УДК 612.015.3-074/-078:575.174.015.3 (045)

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА NAT2 НА МЕТАБОЛИЗМ ХОЛЕСТЕРОЛА У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

[1]Шевченко О.В., [1]Бычков Е.Н., [2]Свистунов А.А., [1]Бородулин В.Б., [2]Саратцев А.В., [2]Лосев О.Э., [3]Киселев А.Р., [3]Посненкова О.М.

[1] ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития России, Саратов, e-mail: shevchenkoov@inbox.ru;

[2]ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздравсоцразвития России, Москва;

[3]ФГБУ Саратовский НИИ кардиологии Минздравсоцразвития России, Саратов

Реакция ацетилирования является ключевой в превращении ацетилкоэнзима А (ацетил-КоА) в ацетоацетилкоэнзим А (ацетоацетил-КоА) и необходима для синтеза холесторола. Процесс ацетилирования осуществляется в основном ферментом N-ацетилтрансферазой 2 и может быть зависим от аллельных вариантов гена NAT2. Нарушения липидного состава крови обнаруживаются у 40–85 % больных артериальной гипертензией (АГ) и являются одним из самых неблагоприятных прогностических симптомов. Представлены данные по распределению аллельных вариантов гена NAT2 в популяции больных АГ, а также зависимости уровня общего холестерина от мутаций этого гена. Среди пациентов с I и II степенью АГ чаще ($p < 0,05$) встречаются гомозиготы по следующим аллельным вариантам («медленные» ацетиляторы): NAT2*5A (341T → C и 481C → T), NAT2*5B (341T → C, 481C → T, 803A → G) и NAT2*6A (282C → T, 590G → A). При этом у пациентов с I степенью АГ обнаружен более низкий уровень холестерина крови. Сделан вывод, что «медленные» аллельные варианты гена NAT2 способствуют снижению уровня фермента N-ацетилтрансферазы, замедляя реакцию превращения ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА и нарушая многоэтапную цепь синтеза холестерола.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, полиморфизм гена NAT2, метаболизм холестерола

EFFECT OF NAT2 GENE POLYMORPHISMS ON CHOLESTEROL METABOLISM IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

[1]Shevchenko O.V., [1]Bychkov E.N., [2]Svistunov A.A., [1]Borodulin V.B., [2]Saratscev A.V., [2]Losev O.E., [3]Kiselev A.R., [3]Posnenkova O.M.

[1]Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: shevchenkoov@inbox.ru;

[2]First Moscow State Medical University I.M. Sechenov, Moskow;

[3]Saratov Research Institute of Cardiology, Saratov

Acetylation is a key in turning atsetilkoenzim A to acetoacetyl-CoA and is required for the synthesis of holesterol. The process of acetylation is carried out mainly by the enzyme N-acetyltransferase 2 and may be dependent on the allelic variants of the gene NAT2. Lipid composition of blood have been found in 40–85 % of hypertensive patients and are one of the most adverse prognostic signs. Presents the data on the distribution of allelic variants of NAT2 gene among patients with different stages of arterial hypertension, as well as depending on the cholesterol level of mutations in this gene. Among patients with I degree of hypertension was significantly ($p < 0,05$) more often homozygous for the «slow» allelic variants. The study shows that patients, who are «slow» acetylators, have significantly lower levels of blood cholesterol. «Slow» allelic variants of NAT2 gene contribute to reducing the enzyme N-acetyltransferase, slowing the conversion of the reaction acetyl-CoA to acetoacetyl-CoA and breaking multistep synthesis of a chain of cholesterol. Mutation of the gene encoding the enzyme N-acetyltransferase, suffers the synthesis of cholesterol, which can significantly reduce the risk of cardiovascular events in hypertensive patients.

