

Роль полиморфных вариантов гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE) в формировании различных типов ремоделирования миокарда у больных хронической сердечной недостаточностью

Пушкарёва А.Э.^{1,2}, Хусаинова Р.И.², Валиев Р.Р.², Арутюнов Г.П.³, Хуснутдинова Э.К.^{2*}

¹ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, 450000, ул. Ленина, 3

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики

Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054, пр. Октября, 71

³ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России,

Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1

* e-mail: ekkh@anrb.ru

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является одной из лидирующих причин инвалидизации и смертности населения. Учитывая важную роль нейроэндокринных систем в развитии ХСН, актуальным подходом является изучение полиморфизма генов, продукты экспрессии которых участвуют в формировании различных типов ремоделирования миокарда и прогрессировании ХСН. Проведено изучение трех полиморфных локусов гена *ACE* — *rs4343* (2350 G>A), *rs4291* (240A>T), *rs4340* (I/D) у 271 пациента с ХСН (II–IV ФК) с различными типами ремоделирования левого желудочка (ЛЖ) и 194 условно здоровых мужчин и женщин соответствующего возраста, а также гаплотипов изученных полиморфных локусов гена *ACE*. Значимыми в развитии ХСН и различных типов ремоделирования миокарда ЛЖ являются гомозиготные генотипы **G*G* локуса *rs4343* и **D*D* локуса *rs4340*, а также гаплотип на основе этих двух локусов **DG* гена *ACE*. При рассмотрении гаплотипов всех трех полиморфных локусов *ACE* (*rs4291*, *rs4340* и *rs4343*) преобладание гаплотипа **TDG* было статистически значимым у больных с выраженной гипертрофией ЛЖ и умеренной гипертрофией ЛЖ.

Ключевые слова: ремоделирование левого желудочка, ХСН, ген ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), полиморфный locus, генотип, гаплотип

Введение

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (RAAS) играет одну из основополагающих ролей в поддержании кардиоваскулярного гомеостаза и в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, начиная с артериальной гипертензии и заканчивая сердечной недостаточностью. Множество клеток генерируют в организме компоненты RAAS, и результатом данного процесса является существование множества локальных систем RAAS. Активность ренина плазмы крови увеличивается по мере развития сердечной недостаточности, часто ассоциируясь с клиническим проявлением или восприимчивостью к диуретической терапии [1]. Ангиотензин-превращающий фермент (ACE) играет важную роль в превращении ангиотензина I в ангиотензин II, уровень активности тканевого ACE важен для продукции ангиотензина II. Понимание взаимосвязей между ACE, ростом кардиомиоцитов, фиброзом и ремоделированием сердца и сосудов на молекулярном уровне поможет раскрыть патогенетические механизмы участия RAAS в развитии сердечной недостаточности. В последние годы исследователями выявлен гомологичный ACE2, который в отличие от других компонентов RAAS, по-видимому, является протективным для развития сердечной недостаточ-

ности. Внутрисердечная гиперэкспрессия ACE2 предотвращает индуцированное ангиотензином II развитие гипертонии и кардиального фиброза, таким образом указывая на кардиопротективную роль ACE2 *in vivo* и возможное терапевтическое применение в будущем [2]. Ген, кодирующий ACE, расположен на длинном плече хромосомы 17 (17q23), протяженность его ~21 т.п.н, состоит из 26 экзонов и 25 интронов. В гене *ACE* выявлено множество полиморфных вариантов, однако, частота несинонимичных однонуклеотидных замен, влияющих на структуру белка, незначительна. Большинство исследований по поиску генетических ассоциаций (а также и метаанализ, проведенный на их основе) выполнено с использованием однонуклеотидных маркеров (Single Nucleotide Polymorphisms — SNPs), однако результаты исследований зачастую противоречивы, что, возможно, связано с отсутствием стандартизированных диагностических критериев и методов обработки результатов, а также гетерогенностью исследуемых выборок [3–9].

Несмотря на многочисленные исследования, основные регуляторные полиморфные варианты гена *ACE*, определяющие генетическую предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям, еще предстоит найти. В базе данных NCBI (The National Centre for Biotechnology Information) зарегистрировано более 160 полиморфных вариантов

гена *ACE*, большинство из которых являются SNPs. Только 34 из них расположены в кодирующих областях; 18 — являются миссенс-мутациями. Однако исследуемый SNP далеко не всегда является действительным маркером, ассоциированным с заболеванием. Эффекты отдельных маркеров, выявляемые при классическом анализе ассоциаций, как правило, невелики и могут быть связаны не с самим изучаемым маркером, а со сцепленным с ним функционально значимым вариантом (мутацией или полиморфизмом). В силу этого анализ ассоциаций на уровне гаплотипов может оказаться более мощным и информативным средством, чем изучение отдельных маркеров [10]. Одной из потенциально наиболее продуктивных стратегий выявления генетических вариантов, лежащих в основе подверженности к многофакторным заболеваниям (МФЗ), является анализ структуры неравновесия по сцеплению (LD) в области генов-кандидатов и обнаружение связанных с болезнью гаплотипов и их tagSNPs (tagging single nucleotide polymorphisms; полиморфизмы, аллельные варианты которых маркируют гаплотипические блоки) [11–13].

Более того, анализ гаплотипов считается более мощным инструментом в сравнении с поиском ассоциаций SNPs, хотя это дискутируется некоторыми исследователями [14]. Наличие высокой степени неравновесия по сцеплению между полиморфными вариантами в гене *ACE* затрудняет разделение между функционально значимыми и нейтральными полиморфными вариантами в одном гаплотипе.

