

УДК 612.6.05:616.12-008.331.1-053.2

В.А. Шенин, Л.А. Демидова, И.Ю. Урыбин, В.В. Долгих, Т.А. Астахова

**АССОЦИИРОВАННОСТЬ ГЕНА ACE С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ
ГИПЕРТЕНЗИЕЙ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ**

ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

Исследовано распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса ангиотензин – превращающего фермента (ACE) (I/D – полиморфизма) среди детей и подростков, больных эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) и в группе сравнения, состоящей из нормотензивных лиц. При анализе изменчивости полиморфизма ACE был выявлен существенный избыток аллеля с делецией у подростков с ЭАГ.

Ключевые слова: эссенциальная артериальная гипертензия, ген ACE, предрасположенность

**ASSOCIATION OF ACE GENE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH ESSENTIAL
HYPERTENSION**

V.A. Shenin, L.A. Demidova, I.Yu. Urubin, V.V. Dolgikh, T.A. Astakhova

Institute of pediatrics and human reproduction, SC ME SD RAMS, Irkutsk

The paper presents results of the research of distribution of the incidence of alleles and genotypes of polymorphous locus ACE among children and adolescents with essential hypertension and the normals. The anal-

ysis of polymorphism variability showed higher level of alleles with deletion in adolescents with essential hypertension.

Key words: essential hypertension, gene ACE, predisposition

Ангиотензин-превращающий фермент (АСЕ) хорошо известен, как ключевой фермент в регуляции кровяного давления. Однако это основная, но не единственная функция АСЕ. Он также участвует в целом ряде процессов, протекающих в организме и влияет на пролиферацию клеток.

Ген АСЕ локализуется в 23 локусе 17-й хромосомы и содержит 26 экзонов. Для данного гена известны не менее 12 полиморфизмов, три из которых находятся в кодирующей последовательности [2, 7]. Наиболее изучен полиморфизм типа вставка /отсутствие (insertion /deletion I /D), расположенный в интроне 16 гена АСЕ. Вставка размером 287 п.н. состоит из Alu-повторов [5]. Этот полиморфизм не изменяет функцию фермента, но влияет на степень экспрессии гена. Наличие D-аллеля ассоциировано с более высоким уровнем циркулирующего АСЕ (от 14 до 50 %) и более высокой активностью тканевого фермента [3, 4]. Это послужило предпосылкой для поиска связи генотипа АСЕ с предрасположенностью к таким видам патологии сердечно-сосудистой системы, как гиперплазия левого желудочка, инфаркт миокарда, артериальная гипертензия, ремоделирование сосудов, атеросклероз. Количество исследований, посвященных роли генотипа АСЕ в развитии этих патологических состояний достаточно велико, но их весьма противоречивые результаты не позволяют на сегодняшний день сделать окончательный вывод об ассоциации I/D — полиморфизма АСЕ и ряда заболеваний, в т. ч. относительно АГ. Как показано рядом авторов, при интерпретации данных в отношении ассоциации генетического полиморфизма и АГ с ее осложнениями следует иметь в виду возможность различий в распределении аллелей в разных популяциях, а также взаимодействие с другими генами и факторами окружающей среды [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось у 168 детей. Из них 39 детей составляли группу исследования с нормальными показателями уровня артериального давления. Данная группа нами была использована для контроля. Группу с ЭАГ составили 129 детей. Возраст детей и подростков составлял 12 — 18 лет.

Диагноз эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) верифицировался методом исключения заболеваний и состояний, которые могли обусловить вторичное повышение уровня АД. С этой целью всем детям и подросткам, имеющим уровень АД, превышающий значение 95 перцентильного коридора регионального норматива распределение уровня АД проводился комплекс клинико-функциональных, биохимических и генетических исследований, позволяющий исключить многообразные патологические процессы со стороны различных органов и систем, сопровождающихся повышением уровня АД. При обследовании были

исключены заболевания почек, эндокринные заболевания и нарушения обмена веществ, заболевания центральной нервной системы, врожденные пороки сердечно-сосудистой системы и т.д.

Для исследования полиморфизма гена АСЕ забирались по 0,5 ml образцов венозной крови с добавлением антикоагулянта 0,5 М ЭДТА в соотношении 1 : 50. Препараты ДНК получали с применением ионообменной смолы Chelex — 100 [8].

Аmplификацию полиморфных участков генов АСЕ проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе производства компании «ДНК-Технология» (Москва). Использовали набор реагентов для детекции инсерционно-делеционного полиморфизма гена АСЕ. Производитель набора Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск).

Разделение продуктов реакции проводили в 2% агарозном геле, содержащем 0,05 мкг/мл этидиум бромид, с использованием внешнего стандарта молекулярного веса. Результаты электрофореза в геле визуализировались на фильтре трансиллюминатора и документировались фотографированием.

В АСЕ полиморфизме наличие одного фрагмента размером 480 п.н. соответствовало гомозиготе с инсерционным генотипом (II). Наличие фрагмента размером 194 п.н. соответствовало гомозиготе по делеции (DD), наличие обоих фрагментов соответствовало гетерозиготному генотипу (ID). Во избежание ошибочного типирования гетерозигот как гомозигот DD каждый образец с генотипом DD был амплифицирован повторно с набором праймеров, специфичных для последовательности вставки. При наличии продукта амплификации размером 293 п.н. образец идентифицировался как гетерозигота, при его отсутствии — как гомозигота по делеции.

Наблюдаемые частоты встречаемости генотипов исследованных локусов проверяли на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга.

