

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА I/D ГЕНА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ДНК У МУЖЧИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Е.А. ПАВЛЮЩИК¹, В.Ю. АФОНИН¹, В.Н. СОРОКИНА², Т.А. ЧАК², А.В. ХАПАЛЮК², М.В. АНИСОВИЧ¹

¹ Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

E-mail: e.pavlushchik@yandex.by

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Целью настоящей работы было оценить связь между полиморфизмом I/D гена ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) (rs4340) и уровнем повреждений ДНК у больных артериальной гипертензией (АГ). АПФ I/D полиморфизм определяли с помощью ПЦР у 170 мужчин с диагнозом АГ и 64 доноров без заболевания. Методом проточной цитометрии определяли уровень клеточной гибели, микроядер и распределение лейкоцитов периферической крови по фазам G1/G0, S, G2/M клеточного цикла. Дополнительно образцы цельной крови инкубировали in vitro при 4 °С на протяжении 24 ч для стимулирования повреждений ДНК. Сниженная частота клеток в синтетической фазе S и увеличенный уровень микроядер отмечены у пациентов с АГ по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). При этом достоверное повышение микроядер выявлено у пациентов с генотипом II, но не у носителей генотипов ID и DD. В условиях инкубации крови in vitro у здоровых мужчин с генотипом II наблюдалась наиболее активная гибель клеток и формирование микроядер. У пациентов с АГ наиболее высокий рост микроядер на фоне инкубации зафиксирован среди носителей генотипа DD. Полученные данные свидетельствуют о том, что полиморфизм I/D АПФ является важным определяющим фактором в процессах клеточной гибели и повреждений ДНК у здоровых мужчин и больных АГ.

Ключевые слова: повреждения ДНК, полиморфизм АПФ I/D, ангиотензин, гипертензия, клеточная гибель, апоптоз, микроядра.

Введение. Проблема увеличенного уровня генетических повреждений у больных с артериальной гипертензией (АГ) [1–4] привлекает внимание к повышенному риску развития злокачественных новообразований и таргетных повреждений органов. Установлена связь между уровнем артериального давления (АД) и онкологическими заболеваниями: имеются данные об увеличенной смертности от рака по-

чек, легких, толстой кишки, печени и поджелудочной железы у пациентов с АГ [5]. Повреждения ДНК также могут вести к гибели клеток и клеточному аресту [6], что способствует нарушению деятельности тканей и органов [7], поражению органов-мишеней при АГ.

Причины высокой частоты повреждений ДНК и повышенного риска развития новообразований у пациентов с АГ представляют собой дискуссионный вопрос. Лекарственные препараты антигипертензивной терапии, как известно, могут иметь генотоксический эффект [8]. Однако увеличение повреждений ДНК у спонтанно-гипертензивных крыс (SHR) – генетической модели гипертензии – предполагает возможное влияние генетических факторов [9]. Мононуклеарные клетки периферической крови от здоровых родственников больных легочной артериальной гипертензией также имеют увеличенный уровень повреждений ДНК, что свидетельствует о генетически детерминированной природе явления, не индуцированного исключительно антигипертензивной терапией [2].

Полиморфизм I/D гена ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) ассоциируется с АГ [10]. АПФ является металлопротеазой, которая превращает ангиотензин I в мощный вазопрессор и стимулятор роста гладкой мышечной ткани сосудов – ангиотензин II (АТ-II), а также вазодилататор брадикинин в неактивный метаболит. Инсерция (I) или делеция (D) повтора размером 287 пар нуклеотидных оснований в интроне 16 (SNP ID: rs4340) определяет три различных генотипа: гомозиготные DD и II, гетерозиготный ID. Генотип DD связан с более высоким уровнем и повышенной активностью циркулирующего АПФ, более высокой концентрацией АТ-II [11], который стимулирует выработку супероксид анионов, чем

© Е.А. ПАВЛЮЩИК, В.Ю. АФОНИН, В.Н. СОРОКИНА, Т.А. ЧАК, А.В. ХАПАЛЮК, М.В. АНИСОВИЧ, 2016

может способствовать повреждениям ДНК [12]. Кроме того, защитное действие ингибиторов АПФ против окислительного стресса в клетках сосудов при сердечно-сосудистых заболеваниях предполагает, что целесообразно изучение полиморфизма I/D АПФ в контексте генетических повреждений [13]. Таким образом, мы пришли к выводу, что АПФ I/D полиморфизм может оказывать влияние на интенсивность повреждений ДНК у пациентов с АГ, что согласно литературным данным прежде не было показано.

Основная цель настоящего исследования – изучение взаимосвязи между полиморфизмом I/D гена АПФ и биомаркерами повреждений ДНК при АГ и у здоровых индивидуумов контрольной группы.

Материалы и методы. Пациенты. Обследовано 170 мужчин, у которых диагностирована АГ II или III стадии, определенными в соответствии с рекомендациями ВОЗ [14]. Больные на момент их случайного отбора в исследование находились на стационарном лечении в «Республиканском госпитале МВД» Республики Беларусь. Необходимо было сформировать максимально гомогенную выборку во избежание межгрупповых различий в клеточном ответе на повреждающий фактор пролонгированной инкубации и в условиях заболевания. Поскольку распространенность АГ увеличивается с возрастом, а также наблюдается зависимое от возраста снижение клеточного ответа активности процессов репарации и накопление повреждений ДНК [15], пациенты старше 70 лет были исключены. В исследование включали пациентов только мужского пола в связи с тем, что генетические факторы, участвующие в экспрессии признаков гипертензии, играют большую роль у мужчин, определяя более высокую наследуемость (57 %) по сравнению с женщинами (46 %) [16]. Обнаружено также влияние пола пациентов при изучении ассоциации полиморфизма I/D гена АПФ с АГ [17]. Кроме того, эстроген снижает повреждения клеток, индуцированные АТ-II, что также может влиять на результат нашего исследования при включении в выборку пациентов женского пола [18]. Больные с признаками вторичной гипертензии, диагностированными злокачественными новообразованиями

или осложнениями, такими как острые нарушения мозгового кровообращения, острый коронарный синдром, хроническая сердечная недостаточность, хроническая почечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, нарушения ритма сердца и стенокардия III–IV функциональных классов, из исследования исключены. Разработана анкета для получения информации о социально-демографических, антропометрических данных и таких факторов риска заболевания, как возраст и наследственность. Контрольная группа состояла из 64 пациентов без АГ, рекрутированных в том же госпитале.