Keywords: arterial hypertension, genetic polymorphism NAT2, the metabolism of cholesterol

К группе ферментов биотрансформации ксенобиотиков относятся ариламин N-ацетилтрансферазы: N-ацетилтрансфераза 1 (NAT1) и N-ацетилтрансфераза 2 (NAT2), осуществляющие N- и O-ацетилирование ароматических и гетероциклических аминов и гидразинов. NAT1 и NAT2 являются близкими по первичной структуре (79–95 % гомологии аминокислотной последовательности, в зависимости от вида). Гены NAT хотя и расположены на одной хромосоме, но регулируются независимо друг от друга [8,9]. Данный фермент полиморфен, что фенотипически проявляется наличием в популяции «быстрых» и «медленных» ацетиляторов, при этом у представителей европеоидной расы частота «медленных» ацетиляторов составляет 40–60 % [9]. Основной причиной изменения активности N-ацетилтрансферазы являются однонуклеотидные замены в структурной области гена NAT2. Самые распространённые мутации гена NAT2: в 481 позиции цитозин заменяется тимином (встречается в кластере аллелей NAT2*5 – NAT2*5A, NAT2*5B), в 590 позиции гуанин заменяется аденином (встречается в кластере аллелей NAT2*6 – NAT2*6A и NAT2*6B). Показано, что «быстрые» и «медленные» ацетиляторы имеют разную степень риска развития рака моче-

вого пузыря и молочной железы, диабета, системной красной волчанки и других заболеваний [7].

С конца 80-х годов начали идентифицировать аллельные варианты гена NAT2, носительство которых приводит к «медленному» ацетилированию. Известно около 20 мутантных аллелей гена NAT2, все они наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Для европейской популяции наиболее распространенными мутантными аллелями являются NAT2*5B и NAT2*6A. Аллель NAT2*5B образуется сочетанием трех точечных мутаций: 341T → C, 481C → T, 803A → G; аллель NAT2*6A – сочетанием двух: 282C → T, 590G → A. Оба варианта составляют до 70–75 % всех аллелей NAT2 и около 95 % всех мутантных аллелей у европейцев, японцев и испанцев. Под руководством С.Ш. Сулейманова изучается роль фенотипа скорости ацетилирования в патогенезе различных заболеваний, а также различия в частотах фенотипов скорости ацетилирования в разных этнических группах коренных народов Крайнего Севера и Дальнего Востока [5]. По результатам генетического исследования жителей г. Москвы, исследователи сделали вывод о том, что распространенность «медленных» и «быстрых» ацетиляторов статистически значимо не отличается и составляет 47 и 44 % соответственно [2].

Доказано, что артериальная гипертензия (АГ) является одним из важнейших факторов риска развития атеросклероза. Несмотря на то, что известно уже более двухсот факторов, способных влиять на возникновение и течение атеросклероза, основными считаются АГ, гиперхолестеринемия и курение («большая тройка») [1]. Нарушения липидного состава крови обнаруживаются у 40–85 % больных с АГ. Следует помнить, что повышение холестерина на 1 % приводит к увеличению риска развития ишемической болезни сердца на 2 %. У больных АГ наблюдается дислипидемия, проявляющаяся в увеличении концентрации липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и снижении уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [4].

Цель исследования – проанализировать ассоциацию полиморфных вариантов гена NAT2 со степенью артериальной гипертензии и концентрацией общего холестерина в крови.

Материалы и методы исследования

Исследованы образцы ДНК 50 больных АГ без ассоциированных клинических состояний (28 женщин и 22 мужчины) в возрасте от 20 до 59 лет. Проводилось общепринятое клинико-инструментальное обследование больных, а также ряд дополнительных генетических и биохимических анализов. Изучались аллельные варианты гена NAT2 (NAT2*5A, NAT2*5B, NAT2*6A, NAT2*6B, NAT2*7B), приводящие к «медленному» ацетилированию. Пациенты по степени АГ были разделены на 3 группы: 1 группа – больные с I степенью АГ (21 человек); 2 группа – больные со II степенью АГ (13 человек); 3 группа – больные с III степенью АГ (16 человек).

