq22-q23 [4]. В литературе мы обнаружили только одно исследование, в котором изучалась взаимосвязь полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* с развитием ИИ. В данной работе, выполненной на относительно небольшой выборке пациентов, ассоциации обнаружено не было [5].

Целью нашего исследования стало изучение ассоциации полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* с риском развития ИИ на фоне АГ у русских жителей Центрального Черноземья.

#### Материалы и методы

Материалом для исследования послужила выборка неродственных индивидов, проживающих в Центрально-Черноземном регионе России, общей численностью 717 чел. Проведение исследования одобрено региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета. В исследование было вовлечено 414 больных с ИИ, проходивших стационарное лечение в неврологических отделениях Курской областной клинической больницы и городской больницы скорой медицинской помощи г. Курска [6, 7]. Диагноз ИИ устанавливался квалифицированными врачами-неврологами, верифицировался нейровизуализационными методами обследования, в частности компьютерной томографией головного мозга (General Electric). Критериями включения в исследование были: установленный диагноз ИИ по атеротромботическому типу, славянский этнос, отсутствие родственной связи между индивидами. Критериями исключения из исследования были онкологические, аутоиммунные, системные заболевания соединительной ткани, соматические заболевания бронхолегочной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, почек, печени и крови, которые могли бы послужить причиной возникновения острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). Кроме того, из исследования исключали пациентов с геморрагическим инсультом.

Контрольную группу составили 303 практически здоровых индивида с нормальным уровнем АД, без хронических заболеваний сердца, почек, эндокринных, онкологических, гематологических патологий, которые могли бы провоцировать ОНМК.

Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследуемые группы не отличались по поло-возрастным характеристикам ( $p > 0,05$ ). Средний возраст больных группы ИИ (218 мужчин, 196 женщин) составил  $62,8 \pm 10,6$  года, пациентов контрольной группы (177 мужчин, 126 женщин) —  $62,3 \pm 8,4$  года.

У всех пациентов проводился забор венозной крови в количестве 5—10 мл в пластиковые пробирки с 0,5М ЭДТА, после данной процедуры образцы крови замораживали при  $20^{\circ}\text{C}$ . Геномную ДНК выделяли из размороженной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* (*rs1403543*) выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad).

Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов с риском развития ИИ использовали критерий  $\chi^2$  и отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica for Windows 8.0 («StatSoft») и Excel 2007 («Microsoft»).

#### Результаты и обсуждение

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма G1675A гена *AGTR2* в контрольной группе соответствовало популяционному равновесию Харди—Вайнберга ( $p > 0,05$ ). В то же время в группе больных выявлено отклонение от популяционного равновесия Харди—Вайнберга за счет уменьшения наблюдаемой гетерозиготности ( $p < 0,001$ ).

В связи с тем, что ген *AGTR2* локализован на X-хромосоме, мы проводили сравнительный анализ частот аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма отдельно в группе мужчин и женщин (таблица).

Из данных таблицы видно, что гомозиготный генотип +1675AA гена *AGTR2* ассоциировался с повышенным риском развития ИИ у женщин (OR = 2,09; 95%CI 1,20—3,62,  $p = 0,01$ ). В то же время, гетерозиготное носительство генотипа +1675GA гена *AGTR2* обладало протективным эффектом относительно риска возникновения ИИ (OR = 0,49; 95%CI 0,31—0,78,  $p = 0,002$ ).

В рамках настоящей работы мы изучали взаимосвязь полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* с риском развития ИИ на фоне АГ.

Влияние ангиотензина II на сосудистый тонус опосредовано через ангиотензиновые рецепторы АТ1 и АТ2. В результате дисбаланса процессов взаимодействия между этими рецепторами нарушается регуляция сосудистого тонуса, что может способствовать развитию артериальной гипертензии, ИИ и других сосудистых заболеваний [8]. В эксперименте *in vivo*, проведенном на мышах, «выключение» экспрессии гена увеличивало вазоп-

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* у больных ИИ и группы контроля в зависимости от пола

| Аллели, генотипы  |         | Больные ИИ<br>(n = 414), n (%) <sup>1</sup> | Контрольная группа<br>(n = 303), n (%) <sup>1</sup> | $\chi^2$ (p) <sup>2</sup> | OR (95% CI) <sup>3</sup> |
|---|---------|---|---|---------------------------|--------------------------|
| Сравнительный анализ частот аллелей у мужчин (218 больных и 177 здоровых) |         |   |   |                           |                          |
| Аллели  | +1675G  | 0,495                                       | 0,531   | 0,99 (0,32)               | 1,15 (0,87–1,53)         |
|   | +1675A  | 0,505                                       | 0,469   |                           |                          |
| Частоты аллелей и генотипов у женщин (196 больных и 126 здоровых)         |         |   |   |                           |                          |
| Аллели  | +1675G  | 0,526                                       | 0,571   | 1,30 (0,25)               | 1,20 (0,88–1,66)         |
|   | +1675A  | 0,474                                       | 0,429   |                           |                          |
| Генотипы  | +1675GG | 70 (35,7)                                   | 40 (31,7)   | —                         | —                        |
|   | +1675GA | 66 (33,7)                                   | 64 (50,8)   | 9,34 (0,002)*             | 0,49 (0,31–0,78)         |
|   | +1675AA | 60 (30,6)                                   | 22 (17,5)   | 6,99 (0,01)*              | 2,09 (1,20–3,62)         |

Примечание. <sup>1</sup> Абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом; <sup>2</sup>  $\chi^2$  и p-уровень значимости (df = 1); <sup>3</sup> Отношение шансов с 95% доверительными интервалами. \* Показаны статистически значимые различия между группами.