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено этическим комитетом госпиталя. Письменное информированное согласие получено от каждого участника.

Методы генотипирования. Образцы периферической крови собирали в пробирки типа вакутейнера с ЭДТА (F.L. Medical, Италия) и замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до экстракции ДНК. Выделяли ДНК с помощью коммерчески доступного набора («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Генотипы полиморфизма I/D гена АПФ определяли с помощью метода полимеразной цепной реакции, согласно тому, как описано в предыдущих работах [19], с небольшими изменениями. Использовали праймеры F: 5'-CTGGAGACCACCTCCCATCCTTTCT-3' и R: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'. ПЦР-амплификацию проводили в приборе SureCycler 8800 («Agilent Technologies», США). Образцы подвергали денатурации при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 мин, затем следовало 30 циклов при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 35 с, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 1 мин и конечный этап – элонгация при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 мин. Использовали стерильную воду для контроля перекрестной контаминации. Продукты амплификации визуализировали с помощью электрофореза на 2%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в концентрации 1 мг/мл. Продукт ПЦР с генотипом II проявлялся в виде полосы на геле размером 490 п.о. Генотип ID идентифицировали как два фрагмента – 490 и 190 п.о. Один отрезок в 190 п.о. обозначал генотип DD. Проводили повторное генотипирование около 10 % случай-

но отобранных образцов, при этом наблюдали 100%-ную конкордантность.

Проточная цитометрия. Показатели гибели клеток, уровень микроядер и распределение в трех фазах клеточного цикла (G1/G0, S, G2/M) лейкоцитов периферической крови служили в качестве биомаркеров повреждений ДНК, так как ранее показано, что повреждения ДНК способны инициировать клеточную гибель и приводить к задержке или остановке клеточного цикла в одном из его контрольных пунктов [6]. Микроядра могут иметь апоптотическую природу и указывать механизм гибели клеток, и/или представлять собой отстающие хромосомы или хроматидные фрагменты, вызванные нерепарированными разрывами ДНК [20]. Относительное содержание гибели клеток, микроядер и клеток в фазах клеточного цикла определены с помощью проточной цитометрии на основе измерения содержания ДНК в клетке, окрашенной пропидий йодидом. Венозную кровь собирали в пробирки с напылением гепарина и транспортировали на льду в пределах 4 ч в лабораторию, где вносили лизирующий раствор OptiLyse C («Beckman Coulter», США) и дважды промывали в фосфатно-буферном солевом растворе («Beckman Coulter», США). Образцы фиксировали в 1 мл свежеприготовленного 70%-ного спирта и хранили в темноте при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ от 24 ч до двух месяцев. Перед анализом клетки промывали дважды от спирта фосфатно-буферным солевым раствором, затем инкубировали в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре с РНКазой А для удаления РНК и пропидий йодидом. Анализировали около 10 000 клеток в каждом образце на проточном цитометре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США).

In vitro инкубация периферической крови. Венозную кровь больных АГ пациентов и здоровых доноров подвергали инкубации при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч для изучения чувствительности клеток с различными генотипами гена АПФ к индуцированным повреждениям. Условия инкубации выбирали на основе предыдущих исследований, которые показали достоверное увеличение разрывов ДНК в лимфоцитах человека после 24 ч хранения при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ образцов цельной крови [21]. После ин-

кубирования образцов *in vitro* проводили анализ доли гибели лейкоцитов, микроядер и распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии.

Статистический анализ. Обработку данных осуществляли с использованием пакета STATA 11 (StataCorp LP, США). Средние арифметические непрерывных переменных, которые имели нормальное распределение, сравнивали с использованием t-теста Стьюдента. Поскольку гибель клеток, распределение клеток в фазах клеточного цикла и уровень микроядер не имели нормального распределения, применяли ранговый дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса при исследовании ассоциации параметров с генотипами гена АПФ. U-критерий Манна-Уитни или логарифмическую трансформацию данных с последующим использованием двустороннего непарного t-теста Стьюдента применяли при сравнении параметров между контрольной группой и больными АГ. Изменения в переменных после инкубации *in vitro* анализировали с помощью критерия попарных сравнений Уилкоксона. Распределение генотипов гена АПФ между опытной и контрольной группами проверены путем расчета критерия χ^2 . Непрерывные, не имеющие нормального распределения переменные выражены в виде медианы и 25-го, 75-го перцентилей. Данные, отвечающие нормальному распределению, представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$.

Результаты исследований. Средний возраст 170 пациентов с АГ и 64 здоровых доноров мужского пола, включенных в исследование, составлял $47,9 \pm 8,15$ и $44,0 \pm 5,71$ лет соответственно. Возраст, окружность талии, индекс массы тела и частота наследственной отягощенности АГ значительно выше у больных мужчин по сравнению с донорами контрольной группы. Отмечено снижение доли клеток в синтетической фазе клеточного цикла S ($p < 0,05$), сопровождаемое повышением уровня микроядер ($p < 0,05$) и клеточной гибели ($p > 0,05$) у гипертензивных больных по сравнению с нормотензивными пациентами (табл. 1). Возраст не оказывал значительного влияния на ассоциацию АГ и частотой клеток в S-фазе или уровнем микроядер.