При определении степени АГ руководствовались следующими уровнями систолического артериального давления (САД) и диастолического (ДАД), согласно рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов от 2010 г.: I степень – 140–159/90–99 мм рт. ст., II степень – 160–179/100–109 мм рт. ст., III степень – > 180/ > 110 мм рт. ст. АГ устанавливалась при стабильном повышении САД > или = 140 мм рт. ст. и/или ДАД > или = 90 мм рт. ст. по данным не менее чем двукратных измерений АД по методу Н.С. Короткова при трех последовательных визитах с интервалом не менее одной недели у лиц, не принимающих антигипертензивных препаратов.

Использовался один из самых эффективных на сегодняшний день методов генетического тестирования – исследование на гидрогелевых биочипах. Методика, разработанная в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, основана на гибридизации в микроячейках биологического чипа. Технология анализа генетического полиморфизма предполагает мультиплексную амплификацию фрагментов ДНК с использованием флуоресцентно меченых праймеров и добавление меченого продукта на микробиочип, где происходит его гибридизация с иммобилизированными в геле зондами. Ячейки с зондами располагаются на планшете в несколько рядов, и каждая ячейка содержит уникальный индивидуальный зонд, являясь микропробиркой для проведения реакции. Число гелевых ячеек и их расположение на подложке зависит от задач и условий планируемого эксперимента. Компьютерная программа вычисляет интенсивности флуоресцентных сигналов в ячейках и определяет, в каких ячейках образовались устойчивые комплексы. Детектор выдает отчет о наличии в исследуемом образце специфичной мишени. Данный метод позволяет анализировать до 50 полиморфных вариантов с точностью более 99 % [3]. (Возможность изучения полиморфизмов на чипах в ходе исследования предоставлена ООО «Геночип» г. Саратов). В качестве биологического материала использовалась периферическая кровь. Весь материал был собран с соблюдением процедуры информированного согласия пациентов. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение уровня общего холестерина проводилось с помощью энзиматического фотометрического теста «CHOD-PAP» – определение холестерина ферментативным гидролизом и окислением [6]. Согласно европейским рекомендациям уровень общего холестерина менее 5,2 ммоль/л считался желаемым или нормальным; от 5,2 до 6,5 ммоль/л – легкой гиперхолестеринемией; от 6,5 до 7,8 ммоль/л – умеренной гиперхолестеринемией; 7,8 ммоль/л и выше – выраженной гиперхолестеринемией.

Выявление зависимости уровня холестерина от аллельных вариантов гена NAT2 проводилось с помощью корреляционного анализа Кендалла. Оценка

статистической значимости различий долей (частот встречаемости) выполнялась на основе критерия χ^2.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице представлено распределение аллельных вариантов гена NAT2 у больных с разной степенью АГ. Из обследованных пациентов с I степенью АГ «медленными» ацетиляторами (гомозиготами по мутантному варианту гена NAT2) явились: по аллельным вариантам NAT2*5A (341T → C и 481C → T) – 43 %, по аллельным вариантам NAT2*5B (341T → C, 481C → T, 803A → G) – 57 %, по аллельным вариантам NAT2*6A (282C → T, 590G → A) – 52 %, по аллельным вариантам NAT2*6B (590G → A) и NAT2*7B (282C → T, 857G → A) – 29 %.

Распределение гомозигот по мутантным аллельным вариантам гена NAT2 у больных АГ

Степень АГ	NAT2*5A		NAT2*5B			NAT2*6A		NAT2*6B	NAT2*7B	
	341T-C	481C-T	341T-C	481C-T	803A-G	282C-T	590G-A	590G-A	282C-T	857G-A
I степень n = 21	C/C – 6	T/T-3	C/C -5	T/T-6	G/G-1	T/T- 7	A/A-4	A/A-3	T/T-2	A/A-1
II степень n = 13	C/C – 2	T/T-4	C/C-2	T/T-5	G/G-4	T/T-0	A/A-3	A/A-2	T/T-3	A/A-2
III степень n = 16	C/C – 2	T/T-0	C/C-3	T/T-2	G/G-1	T/T-1	A/A-0	A/A-1	T/T-1	A/A-0

Примечание: данные представлены в абсолютном количестве пациентов (n). Знак «→» в заголовках столбцов таблицы заменен на «–».

