

УДК 557.175.852:616.12-008.331:616.12-005.4

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА У ЛЮДЕЙ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ И ХРОНИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ ИБС

Котловский М.Ю., Котловская О.С., Оседко О.Я., Кириченко Д.С., Покровский А.А.,
Оседко А.В., Говорун В.М., Котловский Ю.В.

ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет»,

Красноярск, e-mail: csrl@mail.ru;

НПО «Литех», Москва

В исследовании проведен анализ молекулярно-генетических аспектов патогенеза гипертонической болезни через изучение генов, кодирующих белки, участвующие в процессах регуляции сосудистого тонуса, таких как ген ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ). Целью исследования являлись выяснение взаимосвязи гипертонической болезни и полиморфизма гена АСЕ и факторов, ее определяющих в выбранной популяции. Установлена сопряженность наличия D аллеля с диагнозом гипертонической болезни и абдоминальным ожирением. В исследуемой группе показана связь полиморфизма гена АСЕ с активацией свертывающей активности крови, увеличением систолического АД и повышением концентрации аминотрансфераз в крови. Исходя из полученных данных можно предположить, что генетические механизмы гипертонии в группе больных хронической формой ИБС в возрасте 45–64 года реализуются через D аллель, программирующий ожирение, повышение систолического давления, активацию свертывания крови, вызывая патологию органов и систем организма.

Ключевые слова: гипертония, ангиотензин-превращающий фермент, полиморфизм, ишемическая болезнь сердца, абдоминальное ожирение

POLYMORPHISM OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME IN PATIENTS WITH HYPERTENSION AND CHRONIC FORM OF ISCHEMIC HEART DISEASE

Kotlovskiy M.U., Kotlovskaya O.S., Osedko O.Y., Kirichenko D.A., Pokrovskiy A.A.,
Osedko A.V., Govorun V.M., Kotlovskiy U.V.

Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, e-mail: csrl@mail.ru;

SIO «Litekh», Moscow

The Krasnoyarsk Study recently revealed that the deletion polymorphism of the angiotensin converting Enzyme gene (ACE DD) is associated with hypertension. We examined hypertensive patients with ischemic heart. The frequency of DD in hypertensive patients with ischemic heart disease and abdominal obesity was significantly higher than that in other, without abdominal obesity. We were observed increase the aminotransferase and fibrin monomeric complexes at patients with DD genotype. And fibrillation time was lower.

Keywords: hypertension, angiotensin converting enzyme, polymorphism, ischemic heart disease, abdominal obesity

О важности генетической составляющей патогенеза заболевания свидетельствует множество исследований [1-7] и по разным оценкам АГ генетически предопределена в 20–40% случаев. Полиморфизмы генов, связанных с АГ, широко представлены в популяциях, а аллели, ассоциированные с мультифакториальными болезнями, встречаются с частотой более 10% среди здоровой части популяции. Исследователи отмечают полигенность заболевания и «неподчинение» его наследования классическим менделеевским законам наследования, так как в патогенезе лежит целый ряд генов, что объясняет противоречивость литературных данных в этой области [1, 3, 5]. Для изучения молекулярно-генетических аспектов патогенеза гипертонической болезни представляет интерес изучение генов, кодирующих белки, участвующие в процессах регуляции сосудистого тонуса, таких как ген ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ). В гене АСЕ был выяв-

лен полиморфизм, связанный с инсерцией (I) или делецией (D) Alu повтора размером 287 п.н. в интроне 16 гена АСЕ [4]. Уровень ангиотензин-превращающего фермента в крови, лимфе и тканях коррелирует с наличием D аллеля. Концентрация АСЕ в сыворотке у здоровых людей гомозиготных по D аллелю почти в два раза выше, чем у гомозиготных по I аллели и имеет среднее значение у гетерозиготных – ID генотип. Полиморфизм АСЕ считают фактором риска возникновения инфаркта миокарда, спазма коронарных сосудов, гипертрофии левого желудочка, а также высоким риском развития атеросклероза, эссенциальной гипертонии и ишемической болезни сердца. С другой стороны, также есть данные об отсутствии ассоциации полиморфизма АСЕ с гипертонией. Позднее этим же автором было установлено, что связь отсутствует в группах с более легкой степенью гипертонии, а у лиц со злокачественной формой DD генотип встречается в 3 раза чаще. Ре-