Распределение генотипов гена АПФ в контрольной группе и группе больных АГ соответствует распределению Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Распределение генотипов и аллелей гена АПФ не отличалось между выборками (рис. 1).

Дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса не обнаружил существенных различий в гибели клеток или уровне микроядер среди групп с различными генотипами гена АПФ ни среди больных АГ, ни среди здоровых доноров. Однако нормотензивные носители генотипа II имели наиболее низкий уровень микроядер и гибели клеток по сравнению с носителями генотипов ID и DD ($p > 0,05$, рис. 2). У больных АГ с генотипом II отмечен статистически значимо более высокий уровень микроядер по сравнению с нормотензивными донорами с генотипом II (увеличение на 179,2 %, $p < 0,05$, рис. 2, а). Кроме того, наибольшее увеличение уровня гибели клеток показано также у гипертензивных пациентов с генотипом II (увеличение на 67,1 % по сравнению с донорами контрольной группы, $p > 0,05$, рис. 2, б). При этом не обнаружено различий в уровне микроядер или клеточной гибели среди носителей аллеля D при сравнении пациентов с нормальным давлением и гипертензией.

При анализе изменений среди доноров с нормальным АД в отдельных генетических груп-

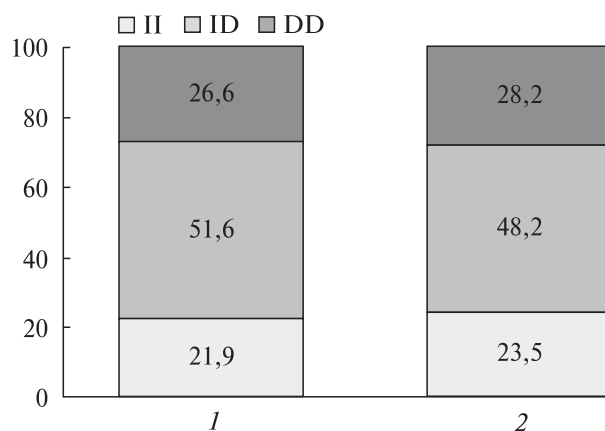


Рис. 1. Распределение частот генотипов гена АПФ (по вертикали, %): 1 – контрольная группа ($n = 64$); 2 – больные АГ ($n = 170$)

пах до и после инкубации крови при температуре 4 °С в течение 24 ч зарегистрировано наибольшее увеличение гибели клеток после инкубации у носителей генотипа II, несколько менее интенсивное у носителей DD и наименьшее увеличение отмечено у носителей генотипа ID (134,2; 67,8; 28,4 % соответственно) (рис. 3, б). Частота микроядер также в наибольшей степени увеличилась в клетках с генотипом II (56,6 %, $p > 0,05$) (рис. 3, а).

У больных АГ с генотипами ID и DD уровень гибели клеток в проинкубированной кро-

Таблица 1. Лабораторные и антропометрические характеристики больных АГ и здоровых доноров контрольной группы

Параметры	Больные АГ	Контрольная группа
Мужской пол, n (%)	170 (100,0)	64 (100,0)
Возраст, годы	47,9 ± 8,15	44,0 ± 5,71 *
Окружность талии, см	108,6 ± 11,9	94,8 ± 8,36 *
Индекс массы тела, кг/м ²	31,0 ± 4,56	27,0 ± 2,88 *
Наследственная отягощенность, %	84,7	61,5 *
Клеточная гибель, %	3,44 (1,76–5,63)	2,65 (1,56–4,73)
G1/G0, %	97,0 (95,3–98,3)	97,3 (96,0–98,5)
S, %	0,24 (0,00–0,66)	0,35 (0,18–0,92) *
G2/M, %	2,36 (1,11–3,64)	1,99 (1,05–3,03)
Микроядра, %	0,85 (0,50–1,97)	0,75 (0,50–1,26) *

Примечание. Переменные представлены в виде среднего арифметического ± стандартной ошибки для данных, имеющих нормальное распределение, и медианы (25–75-го перцентилей) для данных, не отвечающих нормальному распределению. * Достоверность различий $p < 0,05$ при сравнении пациентов контрольной группы и больных АГ.

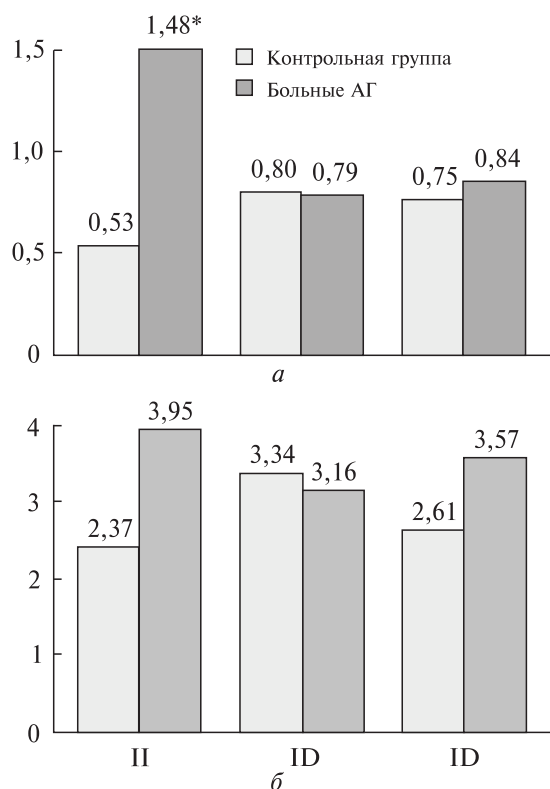


Рис. 2. Уровень микроядер (а) и гибели лейкоцитов (б) периферической крови у доноров контрольной группы и пациентов с АГ (по вертикали, %); по горизонтали – генотипы. * Достоверность различий в сравнении с донорами контрольной группы $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни

ви увеличился на 61,1 и 57,1 % соответственно, тогда как у больных с генотипом II повышение составило лишь 18,9 %. Пациенты с генотипом DD имели частоту микроядер значительно выше после инкубации по сравнению с образцами перед инкубацией (увеличение на 103,6 %, $p < 0,05$) (рис. 4), тогда как у носителей других генотипов не наблюдалось настолько интенсивное формирование микроядер.