У пациентов со II степенью АГ распределение генотипов несколько отличалось: NAT2*5A (341T → C и 481C → T) – 46 %, NAT2*5B(341T → C,481C → T,803A → G)– 85 %, NAT2*6A (282C → T, 590G → A) – 23 %, NAT2*6B (590G → A) и NAT2*7B (282C → T, 857G → A) – 54 %.

Среди больных III степенью АГ распределение генотипов по аллельным вариантам было следующим: NAT2*5A (341T → C и 481C → T) – 13 %, NAT2*5B (341T → C, 481C → T, 803A → G) – 38 %, NAT2*6A (282C → T, 590G → A), NAT2*6B (590G → A) и NAT2*7B (282C → T, 857G → A) – 19 %.

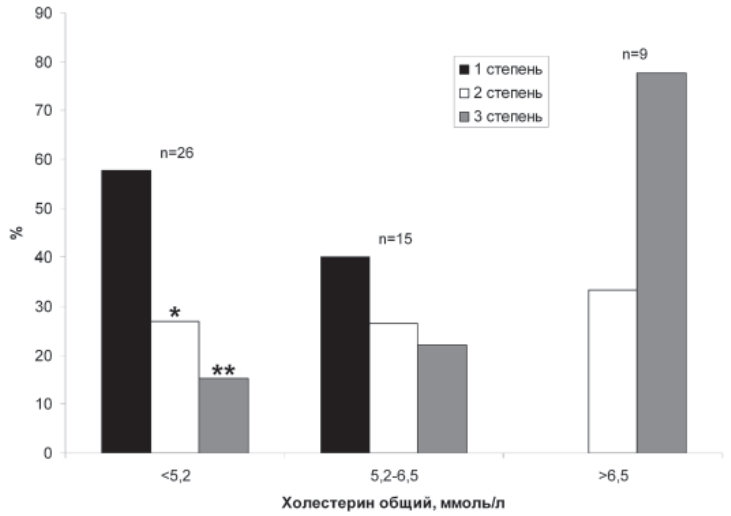
Холестерол – стероид, характерный только для животных организмов. Он синтезируется во многих тканях человека, но основное место синтеза – печень. В печени синтезируется более 50 % холестерола, в тонком кишечнике до 15–20 %, остальной холестерол синтезируется в коже, коре надпочечников, половых железах. В сутки в организме синтезируется около 1 г холестерола; с пищей поступает 300–500 мг. Процесс синтеза холестерола включает 35 стадий, основными из которых являются превращение активного ацетата в мевалоновую кислоту, образование изопентенилдифосфата, образование сквалена, циклизация сквалена в холестерин. Ацетил-КоА – макроэргический продукт конденсации коэнзима-А с уксусной кислотой. Именно в форме ацетил-КоА уксусная кислота участвует в синтезе холестерина. Кофермент А (КоА) – кофермент ацетилирования (один из важнейших коферментов); принимает участие в реакциях переноса ацильных групп. КоА действует в качестве промежуточного звена, связывающего и переносящего кислотные остатки на другие вещества. Обмен холестерола чрезвычайно сложен, для его синтеза необходимо осуществление нескольких десятков последовательных реакций. Нарушения обмена холестерола приводят к одному из наиболее распространённых заболеваний – атеросклерозу [1].