рессорный ответ на влияние ангиотензина II [9]. Кроме этого, у мышей, нокаутированных по гену *AGTR2*, увеличивалось артериальное давление, отмечалось снижение базального уровня брадикинина и продукции оксида азота [10].

У человека ген *AGTR2* расположен на X-хромосоме, состоит из 3 экзонов и 2 интронов и кодирует белок с молекулярной массой 41 184 Da [11]. Данный белок состоит из 363 аминокислот, относится к семейству 1 рецепторов, сопряженных с G-белком и функционирует в качестве рецептора ангиотензина II [12]. Наибольший исследовательский интерес связан с полиморфизмом +1675G>A, локализованным в первом интроне, в непосредственной близости к промоторной области гена *AGTR2*. Функциональными исследованиями показано, что у носителей G-аллеля повышена экспрессия AT<sub>2</sub>-рецепторов с закономерным увеличением вазодилатации, повышением натрийуреза, уменьшением пролиферации гладкомышечных клеток [13]. В то же время у носителей аллеля +1675A отмечено снижение экспрессии гена, в связи с чем функциональные сосудистые эффекты AT II у них могут быть опосредованы в большей степени через рецепторы 1-го типа [14]. В нашем исследовании впервые обнаружено, что полиморфизм +1675AA гена *AGTR2* связан с повышенным риском развития ИИ. Полученные нами результаты согласуются с результатами исследований данного полиморфизма при ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии, в частности, с работой А. Jones и соавт., в которой была выявлена связь аллеля +1675A с развитием ишемической болезни сердца на фоне артериальной гипертензии [15], а также результатами исследования D. Tousoulis и соавт., в котором обнаружены протективные эффекты аллеля G относительно риска развития ИБС [16]. Необходимо также отметить исследование R. Schmieder и соавт., в котором было установлено, что у носителей аллеля +1675A гена *AGTR2* с AG отмечаются

более выраженные поражения органов-мишеней, в частности, гипертрофия левого желудочка [17].

Таким образом, в рамках настоящего исследования впервые установлена ассоциация полиморфизма +1675G>A гена *AGTR2* с риском развития ишемического инсульта, что позволяет рассматривать данный полиморфизм как новый генетический маркер подверженности инсульту. Полученные нами результаты требуют подтверждающих исследований в других популяциях мира. Кроме того, требуются дополнительные функциональные исследования гена *AGTR2*, в частности, эпигенетические, которые позволили бы понять механизмы регуляции экспрессии данного гена и охарактеризовать молекулярные механизмы его вовлеченности в патогенез ишемического инсульта.

### Список литературы

1. Суслина ЗА, Варакин ЮЯ. Эпидемиологические аспекты изучения инсульта. Время подводить итоги. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2007; 1(2): 22-28.
2. Bushueva OYu, Stetskaya TA, Vyalykh EK et al. An association study of A1166C polymorphism of the *AGTR1* gene with cerebral stroke in Russian population of Central Russia. *J. Clin. Exp. Med. Res.* 2014; 2(2): 176-184.
3. Hernandez-Schulman I, Zhou MS, Raji L. Cross-talk between angiotensin II receptor types 1 and 2: Potential role in vascular remodeling in humans. *Hypertension*. 2007 Feb; 49(2): 270-271.
4. Balmforth AJ. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms in cardiovascular disease. *Journals Renin Angiotensin Aldosterone System*. 2010 Mar; 11(1): 79-85.
5. Usacheva MA, Nasedkina TV, Ikonnikova AIu et al. Association of polymorphisms of Renin-Angiotensin and hemostasis system genes with ischemic stroke in Russians from Central Russia. *Mol. Biol.* 2012 Mar-Apr; 46(2): 214-223.
6. Стецкая ТА, Вялых ЕК, Булгакова ИВ и др. Исследование взаимосвязи I/D полиморфизма гена ACE с риском развития мозгового инсульта в популяции русских жителей Центрально-Черноземного региона России. *Человек и его здоровье*. 2014; (3): 33-36.

7. Stetskaia TA, Bushueva OIu, Bulgakova IV. Association of T174M polymorphism of the angiotensinogen gene with the higher risk of cerebral stroke in women. *Ter Arkh.* 2014; 86(12): 66-71.
8. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *Journal of the Renin-angiotensin-aldosterone System.* 2006; 7(1): 3-14.
9. Hein L, Barsh GS, Pratt RE et al. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature.* 1995 Oct; 377: 744-747.
10. Siragy HM, Inagami T, Ichiki T et al. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 May; 96(11): 6506-6510.
11. Lazard D, Briend-Sutren MM, Villageois P et al. Molecular characterization and chromosome localization of a human angiotensin II AT2 receptor gene highly expressed in fetal tissues. *Receptors Channels.* 1994; 2(4): 271-280.
12. Mukoyanna M, Nakajima M, Horiuchi M et al. Expression cloning of type-2 angiotensin II receptor reveals a unique class of 7-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 1993 Nov; 268(33): 24539-24542.
13. Warnecke C, Mugrauer P, Surder D et al. Intronic ANG II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Dec; 289(6): 1729-1735.
14. Jalowy A, Schulz R, Dorge H et al. Infarct size reduction by AT1-receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Nov; 32(6): 1787-1796.
15. Jones A, Dhamrait SS, Payne JR et al. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension.* 2003 Oct; 42(4): 500-506.
16. Tousoulis D, Koumallos N, Antoniadis C et al. Genetic polymorphism on type 2 receptor of angiotensin II, modifies cardiovascular risk and systemic inflammation in hypertensive males. *Am J Hypertens.* 2010 Mar; 23(3): 237-242.
17. Schmieder RE, Erdmann J, Delles C et al. Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans. *J Am Coll. Cardiol.* 2001 Jan; 37(1): 175-182.