Изменения в распределении лейкоцитов по фазам клеточного цикла зарегистрированы при АГ и в условиях инкубации (табл. 2). После инкубации лейкоцитов нормотензивных доноров, несущих генотип ID, доля клеток в фазе G1/G0 снизилась ($p < 0,05$), тогда как в фазе G2/M увеличилась ($p < 0,05$). Такие же изменения в клеточном цикле наблюдали в условиях заболевания АГ по сравнению с контрольной группой доноров.

Обсуждение полученных данных. В работе оценивали связь между полиморфизмом I/D гена АПФ и маркерами повреждения ДНК, такими как гибель клеток, образование микроядер и распределение лейкоцитов по фазам клеточного цикла. Частоты аллелей полиморфизма гена соответствовали описанным ранее [22]. Несмотря на то что во многих работах отмечена роль АПФ в риске развития АГ [10], нами не обнаружено различий в распределении генотипов гена АПФ между пациентами с АГ и контрольной группой.

Таблица 2. Медианные значения, %, данных клеточного цикла, полученных до и после инкубации крови больных АГ и доноров контрольной группы при температуре 4 °С в течение 24 ч

Группа	II			ID			DD		
	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M
Контроль									
до инкубации	96,3	0,35	2,79	97,6	0,38	1,2	96,7	0,22	2,05
после инкубации	96	0,41	2,38	96,6 *	0,44	2,45 *	97,5	0,31	1,59
Больные АГ									
до инкубации	96,9	0,21	2,59	97,0 **	0,21	2,51 **	97,5	0,34	1,96
после инкубации	96,9	0,47	2,33	97,1	0,40	2,17	97,5	0,43	1,58

* Достоверность различий $p < 0,05$ при сравнении данных нормотензивных пациентов до и после инкубации крови, критерий попарных сравнений Уилкоксона. ** Достоверность различий $p < 0,05$ при сравнении данных между группой контроля и больными АГ до инкубации периферической крови, U-критерий Манна-Уитни.

Относительно различий в маркерах повреждений ДНК между гипертензивными и нормотензивными индивидуумами первая группа имела значительно более высокую медиану микроядер и более низкую медиану доли клеток в фазе синтеза S клеточного цикла. Результаты согласуются с исследованиями, в которых сообщалось об увеличении генетических повреждений у людей с повышенным АД [1–4]. Исследования на животных также подтверждали полученные данные. У крыс линии SHR, предрасположенных к развитию высокого АД, повреждения хромосом и процент аномальных метафаз значительно выше по сравнению с крысами контрольной группы [9].

Нестабильность генома, обнаруженная у пациентов с АГ, может быть индуцирована окислительным стрессом [12]. Другим возможным фактором является повреждающее ДНК действие антигипертензивной терапии. Согласно обзору имеющихся токсикологических данных по 11 классам 164 доступных на рынке антигипертензивных препаратов, 99 из них дают положительный ответ по меньшей мере в одном из анализов на генотоксичность или канцерогенность [8]. Уменьшение доли лейкоцитов в фазе S у больных АГ может происходить из-за повышенной восприимчивости клеток на стадии пролиферации к повреждающим ДНК агентам и апоптозу, или же служить показателем подавленной пролиферации клеток, что подтверждается данными о сниженном пролиферативном ответе лимфоцитов у спонтанно гипертензивных крыс [23]. Кроме того, отмечена укороченная длина теломер лейкоцитов у гипертензивных пациентов с генотипами DD или ID [24], при этом укорочение теломер ассоциируется с клеточным старением и пролиферативным арестом [25].

Важно отметить, что увеличение доли микроядер, наблюдаемое у гипертензивных пациентов, обусловлено увеличением их формирования только у одной генетической группы – носителей генотипа II, который считается благоприятным в отношении АД и протективным по отношению к риску развития осложнений. У гипертензивных носителей генотипа II уровень микроядер по сравнению с нормотензивными донорами увеличен в три раза, тогда как среди пациентов с другими генотипами гена АПФ

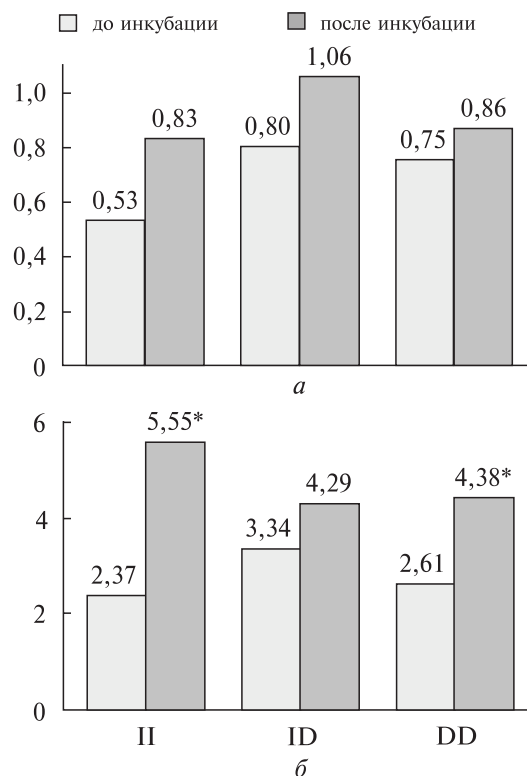


Рис. 3. Медианные значения данных проточной цитометрии, полученных до и после инкубации образцов крови нормотензивных пациентов при температуре 4 °С в течение 24 ч ($n = 64$): по вертикали – уровень микроядер, % (а) и уровень клеточной гибели, % (б); по горизонтали – генотипы. * Достоверность различий в сравнении с образцами, не подвергавшимися инкубации, $p < 0,05$, критерий попарных сравнений Уилкоксона

доля микроядер не изменились. Так как у носителей генотипа II отмечен и наиболее высокий рост клеточной гибели, можно предположить, что микроядра имеют апоптотическую природу, однако они также могут представлять собой отдельные целые хромосомы или хромосомные поломки, отделенные от ядер делящихся клеток во время анафазы [20]. Хотя базовый уровень хромосомных aberrаций выше у крыс линии SHR, уровень повреждений хромосом, индуцированный антиаритмическим лекарственным средством амиодароном, был выше у нормотензивных крыс WKY, что указывает на более слабый клеточный ответ на повреждения ДНК при генетической предрасположенности к высокому АД [9].