Одним из наиболее значимых исследований, показавших связь между уровнем общего холестерина крови и сердечно-сосудистой смертностью больных АГ, является Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) [10]. Его результаты показали: чем выше уровень холестерина у пациентов с артериальной гипертензией, тем выше сердечно-сосудистая смертность. Вместе с тем при одном и том же уровне холестерина смертность больных в связи с ишемической болезнью сердца была в 3–4 раза выше при наличии АГ по сравнению с лицами, не страдающими АГ.

Результаты нашего исследования показали (см. таблицу), что среди больных с I степенью АГ чаще встречаются гомозиготы по следующим аллельным вариантам: NAT2*5A (341T → C и 481C → T), NAT2*5B (341T → C, 481C → T) и NAT2*6A (282C → T, 590G → A). Среди изученных мутаций у больных со II степенью АГ интерес, по нашему мнению, представляют следующие: 481C → T гена NAT2*5A, 481C → T и 803A → G гена NAT2*5B. «Медленные» аллельные вариан-

ты по указанным генам встречались в исследуемых образцах чаще других. Значительно реже гомозиготы по изучаемым аллельным вариантам «медленного» ацетилирования наблюдались у больных с III степенью АГ.

Ферментативный анализ показал, что 52% (26 чел.) обследуемых больных АГ имели нормальный уровень холестерина (менее 5,2 ммоль/л); при этом статистически значимо ($p < 0,05$) большинство из них имели I степень АГ (рисунок). У 30% (15 чел.) больных содержание холестерина в крови имело значения в диапазоне от 5,2 до 6,5 ммоль/л, при этом в данной категории в более-менее равной мере представлены пациенты всех трех степеней АГ (см. рисунок). У 18% (9 чел.) пациентов выявлялся уровень холестерина более 6,5 ммоль/л; большинство из них имели III степень АГ (статистически значимых различий в группе выявлено не было по причине малого числа наблюдений) (рисунок).



Распределение частоты встречаемости трех степеней АГ в подгруппах пациентов с различным уровнем общего холестерина крови. Примечание: статистическая значимость отличий по частоте встречаемости от пациентов с АГ 1 степени представлена на уровне $p < 0,05$ (*) и $p < 0,01$ (**)

Изучение зависимости уровня холестерина от аллельных вариантов гена NAT2 позволило выявить статистически значимую слабую связь между содержанием холестерина и аллельными вариантами генов NAT2*5A ($r = 0,172$, $p < 0,05$), NAT2*5B ($r = 0,186$, $p < 0,05$) и NAT2*6A ($r = 0,25$, $p < 0,05$).

Мы полагаем, что мутации гена NAT2, приводящие к медленному ацетилированию, нарушают процесс синтеза холестерола. Нами было показано, что генетические гомозиготные мутации, обусловливающие медленное ацетилирование, в исследуемой группе пациентов чаще выявляются при I и II степени АГ, что согласуется с выявленной ассоциацией повышенного уровня общего холестерина с увеличением степени АГ ($r = 0,39$, $p < 0,001$) (см. рисунок). Очевидно, что уровень общего холестерина в крови больных АГ так или иначе зависит от аллельных вариантов гена NAT2.

Заключение

«Медленные» аллельные варианты гена NAT2 способствуют снижению уровня фермента N-ацетилтрансферазы, замедляя реакцию превращения Ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА и нарушая многоэтапную цепь синтеза холестерола. В нашем исследовании показано, что у больных АГ наличие указанных генетических мутаций в определенной мере ассоциировано с уровнем общего холестерина. Мутации гена, кодирующего фермент N-ацетилтрансферазу, нарушая синтез холестерина, могут существенно снижать риск развития кардиоваскулярных осложнений у больных АГ. Однако у пациентов с III степенью АГ частота встречаемости подобных «благоприятных» мутаций низка, что способствует, в совокупности с другими факторами, более частому развитию гиперхолестеринемии.