зультаты первичных исследований были впоследствии поставлены под сомнение в более масштабных исследованиях и с использованием рандомизированных и упорядоченных групп. Как правило, многие не учитывают популяционные и этнические особенности клинического материала. При мультифакториальных заболеваниях генетическая система полигенов представлена огромным полиморфизмом аллелей генов, эффекты которых в отдельности могут быть не столь значительны или проявляться в определенных обстоятельствах. А этническое разнообразие и высокая миграция лиц с различными формами артериальной гипертензии не позволяет привести результаты к общему знаменателю. Поэтому выбор методов выявления связи полиморфизмов с гипертензией, особенности исследуемых групп, а также влияние скрытых причин, определяющих уровни АД и постановку диагноза гипертензии могут, быть решающими в выводах исследования.

Целью исследования являлись выяснение взаимосвязи гипертонической болезни и I/D полиморфизма гена ACE и факторы, ее определяющие в выбранной популяции.

Материалы и методы исследования

Исследуемая группа включала 102 относительно здоровых пациента, а также болеющих хронической формой ИБС, имеющих и не имеющих диагноз гипертензии, находящихся на амбулаторном лечении конкором. Группы обследуемых находились в возрастном интервале от 45 до 64 лет. Материалом для исследования полиморфизмов служили образцы ДНК, которые были получены методом фенольно-хлороформной экстракции из 10 мл цельной венозной крови. Анализ однонуклеотидных полиморфизмов генов (SNP) проводили методом минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим фракционированием олигонуклеотидных зондов при помощи MALDI-TOF

масс-спектрометрии. Работа проводилась совместно с НПФ «Литех», г. Москва. Для выявления сопряжения между полиморфизмами ACE, наличием диагноза гипертензии и уровнями АД нами применялись методы: сопряжения, корреляции, частотного анализа и другие методы оценки параметрических и непараметрических показателей статистики в SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку рисков, частот генотипов, аллелей и доверительных интервалов проводили с использованием Microsoft Excel. Различия в частотах аллелей и генотипов между группами оценивали с помощью критерия χ^2 и расчета отношения рисков (OR) с доверительными интервалами (CI). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Отличий по возрасту между обследуемыми группами без гипертензии ($54,00 \pm 1,02$ года) и с гипертензией ($54,48 \pm 0,64$ года) не было ($p = 0,680$; t -критерий Стьюдента). Отличий по полу между группами без и с гипертензией в возрастном интервале 45–64 года также не обнаружено (Критерий Манна–Уитни, $p = 0,118$). Не отмечалось различий по генотипам ACE между группами здоровых и больных стенокардией по критерию Манна–Уитни ($p = 0,785$).

Распределение частот генотипов и аллелей соответствовало уравнению Харди Вайнберга (РХВ). Отсутствие отличий в распределении генотипов ACE в группах здоровых и больных хронической формой ИБС ($p = 0,780$), а также отсутствие сопряжения между генотипами ACE в тех же группах (χ^2 Пирсона $p = 0,147$; отношение правдоподобия $p = 0,055$), позволяло определять частоты генотипов в смешанных группах здоровых и больных ИБС. Отмечается тенденция снижения частоты первого аллеля I и увеличения частоты второго аллеля D при гипертензии (табл. 1).

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей ACE среди здоровых и больных хронической формой ИБС, имеющих и не имеющих гипертоническую болезнь в возрасте 45–64 года

Группа	Частота генотипа (II)	Частота генотипа (DI)	Частота генотипа (DD)	Частота аллеля (I)	Частота аллеля (D)
Без гипертензии	0,032	0,742	0,226	0,403	0,597
С гипертензией	0,133	0,483	0,383	0,375	0,625

П р и м е ч а н и е. Инсерционно-делеционный полиморфизм в интроне 16 гена ACE был определен в исследовании на 95 пациентах.