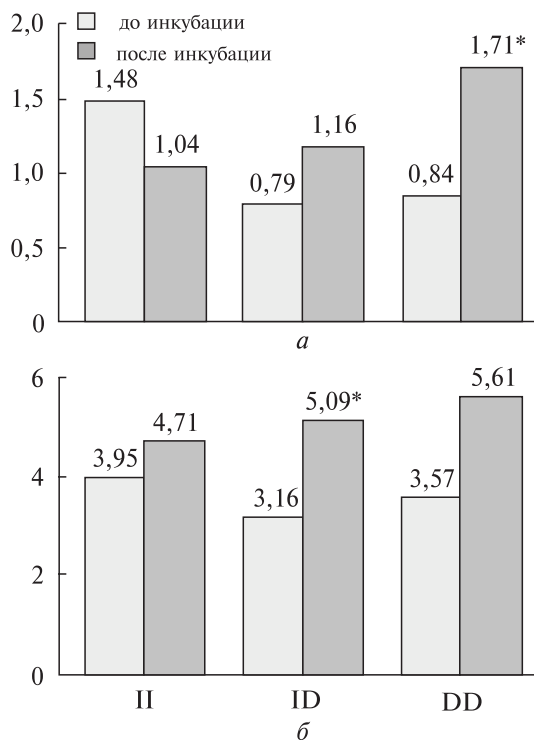


Рис. 4. Медианные значения данных проточной цитометрии, полученных до и после инкубации образцов крови пациентов с АГ при температуре 4 °С в течение 24 ч ($n = 170$): по вертикали – уровень микроядер (*a*) и уровень клеточной гибели, % (*б*); по горизонтали – генотипы. * Достоверность различий в сравнении с образцами, не подвергавшимися инкубации, $p < 0,05$, критерий попарных сравнений Уилкоксона

С целью верификации более интенсивного клеточного ответа среди лейкоцитов с генотипом II к повреждениям ДНК мы инкубировали образцы цельной крови при 4 °С на протяжении 24 ч. Как предполагалось, у нормотензивных доноров наиболее интенсивная клеточная гибель и формирование микроядер отмечены вновь среди клеток с генотипом II. У носителей генотипа ID наблюдали значительное снижение доли клеток в фазе G1/G0 и увеличение их в фазе G2/M, сопровождаемое наиболее низким уровнем гибели клеток, что может свидетельствовать о временном клеточном аресте, но не апоптозе, в качестве предпочтительного типа контроля распространения клеток с повреждениями ДНК у носителей такого генотипа. Поскольку ги-

бель клеток служит механизмом, способным предотвращать нестабильность генома путем удаления клеток с поврежденной ДНК, можно рассматривать данный клеточный ответ в качестве положительной реакции в условиях инкубации и АГ. Напротив, арест клеток с нерепарированными повреждениями ДНК ведет к накоплению сенесцентных клеток, что способствует снижению замещения нефункционирующих клеток и истощению потенциала обновления тканей, повышению воспаления и формирования микросреды, благоприятной для опухолевого роста [26].

Несмотря на то, что мы ожидали отметить наибольшее увеличение частоты микроядер и гибели клеток в образцах больных АГ с генотипом II на фоне пролонгированной инкубации, у таких пациентов было зарегистрировано снижение уровня микроядер, вероятный переход таких клеток в пул апоптотических клеток и слабое формирование новых микроядер. Напротив, клетки же с генотипом DD показали значительно увеличенную частоту микроядер и высокую клеточную гибель.

Наблюдаемые различия в реакции клеток, несущих различные генотипы, на повреждающие ДНК факторы можно объяснить соотношением функционально специализированных подмножеств клеток с измененным фенотипом, обуславливающим тенденцию к гибели клеток. Известно, что ген АПФ участвует в воспалительных процессах, так как АТ-II вызывает активацию Т-клеток и выход активированных клеток в кровотоки [27], увеличение матричной РНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6 и снижение противовоспалительного цитокина IL-10 [28]. Пациенты с аллелем D гена АПФ по причине повышенного уровня АТ-II могут иметь больше активированных лейкоцитов с измененным фенотипом и конститутивной устойчивостью клеток к гибели.

Сдвиг в балансе между субгруппами лейкоцитов в сторону незрелых клеток может также объяснять наблюдаемые различия в реакции клеток между носителями различных генотипов в группе больных АГ. При физиологических изменениях, характерных для больных, например, при хроническом воспалении и повреждениях ДНК активными формами кислорода,

которые бывают особенно высокими у носителей генотипа DD, может создаваться постоянная потребность в определенных субпопуляциях лейкоцитов и их возмещении в циркуляции. Постоянная работа по восполнению соматических клеток может привести к истощению клеток-предшественников. В то время как такое истощение может быть больше у носителей генотипа DD, носители генотипа II могут иметь больше незрелых клеток, высвобождаемых в кровотоки, которые в большей степени склонны к пролиферации и восприимчивы к апоптозу [29]. Высвобождаемые незрелые клетки могут быть мишенью при индукции гибели клеток *in vivo*, что мы наблюдали у носителей генотипа II путем регистрации повышенной клеточной гибели и микроядер. Несмотря на то что незрелые субпопуляции клеток сами по себе небольшие, может произойти их сокращение при ежедневном воздействии лекарственных препаратов или активных форм кислорода у гипертензивных больных, что приведет к увеличению доли зрелых клеток со стабильной более низкой чувствительностью к апоптотическим агентам.

