

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

В данной статье рассмотрен инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм по гену ACE и его ассоциация с уровнем АПФ в плазме крови и развитием мультифакториальных заболеваний. Исследование ДНК сводилось к определению фракций через анализ электрофореграмм с помощью электрофореза и последующим флюоресцированием в УФ-лучах. Также в статье приведены расчёты аллельных и генотипических частот по гену ACE.

Ангиотензин-превращающий фермент, АПФ (angiotensin converting enzyme, ACE) гидролизует декапептид ангиотензин-I в вазопрессор ангиотензин-II, играет важную роль в регуляции кровяного давления и поддержании баланса электролитов, также влияет на фибринолиз, активацию и агрегацию тромбоцитов. Ген ангиотензинпревращающего фермента локализован на длинном плече 17-й хромосомы в локусе 17q23, содержит 26 экзонов, его размер составляет 45 т.н.п. В гене ACE проявляется инсерционно-делеционный полиморфизм, связанный с инсерцией (I) или делецией (D) Alu повтора размером 287 н.п. в интроне 16 гена ACE (рисунок 1) [1].

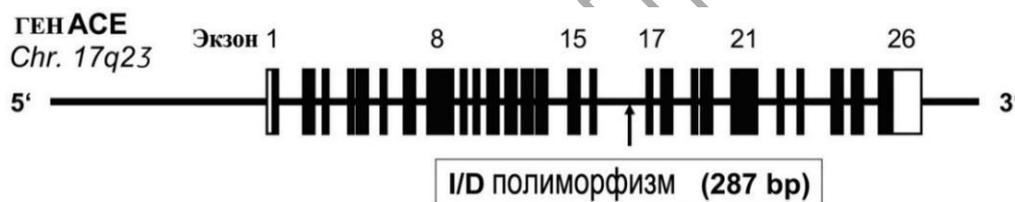


Рисунок 1 – Схематическое изображение гена ACE

Alu-повторы – это вставки фрагментов ДНК размером около 300 н.п. в геном человека, названные так в связи с тем, что впервые были обнаружены у бактерий *Arthrobacter luteus*. Наличие Alu-вставок в различных генах может служить маркерами заболеваний. Данный полиморфизм оказался ассоциирован с уровнем ACE в плазме крови и развитием ряда сердечно-сосудистых заболеваний, таких как эссенциальная гипертония, инфаркт миокарда диабетическая невропатия, нефропатия и гистоз, венозные тромбозы и тромбоэмболические осложнения, артериальная гипертензия, нефропатия беременных, преждевременные роды, синдром потери плода [2].

Известно более десяти полиморфных вариантов гена ACE, однако функционально наиболее значимым считается инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм в 16-м интроне (рисунок 2).

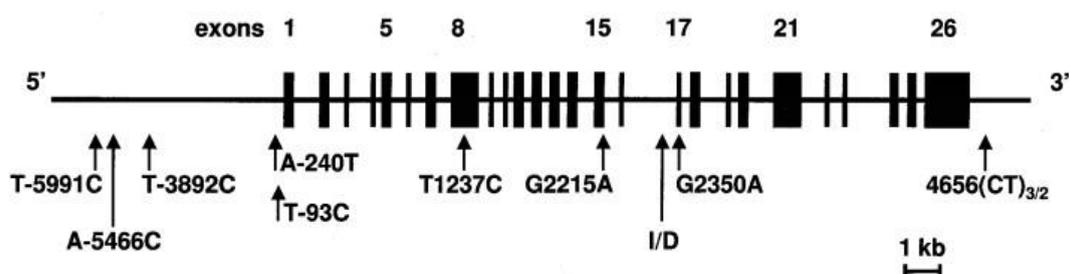


Рисунок 2 – Схематическое изображение полиморфизма гена ACE

Генетическая предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям, включая острые случаи ишемии, наблюдается и у людей, которые, согласно общепринятым критериям, характеризуются низкими факторами риска (к факторам риска обычно относят повышенный вес, гиперхолестеринемию, липопротеинемиию и др.). При обследовании больных диабетом было обнаружено, что D-аллели гена АПФ связаны с риском осложнения основного заболевания нефропатией, но не связаны с диабетической ретинопатией. Это наблюдалось как при инсулинзависимой, так и при инсулиннезависимой форме диабета. D-аллели гена ACE считают фактором риска возникновения инфаркта миокарда, гипертрофии левого желудочка, кровоизлияний, а также высоким риском развития атеросклероза. Группа исследователей из ряда стран пришла к заключению, что D-аллели связаны с повышенным риском заболевания коронарных сосудов, возникновения инфаркта миокарда, кровоизлияния и диабетической нефропатии, в особенности при атеросклеротических поражениях, но не связаны с гипертонией. Однако это не касалось злокачественной формы гипертонии, при которой отмечалась связь D-аллелей с риском заболевания. DD-генотип ACE при злокачественной форме встречался в три раза чаще, чем при доброкачественной форме.