Полученные результаты показывают сопряженность по коэффициенту χ^2 Пирсона ($p = 0,049$) и коэффициенту правдоподобия ($p = 0,039$) между генотипами ACE и диагнозом гипертензия. В указанной возрастной группе распределение генотипов ACE оказалось достоверно сопряжено с диагнозом гипертонической болезни. Однако не

отмечалось сопряжения между полиморфизмами ACE и повышенным систолическим артериальным давлением по χ^2 Пирсона ($p = 0,113$), что являлось следствием нормализации АД под влиянием конкора у 47,6% гипертоников. Не было сопряженности полиморфизмов генотипов ACE – и с диастолическим АД ($p = 0,239$), что явля-

лось следствием нормализации диастолического давления у 39,7% гипертоников под действием конкора. Такое процентное соотношение может быть связано с меньшей эффективностью конкора в нормализации диастолического давления нежели систолического. По данным же литературы, связь D аллеля ACE с повышением диастолического давления была установлена в Фрименгамском исследовании достаточно большой популяции, однако, присутствовала только у мужчин. У женщин же такой закономерности не наблюдалось. В нашем исследовании, диастолическое давление было сопряжено с диагнозом гипертонии у 60,3% гипертоников по χ^2 Пирсона ($p = 0,011$), критерию на непрерывность ($p = 0,021$); отношению правдоподобия ($p = 0,011$) и критерию Фишера ($p = 0,014$). Связь была линейной ($p = 0,012$), симметричной, средней силы ($\gamma = 0,526$; $p = 0,009$). Нормальным систолическим АД считалось давление до 139 мм рт. ст., а нормальным диастолическим АД – давление до 89 мм рт. ст. в соот-

ветствии с рекомендациями Европейского общества артериальной гипертензии и Европейского общества кардиологов от 2003 г.

Отмечалось сопряжение полиморфизмов ACE с наличием абдоминального ожирения (табл. 2) определяемого по χ^2 Пирсона ($p = 0,030$), отношению правдоподобия ($p = 0,024$). Связь была линейной ($p = 0,010$), симметричной, средней силы ($\gamma = 0,53$; $p = 0,004$). Здесь, также как и при гипертонии, присутствовала тенденция снижения аллеля дикого типа I и увеличения аллеля D при наличии абдоминального ожирения (АО).

Кроме того, и количественные уровни частот аллелей были близкими (см. табл. 1 и 2). Наблюдалась четкая тенденция снижения гетерозиготного генотипа DI ACE в группе пациентов с АО с явным увеличением частоты гомозиготного DD генотипа ACE. D аллель преобладал в распределении частот в группе с АО (OR = 1,935; 95% CI 1,035–3,617; $p = 0,038$). По тренд тесту общий риск OR = 2,423 при $p = 0,015$.

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей ACE среди здоровых пациентов и больных хронической формой ИБС, имеющих и не имеющих гипертоническую болезнь, в возрасте 45–64 года

Группа	Частота генотипа (II)	Частота генотипа (DI)	Частота генотипа (DD)	Частота аллеля (I)	Частота аллеля (D)
Отсутствие АО	0,118	0,706	0,176	0,471	0,529
Наличие АО	0,056	0,519	0,426	0,315	0,685

Полученные результаты показывают сопряженность аллеля D с наличием абдоминального ожирения. В группах с гипертонией отмечается достоверное увеличение случаев абдоминального ожирения ($p = 0,002$ по Манна–Уитни). Подтверждением является наличие сопряжение абдоминального ожирения с гипертонией (χ^2 квадрата Пирсона $p = 0,001$; $p = 0,003$ поправка на непрерывность; $p = 0,002$ по отношению правдоподобия; $p = 0,002$ для критерия Фишера). Связь между абдоминальным ожирением и диагнозом гипертонии была линейной ($p = 0,002$), симметричной и средней силы ($\gamma = 0,624$; $p = 0,002$).

Исходя из полученных нами данных, можно судить о единой генетической составляющей в реализации гипертонической болезни и абдоминального ожирения.

Выявление влияния аллеля D, проведенное с помощью группирующих переменных DI и DD позволило получить дополнительные данные о его значении для функциональной активности органов и систем организма (табл. 3). В дополнение к показателям артериального давления смотрели показатели протромбинового индекса (ПТИ) и ак-

тивность аланинаминотрансферазы (АЛТ). Все переменные (АД систолическое, ПТИ и АЛТ) были количественными, поэтому при статистической обработке ранги отображали уровень изучаемых признаков. Переменная ФМК (фибрин-мономерные комплексы), хотя и была номинальной, но так как норма и патология обозначались цифрами 1 (норма – меньше 20,2 мкг/мл) и 2 (патология – больше 20,2 мкг/мл), следовательно, наличие патологии для ФМК связано с большим значением ранга (табл. 3). При наличии DD мутированной гомозиготы ACE степень абдоминального ожирения ($p = 0,026$) и уровень АД систолического ($p = 0,019$) выше, а протромбиновый индекс ниже ($p = 0,033$), чем при гетерозиготном генотипе. Концентрация ФМК ($p = 0,039$) и уровень активности АЛТ ($p = 0,033$) выше при (DD) генотипе.