Таким образом, представляет интерес дальнейшее изучение молекулярно-генетических связей между «медленными» аллельными вариантами гена NAT2 (с использованием методики гидрогелевых биочипов) и уровнем холестерина у больных АГ, а также их влияния на прогноз течения заболевания.

Список литературы

1. Аметов А.С., Демидова Т.Ю., Целиковская А.Л. Ожирение и сердечно-сосудистые заболевания // Тер. архив. – 2001. – № 8. – С. 66–69.

2. Голденкова-Павлова И.В. Сравнительный анализ результатов фенотипирования и генотипирования по полиморфизму N-ацетилирования у человека. / Голденкова-Павлова И.В., Брускин С.А., Абдеев Р.М. // Генетика: журнал Российской академии наук. – 2006. – Т. 42, №8. – С. 1143–1150.

3. Кожекбаева Ж.М., Глотов А.С., Гра О.А. Определение функционально-значимых мутаций гена NAT2 с помощью биологических микрочипов. // Молекулярная биология. – 2007. – № 41 (4). – С. 725–733.

4. Лазебник Л.Б., Комиссаренко И.А., Милюкова О.М. Артериальная гипертония и сопутствующие заболевания // В мире лекарств. – 2003. – № 3. – Р. 20–25.

5. Сулейманов С.Ш. Особенности функционирования системы биотрансформации ксенобиотиков в адаптивных реакциях и патологии малочисленных народов Крайнего Севера: автореф. дис. … д-ра мед. наук. – 1997. – 47 с.

6. Artiss J.D., Zak B. Measurement of cholesterol concentration // Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC Press. – 1997. – P. 99–114.

7. Evans D.A.P. N-acetyltransferase // Pharm. Therap. – 1989. – №42. – P. 157–234.

8. Hein D.W. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms ./ Hein D.W., Doll M.A, Fretland A.J. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2000. – №9 (1). – P. 29–42.

9. Vatsis K.P. Nomenclature for N-acetyltransferases / K.P. Vatsis, W.W. Weber, D.A. Bell // Pharmacogenetics. – 1995. – № 5 (1). – С. 1–17.

10. Stamler J., Vaccaro O., Neaton J.D. For the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Diabetes, other risk factors, and 12–yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial // Diabetes Care. – 1993. – №16. – P. 434–444.

References

1. Ametov A.S., Demidova T.Ju., Celikovskaja A.L. *Ter. Arhiv*, 2001, no. 8, pp. 66–69.

2. Goldenkova-Pavlova I.V., Bruskin S.A., Abdeev R.M. *Genetika:ZhurnalRossijskoj akademiinauk,* 2006, Vol. 42, no. 8, pp. 1143–1150.

3. Kozhekbaeva Zh.M., Glotov A.S., Gra O.A. *MolekuljarnajaBiologija,* 2007. Vol.41, no.4, pp. 725–733.

4. Lazebnik L.B., Komissarenko I.A., Miljukova O.M. *Vmirelekarstv,* 2003, no. 3. pp. 20–25.

5. Sulejmanov S.Sh. *Avtoref. Diss .... dokt.med.Nauk*, 1997, p. 47.

6. Artiss J.D., Zak B. *Handbookoflipoproteintesting. Washington:AACC Press*, 1997, pp. 99–114.

7. Evans D.A.P. *Pharm.Therap*, 1989, no. 42, pp. 157–234.

8. Hein D.W., Doll M.A, Fretland A J. *CancerEpidemiolBiomarkersPrev*, 2000, Vol.9, no.1, pp. 29–42.

9. Vatsis K.P., Weber W.W., Bell D.A. *Pharmacogenetics,* 1995, no.5, pp. 1–17.

10. Stamler J., Vaccaro O., Neaton J.D. *DiabetesCare*, 1993, no.16, pp. 434–444.

Рецензенты:

Пучиньян Д.М., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития России, г. Саратов;

Коршунов Г.В., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной и функциональной диагностики ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития россии, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 31.05.2012.