Укороченная длина теломер у больных АГ с генотипом DD указывает на возможность клеточного старения и изменений в скорости апоптоза. То же в определенной степени может быть справедливо и в отношении индивидуумов контрольной группы, так как в исследовании, проведенном Fyhrgquist et al. [24], не изучали нормотензивных пациентов. Таким образом, сниженный ответ клеток с генотипом DD в повреждающих условиях можно объяснить изменениями пролиферативного характера среди клеток-предшественников, снижении способности замены поврежденных клеток и негативной регуляции запрограммированной клеточной гибели.

В целом, имеется немного исследований по изучению полиморфизма I/D гена АПФ и его связи с повреждениями ДНК. Miranda-Vilela et al. [30] не обнаружили статистически значимых различий в повреждениях ДНК между носителями различных генотипов гена АПФ после воздействия перекисью водорода на лейкоциты периферической крови здоровых людей. Однако участники исследования имели широкий воз-

растной диапазон (от 17 до 56 лет) и в исследовании включали мужчин и женщин, что могло повлиять на результаты.

Относительно применения полученных данных связь полиморфизма I/D гена АПФ с накоплением микроядер может иметь важное значение для определения групп повышенного риска таргетных повреждений органов и развития рака у пациентов с АГ. Клетки с микроядрами ассоциируются с повреждениями ДНК, склонны к гибели, остановке клеточного цикла и к возможности производить дочерние клетки с большим количеством микроядер [31]. Подразумевая, что клеточный ответ лейкоцитов периферической крови отражает потенциальный ответ клеток других органов и тканей, клетки с микроядрами могут способствовать иницированию и развитию дисфункции эндотелия, гипертрофии миокарда, повреждению почек и головного мозга [4] посредством нарушения функции клеток и снижения регенеративных способностей тканей. Кроме того, частота микроядер в лимфоцитах периферической крови является предиктором увеличенного риска развития рака [32]; определение групп риска позволит разработать применение ранних эффективных превентивных стратегий. Однако необходимы дальнейшие исследования для определения природы микроядер, так как показано, что анеугенные микроядра оказывают слабое отрицательное влияние на выживаемость и пролиферацию несущей их клетки, апоптотические микроядра могут быть результатом нормального клеточного ответа на ДНК повреждающие агенты, однако микроядра кластогенной природы оказывают наиболее губительное воздействие на судьбу клетки [33]. Следует изучить больных АГ с генотипом II, имеющих наиболее высокий процент микроядер, а также формирование микроядер в группе больных с генотипом DD, для клеток которых отмечали накопление микроядер в условиях ДНК повреждающих факторов. Полученные данные могут осветить новые аспекты патофизиологии АГ касательно гетерогенности лейкоцитов и истощения их субпопуляций, пролиферативного потенциала клеток предшественников и накопления повреждений ДНК, что предоставит дополнительную прогностическую информа-

цию для пациентов. Следовательно, может быть разработано персонализированное лечение больных АГ с целью уменьшения побочных эффектов в виде повреждений ДНК на фоне действия антигипертензивных лекарственных средств, основанное на индивидуальной восприимчивости, и/или введено применение препаратов с протективным для генома эффектом.

Данные о дифференциальной чувствительности субпопуляций лейкоцитов, ограниченном клеточном ответе к гибели и склонности к накоплению клеток с повреждениями ДНК могут быть использованы в анализе токсичности лекарственных препаратов *in vitro* и клинических испытаниях. Анализ цитотоксичности во всей популяции лейкоцитов или в исследуемой группе без индивидуализированного подхода может не обнаружить существенных изменений в клеточной реакции в результате применения препарата. Кроме того, полиморфизм I/D может представлять собой важный компонент индивидуальной чувствительности к мутагенам окружающей среды и канцерогенам, при этом у здоровых индивидуумов генотип II предположительно имеет протективный эффект по отношению к накоплению поврежденных ДНК, клетки которых в повреждающих условиях подвергаются гибели.

Таким образом, полученные данные указывают на связь полиморфизма I/D гена АПФ с гибелью клеток, формированием микроядер и распределением клеток по фазам клеточного цикла у больных АГ и нормотензивных индивидуумов. Впервые отмечено повышение уровня микроядер в лейкоцитах больных АГ с генотипом II, но при этом не у носителей генотипов ID и DD, что предполагает роль полиморфизма I/D гена АПФ в увеличенном уровне повреждений ДНК при АГ. Клеточный ответ лейкоцитов в условиях инкубации различался в зависимости от генотипа, однако при этом отличался между пациентами контрольной группы и больными АГ. Клетки с генотипом II имели наиболее высокую долю микроядер и гибели клеток, индуцированных инкубацией у здоровых пациентов, в то время как у больных АГ – носителей генотипа DD – проходило наиболее активное формирование микроядер. Это свидетельствует о том, что полиморфизм I/D гена АПФ может быть одним

из определяющих факторов в клеточном ответе в условиях повреждений ДНК, а это может иметь важное значение в клинической практике. Различия в клеточном ответе на повреждающие ДНК агенты между здоровыми донорами и больными АГ пациентами могут указывать на возможные нарушения, связанные с пролиферативным дефицитом клеток-предшественников, и/или субпопуляционные различия. Дальнейшие исследования необходимы для изучения основных механизмов и биологической значимости связи полиморфизма I/D гена АПФ с гибелью клеток и накоплением повреждений ДНК у здоровых и больных АГ.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № М14М – 060).