Сравнение распределения частот аллелей и генотипов в обследованных группах проводили с использованием теста на $P \times B$, введя поправку на непрерывность [1]. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Относительный риск (RR — Relative Risk) вычисляли по формуле [6],

$$RR = (a + 0,5) \times (d + 0,5) / (b + 0,5) \times (c + 0,5),$$

где a — число больных с наличием и b — с отсутствием данного аллеля среди больных, c и d — число здоровых с наличием и отсутствием данного аллеля соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с этим нами было исследовано распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса АСЕ (I/D — полиморфизма) среди детей и подростков с ЭАГ и в группе сравнения, состоя-

Распределение фенотипов и частот генов ACE в исследованных группах

Сис-тема	Фено-тип	Контрольная группа (I)					Дети с ЭАГ (II)					χ^2 I/II
		N.O.	F.O.	Частота гена	N.E.	χ^2 d.f. = 1	N.O.	F.O.	Частота гена	N.E.	χ^2 d.f. = 1	
ACE	II	14	35,90	I = 0,6282 D = 0,3718	15,39	0,91 p > 0,05	26	20,15	I = 0,5078 D = 0,4922	33,26	6,54 p < 0,05	14,74 p < 0,01
	ID	21	53,85		18,22		79	61,24		64,48		
	DD	4	10,25		5,39		24	18,61		31,26		
	Σ	39					129					
		Ho = 0,0538 ± 0,0789 He = 0,4671 ± 0,0290 D = + 0,1527					Ho = 0,6124 ± 0,0429 He = 0,4999 ± 0,0029 D = + 0,2251					

Примечание: N.O. – фактическая численность фенотипов; F.O. – фактическая частота фенотипов; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; N.E. – ожидаемая численность фенотипов.

щей из нормотензивных лиц такого же возрастного и полового состава.

Распределение генотипов и частот аллелей гена ACE в группе детей и подростков с ЭАГ и контрольной группе приведено в таблице 1. В контрольной группе распределение генотипов и частот гена ACE соответствовало ожидаемому согласно равновесию Харди-Вайнберга (χ^2 d.f. = 1 = 0,91; p > 0,05). Статистически достоверное отклонение от равновесия, обусловленное недостатком гомозигот по инсерции II, наблюдается в группе больных с ЭАГ (χ^2 d.f. = 1 = 6,54; p < 0,05). Частоты генотипов полиморфного маркера I/D гена ACE распределились следующим образом: II – 20,2 %, ID – 61,2 %, DD – 18,6 % в группе больных с ЭАГ и 35,9 %, 53,9 %, 10,3 % – в контрольной группе соответственно. По сравнению с контролем у пациентов с ЭАГ различия в распределении генотипов статистически достоверны ($\chi^2 = 14,74$; p < 0,01). Частота обнаружения генотипа DD у пациентов с ЭАГ в 1,8 раза превышает таковую в контрольной группе. В то же время частота гомозигот по инсерции в группе больных в 1,8 раза меньше, чем в контрольной группе. Различия по частоте аллелей гена ACE также наблюдаются, но менее выражены и статистически не достоверны. Частота I аллеля в группе больных (50,8 %) в 1,3 раза ниже, чем в контрольной выборке.

Данные по относительному риску (RR) свидетельствуют о существовании положительной ассоциации аллеля D гена ACE с ЭАГ. Значения RR для аллеля D и генотипов ID и DD выше 1. Для аллеля I и генотипа II значения RR составляют 0,32 и 0,45, соответственно, свидетельствуют об отрицательной ассоциации аллеля I с ЭАГ. Полученные результаты можно расценивать как показатель того, что аллель D является фактором предрасположенности к ЭАГ, а аллель I гена ACE представляет собой фактор устойчивости, оказывающий защитное действие к развитию ЭАГ.

Таким образом, результаты проведенного нами сравнительного анализа указывают на наличие выраженной ассоциации полиморфизма гена ACE и эссенциальной артериальной гипертензии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
2. Clifford C.P. Racial differences in the frequency of a restriction site polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene / C.P. Clifford, D.J.R. Nuner // Abstracts 16 th Sci. Meeting Internat. Soc. Hypertension. Hasgow, UK. – 1996. – Abstract. 4 B, N 4. – P. 1598.
3. Danser A.H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion / insertion polymorphism / A.H. Danser, M.A. Schalekamp, W.A. Bax, A.M. Van den Brink, P.R. Saxena, J.A. Riegger, H. Schunkert // Circulation. – 1995. – N 92. – P. 1387 – 1388.
4. Rigat B. An insertion / deletion polymorphism of angiotensin 1 converting enzyme accounting for half of the variance of the serum enzyme levels / B. Rigat, C. Hybert, F. Alhenc-Jelas // J. Clin. Invest. – 1990. – N 86. – P. 1343 – 1346.
5. Rigat B. PCR detection of the insertion / deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP 1) (dipeptidyl – carboxypeptidase 1) / B. Rigat, C. Hubert, P. Corvol, F. Soubrier // Nucl. Acids. Res. – 1992. – Vol. 20. – P. 1433.
6. Thomson J. A review of theoretical aspects of HLA and disease associations / J. Thomson // Theor. Popul. Biol. – 1981. – N 20. – P. 168.
7. Villard E. Two putative functional variants at the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene locus involved in the genetic determination of plasma ACE / E. Villard, L. Tiret, A.M. Houot // Abstracts 16 th Sci. Meeting Internat. Soc. Hypertension. Hasgow, UK. – 1996. – Abstract. 4, N 2. – P. 0736.
8. Walsh P. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material / P. Walsh et al. // Bio Techniques. – 1991. – N 10. – P. 506 – 513.
9. West M.J. Renin-angiotensin system gene polymorphism and left ventricular hypertrophy. The case against an association / M.J. West, K.M. Summer, K.K. Wong, D.J. Burstow // Adv. Exp. Med. Biol. – 1997. – N 432. – P. 117 – 122.