I-аллели, как обнаружилось, связаны с повышенной выносливостью при физических нагрузках у спортсменов (бегунов, гребцов, альпинистов) [3].

Исследования проводились в период с июля 2019 года по февраль 2020 года в лаборатории генетики, биотехнологии и молекулярной биологии ГГУ им. Ф. Скорины.

Объектом исследования являлись студенты с различной физической подготовленностью. Молекулярно-генетические исследования проводились в лаборатории «Молекулярной биологии, генетики и биотехнологии» кафедры зоологии, физиологии и генетики биологического факультета УО «ГГУ им. Ф. Скорины». Основным биологическим материалом для выделения ДНК являлись буккальные клетки (клетки эпителия щеки). Выделение ДНК из исследуемых образцов проводилось с использованием упрощенного СТАВ-метода. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на программируемых термоциклерах с использованием термофильной ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех», Беларусь).

Таблица 1 – Количество и состав реагентов для амплификации гена ACE

№ п. п.	Реагент	Количество (объём)
1	ПЦР буфер 10X	25,8
2	MgCl ₂ 50 Mm	12,9
3	ACE 1 F 13,0 pmol/M	7,9
4	ACT 2 R 12,3 pmol/M	8,4
5	dNTP	5,2
6	DNA –polymerase	2,1
7	H ₂ O	175,1

ПЦР проводили в объеме 25 мкл. В пронумерованные реакционные ПЦР-пробирки Ахуген объемом 0,6 мл вносили смесь, содержащую 24 мкл ПЦР-микса и 1 мкл исследуемой ДНК. Тщательно перемешивали пипетированием и затем сверху наслаивали 25 мкл минерального масла для ПЦР. После чего пробирки помещали в амплификатор Терцик. Количество и состав реагентов в ПЦР-миксе для амплификации гена ACE приведены в таблице 1.

Результаты электрофореза полученных ампликонов гена ACE показали, что наиболее оптимальными для ПЦР-анализа являются следующие термопрофили: 94 °С – 1 мин; 62 °С – 1 мин; 72 °С – 1 мин. 10 сек. Параметры использованных термопрофилей приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры используемых термопрофилей для амплификации ACE

Стадии ПЦР	Температура	Время
Предварительная денатурация 30 циклов	94°С	7 мин
Денатурация	94°С	1 мин
Отжиг	62°С	1 мин
Элонгация	72°С	1 мин 10 сек
Заключительная элонгация	72°С	5 мин

На следующем этапе наших исследований мы определили генотипические и аллельные частоты. Полученные результаты были занесены в таблицу 3.

Таблица 3 – Инсерционно-делеционный полиморфизм гена ACE среди людей с различной физической нагрузкой

Показатели генетической изменчивости	Студенты биологического факультета
ΣN	24
II	0
ID	4
DD	20
II	–
ID	0,17
DD	0,83
ACE (I)	0,1
ACE (D)	0,9

Проведенный сравнительный анализ распределения частот генотипов по гену ACE среди людей с различной физической нагрузкой показал, что у студентов-биологов высока частота встречаемости генотипа D/D по гену ACE, что предрасполагает присутствие некоторых факторов риска к развитию болезней сердечно-сосудистой системы различной этиологии.

Литература

- 1 Митяева, О. Н. Анализ хромосомных транслокаций с участием гена MLL методом гибридизации с олигонуклеотидными микрочипами / О. Н. Митяева [и др.] // Молекулярная биология. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 1–8.
- 2 Keavney, B. Measured haplotype analysis of the angiotensin-1 converting enzyme gene / B. Keavney [et al.] // Human Molecular Genetics, 1998. – Vol. 7. – № II. – P. 1745–1751.
- 3 Ахметов, И. И. Молекулярная генетика спорта: монография / И. И. Ахметов. – Москва : Советский спорт, – 2009. – 268 с.