ASSOCIATION OF THE ACE I/D GENE POLYMORPHISM WITH DNA DAMAGE IN HYPERTENSIVE MEN

O.O. Pavlyushchik, V.Yu. Afonin, V.N. Sarokina, T.A. Chak, A.V. Khapaliuk, M.V. Anisovich

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus,
E-mail: e.pavlushchik@yandex.by
Belarusian State Medical University, Minsk

The aim of the study was to evaluate the association between the angiotensin-converting enzyme ACE I/D (rs4340) polymorphism and DNA damage in patients with essential hypertension (EH). The I/D polymorphism of ACE was determined by polymerase chain reaction in 170 male hypertensive patients and 64 normotensive blood donors. We used flow cytometry to determine the levels of cell death, micronuclei and accumulation of peripheral blood leukocytes in G1/G0, S, G2/M phases of the cell cycle. Additionally, the whole blood samples were incubated *in vitro* at 4 °C for 24 h to investigate the genotype effects on the susceptibility of cells to DNA damage. We found lower frequency of cells in DNA synthesis S phase and higher levels of micronuclei in the hypertensive compared to normotensive group ($p < 0.05$); increased formation of micronuclei was seen due to elevated micronuclei frequencies in patients with the ACE II genotype ($p < 0.05$), but not in ID or DD genotype carriers. Incubation of whole blood samples of normotensive individuals lead to the most active cell death ($p < 0.05$) and micronuclei formation ($p > 0.05$) in the II genotype carriers too. However, hypertensive patients displayed different cellular response to incubation-induced DNA

damages in the ACE I/D genotype groups; after incubation, the frequencies of micronuclei were significantly higher in the DD genotype carriers ($p < 0.05$). To conclude, the study suggests that the ACE I/D polymorphism may contribute to mechanisms and intensity of DNA damages in hypertensive and normotensive individuals.

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМА I/D ГЕНА АНГІОТЕНЗИН-ПЕРЕТВОРЮЮЧОГО ФЕРМЕНТА (АПФ) З ПОШКОДЖЕННЯМИ ДНК У ЧОЛОВІКІВ, ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ

О.О. Павлющук, В.Ю. Афонін, В.М. Сорокіна, Т.А. Чак, О.В. Хапалюк, М.В. Анісович

Метою даної роботи було оцінити зв'язок між АПФ I/D (rs4340) поліморфізмом і рівнем пошкоджень ДНК у хворих на артеріальну гіпертензію (АГ). Досліджувана популяція складалася з 170 пацієнтів чоловічої статі з діагнозом АГ і 64 донорів без захворювання. Методом проточної цитометрії визначали рівень клітинної загибелі, клітин з мікроядрами і розподіл лейкоцитів периферичної крові за фазами G1/G0, S, G2/M клітинного циклу. Додатково цільну кров інкубували *in vitro* при 4 °C протягом 24 год для стимулювання пошкоджень ДНК і загибелі клітин. Знижену частоту лейкоцитів в синтетичній S фазі клітинного циклу і збільшений рівень мікроядер мають пацієнти з АГ в порівнянні з обстеженими групи контролю ($p < 0,05$). При цьому достовірне підвищення мікроядер зазначалося у пацієнтів з генотипом II ($p < 0,05$), але не у носіїв генотипів ID і DD. В умовах інкубації крові *in vitro* у здорових чоловіків з генотипом II зазначена найбільш активна загибель клітин ($p < 0,05$) і формування мікроядер ($p > 0,05$). У пацієнтів з АГ найбільш високе зростання мікроядер після інкубації показано серед носіїв генотипу DD ($p < 0,05$). Отримані дані свідчать про те, що поліморфізм АПФ I/D є важливим визначальним чинником у процесах клітинної загибелі і пошкоджень ДНК у здорових чоловіків і хворих АГ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Thukral, K., and Gandhi, G., Genomic instability and lipid peroxidation in patients with treated essential hypertension, *Int. J. Life Sci. Pharm. Res.*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. L67–L75.
2. Federici, C., Drake, K.M., Rigelsky, C.M., McNelly, L.N., Meade, S.L., Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C., and Aldred, M.A., Increased mutagen sensitivity and DNA damage in pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, vol. 192, no. 2, pp. 219–228.

3. Gür, M., Elbasan, Z., Şahin, D.Y., Koyunsever, N.Y., Seker, T., Ozaltun, B., Caylı, M., and Kocyigit, A., DNA damage and oxidative status in newly diagnosed, untreated, dipper and non-dipper hypertensive patients, *Hypertens. Res.*, 2013, vol. 36, no. 2, pp. 166–171.
4. Yıldız, A., Gur, M., Yilmaz, R., Demirbağ, R., Celik, H., Aslan, M., and Koçyiğit, A., Lymphocyte DNA damage and total antioxidant status in patients with white-coat hypertension and sustained hypertension, *Arch. Turk. Soc. Kardiyo.*, 2008, vol. 36, no. 4, pp. 231–238.
5. Stocks, T., van Hemelrijck, M., Manjer, J., Bjørge, T., Ulmer, H., Hallmans, G., Lindkvist, B., Selmer, R., Nagel, G., Tretli, S., Concin, H., Engeland, A., Jonsson, H., and Stattin, P., Blood pressure and risk of cancer incidence and mortality in the Metabolic Syndrome and Cancer Project, *Hypertension*, 2012, vol. 59, no. 4, pp. 802–810.
6. Surova, O., and Zhivotovsky, B., Various modes of cell death induced by DNA damage, *Oncogene*, 2013, vol. 32, no. 33, pp. 3789–3797.
7. Rubattu, S., Pagliaro, B., Pierelli, G., Santolamazza, C., Castro, S.D., Mennuni, S., and Volpe, M., Pathogenesis of target organ damage in hypertension: role of mitochondrial oxidative stress, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 823–839.
8. Brambilla, G., and Martelli, A., Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents, *Mutat. Res.*, 2006, vol. 612, no. 2, pp. 115–149.
9. Almeida, M.R., de Oliveira, L.E., da Silva, V.J., Campos, M.G., Antunes, L.M., Salman, A.K., and Dias, F.L., Genotoxic studies in hypertensive and normotensive rats treated with amiodarone, *Mutat. Res.*, 2008, vol. 657, no. 2, pp. 155–159.
10. Gesang, L., Liu, G., Cen, W., Qiu, C., Zhuoma, C., Zhuang, L., Ren, D., Pincuo, Z., and Chan, Y., Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and its association with essential hypertension in a Tibetan population, *Hypertens Res.*, 2002, vol. 25, no. 3, pp. 481–485.
11. Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., and Soubrier, F., An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels, *J. Clin. Invest.*, 1990, vol. 86, no. 4, pp. 1343–1346.
12. Welch, W.J., Angiotensin II dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction, *Hypertension*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 51–56.
13. Münzel, T., and Keaney, J.F.Jr., Are ACE inhibitors a «magic bullet» against oxidative stress? *Circulation*, 2001, vol. 104, no. 13, pp. 1571–1574.
14. Chalmers, J., MacMahon, S., Mancia, G., Whitworth, J., Beilin, L., Hansson, L., Neal, B., Rodgers, A., Ni Mhurchu, C., and Clark, T., World