Снижение показателя протромбинового индекса свидетельствует об ускорении образования сгустка у пациентов с DD генотипом. Подтверждением является увеличение ФМК, свидетельствующее о возрастании в плазме комплексов фибрин-мономеров с продуктами деградации фибриногена. Это свидетельствует об активации свертывания

крови, что согласуется с литературными данными о повышенном уровне фибриногена в крови больных гипертонией и АО, в том числе и об активации гемостатических функций в целом. В этом случае повышенный уровень ангиотензина II, обусловленный реализацией мутантного гомозиготного

генотипа в виде увеличения концентрации АПФ в крови, должен индуцировать продукцию и секрецию адгезивных молекул, стимулировать образование свободных радикалов, что ведет к активации функции тромбоцитов, в том числе вследствие подавления активности оксида азота.

Таблица 3

Функциональная активность органов и систем организма здоровых и больных хронической формой ИБС, имеющих и не имеющих гипертоническую болезнь в возрасте от 45 до 64 лет в зависимости от генотипов DI и DD гена ACE

Тип генотипа	Абдоминальное ожирение (M ± m)	АД систол. (ранги)	ПТИ (ранги)	ФМК (ранги)	АЛТ (ранги)
(DI)	0,882 ± 0,013	36,82	34,42	27,33	37,25
(DD)	0,952 ± 0,027*	49,62*	24,63*	35,25*	48,87*

Заключение

Таким образом, полученные результаты показывают сопряженность аллеля D с наличием абдоминального ожирения. D аллель преобладал в распределении частот в группе с АО (ОР = 1,935; 95% CI 1,035-3,617; $p = 0,038$). По тренд тесту общий риск ОР = 2,423 при $p = 0,015$. Установлена также сопряженность наличия D аллеля с диагнозом гипертонической болезни. В исследуемой группе показана связь полиморфизма гена ACE с активацией свертывающей активности крови и повышением концентрации аминотрансфераз в крови. Исходя из полученных данных, можно предположить, что генетические механизмы гипертонии в группе больных хронической формой ИБС в возрасте 45–64 года реализуются через D аллель, программирующий ожирение, повышение давления, активацию свертывания крови, вызывая патологию органов и систем организма.

Список литературы

1. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk / J.A. Staessen, J.G. Wang, G. Ginocchio, V. Petrov, A.P. Saavedra, F. Soubrier, R. Vlietinck, R. Fagard // *Hypertens.* – 1997 Dec. – №15(12 Pt 2). – P. 1579–92.
2. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen / X. Jeunemaitre, F. Soubrier, Y.V. Kotelevtsev, et al. // *Cell.* . – 1992 Oct 2. – №71(1). – P. 169–80.

3. Lifton R.P. Genetic determinants of human hypertension // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 8545–8551.

4. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1) / B. Rigat, C. Hubert, P. Corvol, F. Soubrier // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – Vol. 20. – P. 1433.

5. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM / T. Fujisawa, H. Ikegami, G.Q. Shen et al. // *Diabetes Care.* – 1995. – Vol. 18. – P. 983–985.

6. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension / H. Higara, T. Oshima, M. Watanabe et al. // *Hypertension.* – 1996. – Vol. 27. – P. 569–572.

7. Morris B.J., Zee R.Y.L., Schrader A.P. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals // *J. Clin. Invest.* – 1994. – Vol. 94. – P. 1085–1089.

Рецензенты:

Самотесов П.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии ИПО ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора Войно-Ясенецкого» Минздравсоцразвития РФ, г. Красноярск;

Жестовская С.И., д.м.н., профессор, зав. отделением ультразвуковой диагностики краевой клинической больницы №1, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 26.08.2011.