- Health Organization – International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization, *Clin. Exp. Hypertens.*, 1999, vol. 21, no. 5–6, pp. 1009–1060.
15. Beerman, I., Seita, J., Inlay, M.A., Weissman, I.L., and Rossi, D.J., Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle, *Cell Stem Cell*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 37–50.
 16. Biino, G., Parati, G., Concas, M.P., Adamo, M., Angius, A., Vaccargiu, S., and Pirastu, M., Environmental and genetic contribution to hypertension prevalence: data from an epidemiological survey on Sardinian genetic isolates, *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 3, e59612.
 17. Orłowska-Baranowska, E., Placha, G., Gaciong, Z., Baranowski, R., Zakrzewski, D., Michalek, P., Hofman, P., and Rawczynska-Englert, I., Influence of ACE I/D genotypes on left ventricular hypertrophy in aortic stenosis: gender-related differences, *J. Heart Valve Dis.*, 2004, vol. 13, no. 4, pp. 574–581.
 18. Zhang, M., Wei, J., Shan, H., Yan, R., Lin, L., and Zhu, Y.H., Effects of p66shc adapter protein and estrogen on cardiomyocyte apoptosis induced by angiotensin II, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2014, vol. 45, no. 2, pp. 202–206.
 19. Rigat, B., Hubert, C., Corvo, P., and Soubrier, F., PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1), *Nucl. Acids Res.*, 1992, vol. 20, no. 6, p. 1433.
 20. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., and Thomas, P., Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, no. 1, pp. 125–132.
 21. Narayanan, S., O'Donovan, M.R., Duthie, S.J., Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes, *Mutagenesis*, 2001, vol. 16, no. 6, pp. 455–459.
 22. Gupta, S., Agrawal, B., Goel, R., and Sehajpal, P., Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive rural population of Haryana, India, *J. Emerg. Trauma Shock*, 2009, vol. 2, no. 3, pp. 150–154.
 23. Xiao, J., and Pang, P.K., Hypertension is not related to suppressed lymphocyte proliferation but to elevated NO synthesis in vascular smooth muscle cells of borderline hypertensive rat, *Blood Press*, 1995, vol. 4, no. 4, pp. 249–256.
 24. Fyhrquist, F., Eriksson, A., Saijonmaa, O., Nordestgaard, B.G., Kontula, K., de Faire, U., Ibsen, H., Kjeldsen, S., Os, I., and Dahlöf, B., Telomere length is associated with ACE I/D polymorphism in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy, *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 227–234.
 25. Hayflick, L., and Moorhead, P.S., The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, 1961, vol. 25, pp. 585–621.
 26. Chen, J.H., Nicholes, C.H., and Ozanne, S.E., DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucl. Acids Res.*, 2007, vol. 35, no. 22, pp. 7417–7428.
 27. Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., and Harrison, D.G., Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction, *J. Exp. Med.*, 2007, vol. 204, no. 10, pp. 2449–2460.
 28. Shi, P., Diez-Freire, C., Jun, J.Y., Qi, Y., Katovich, M.J., Li, Q., Sriramula, S., Francis, J., Summers, C., and Raizada, M.K., Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension, *Hypertension*, 2010, vol. 56, no. 2, pp. 297–303.
 29. Troyano, A., Sancho, P., Fernández, C., de Blas, E., Bernardi, P., and Aller, P., The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells, *Cell Death Differ.*, 2003, vol. 10, no. 8, pp. 889–898.
 30. Miranda-Vilela, A.L., Alves, P.C., Akimoto, A.K., Lordelo, G.S., Gonçalves, C.A., Grisolia, C.K., and Klautau-Guimarães, M.N., Gene polymorphisms against DNA damage induced by hydrogen peroxide in leukocytes of healthy humans through comet assay: a quasi-experimental study, *Environ. Health*, 2010, vol. 9, pp. 9–21.
 31. Huang, Y., Hou, H., Yi, Q., Zhang, Y., Chen, D., Jiang, E., Xia, Y., Fenech, M., and Shi, Q., The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging, *DNA Repair (Amst)*, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 629–638.
 32. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., and Fenech, M., Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies, *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, no. 1, pp. 93–100.
 33. Huang, Y., Jiang, L., Yi, Q., Lv, L., Wang, Z., Zhao, X., Zhong, L., Jiang, H., Rasool, S., Hao, Q., Guo, Z., Cooke, H.J., Fenech, M., and Shi, Q., Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not 'lost' by cells, *Cell Res.*, 2012, vol. 22, no. 5, pp. 932–935.

Поступила 27.04.15