Учитывая вышеизложенное, целью работы является поиск ассоциаций полиморфных вариантов *rs4340(288BP INDEL) / (ALU)-*, *rs4343 (c.2328 G>A)*, *rs 4291 (c.-262T>A)* гена *ACE* с развитием ХСН с учетом типов ремоделирования ЛЖ.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 271 больного с ХСН, госпитализированные по поводу декомпенсации сердечной недостаточности с жалобами на одышку, сердцебиение, симптомами задержки жидкости в организме, нестабильностью артериального давления. Диагноз ХСН устанавливался в соответствии с «Национальными рекомендациями по диагностике и лечению ХСН» III пересмотра [15]. В качестве контрольной группы в исследование включены 194 условно здоровых мужчины и женщины без признаков заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС), соответствующей исследуемой группе возраста.

Критериями отбора больных были: ХСН на фоне ИБС, дилатационной кардиомиопатии, артериальной гипертензии (II—III стадии, согласно Российским рекомендациям, 2004), а также сочетания ИБС и артериальной гипертензии (74% больных); четкие клинические признаки II—IV ФК ХСН (NYHA, 1994); возраст моложе 60 лет (средний возраст $53,14 \pm 9,63$ года). Не включались в исследование больные со стенозами клапанных

отверстий, врожденными пороками сердца, в период острой левожелудочковой недостаточности, с острым коронарным синдромом, при наличии постинфарктной аневризмы ЛЖ, с сахарным диабетом, дефектами опорно-двигательного аппарата. Эхокардиографические измерения проводились в двумерном режиме на аппарате General Electric Visi E9 (USA). Толщина стенок ЛЖ и размеры полости определялись из парастеральной позиции длинной оси ЛЖ. Масса миокарда ЛЖ (ММЛЖ) вычислялась на основании показателей его длины и толщины по короткой оси из парастерального доступа по формуле R.Devereux и N.Reichek. Индекс массы миокарда ЛЖ (ИММЛЖ) рассчитывали как отношение массы миокарда к площади поверхности тела. Относительная толщина стенок ЛЖ определялась следующим способом: $ОТС = (ТМЖП + ТЗС \text{ ЛЖ}) / КДР \text{ ЛЖ}$, где ТМЖП — толщина межжелудочковой перегородки ЛЖ, ТЗСЛЖ — толщина задней стенки ЛЖ, КДРЛЖ — конечный диастолический размер ЛЖ.

В зависимости от значений ОТС, а также ИММЛЖ у больных ХСН были определены следующие типы ремоделирования ЛЖ [16]:

- 1-я группа — 84 больных с признаками эксцентрической гипертрофии ЛЖ с дилатацией полости ЛЖ (ЭГ-дил) (ОТС в пределах 0,45, увеличение ИММЛЖ, дилатация ЛЖ, фракция выброса 20—45% по Simpson), *больные ХСН с низкой фракцией выброса*;
- 2-я группа — 119 больных с признаками выраженной концентрической гипертрофии (ВКГ) (ИММЛЖ более 163 г/м² для мужчин, ИММЛЖ более 129 г/м² для женщин, ОТС >0,53, толщина МЖП и толщина задней стенки ЛЖ более 1,6 для женщин и более 1,7 для мужчин; *больные ХСН с сохраненной фракцией выброса*);
- 3-я группа — 69 больных с умеренной концентрической гипертрофией ЛЖ (УГ) (ИММЛЖ 145—162 г/м² для мужчин, ИММЛЖ 116—128 г/м² для женщин, ОТС 0,48 — 0,52 для женщин и ОТС 0,47—0,51 для мужчин, сохраненная ФВ).

Контрольная группа состояла из 194 клинически осмотренных здоровых доноров и была представлена лицами обоего пола (средний возраст $51,24 \pm 8,79$ года), им проведена электрокардиография, эхокардиография и УЗДС сосудов головного мозга с целью исключения признаков ССЗ.

Забор крови больных с ХСН осуществляли на базе кафедры госпитальной терапии Башкирского государственного медицинского университета и городской клинической больницы №13 г. Уфы с информированного письменного согласия каждого больного на участие в проводимом исследовании. Исследование получило одобрение Экспертного совета по биомедицинской этике по клиническим дисциплинам БГМУ.

Выделение ДНК проводили методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции по С.С. Mathew [1984].

Генотипирование изученных локусов проводили с использованием ПЦР/ПДРФ анализа. Перечень исследованных локусов, последовательности специфичных олигонуклеотидных праймеров, размеры амплифицируемых фрагментов, названия ферментов рестрикции и длины продуктов расщепления представлены в табл. 1.

Статистическая обработка полученных данных проведена общепринятыми методами описательной статистики с использованием стандартных пакетов Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0. Различия между группами были признаны значимыми на уровне достоверности 0,05. При числе сравнений более двух (генотипы и гаплотипы) применялась поправка на множественность сравнений Бонферрони (уровень значимости делился на число сравнений). Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio, OR, по формуле: $OR = (a \times d) / (b \times c)$, где a — частота признака в выборке больных; b — частота признака в контрольной выборке; c — сумма частот остальных признаков в выборке больных; d — сумма частот остальных при-

знаков в контрольной выборке. Анализ неравновесия по сцеплению и гаплотипический анализ проведен с применением программы Haploview 4.2. Частоты гаплотипов оценивались с помощью EM-алгоритма, неравновесие по сцеплению (LD) между парами ОНП оценивалось с использованием коэффициента D' , предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r^2 Пирсона, предусмотренных программным обеспечением Haploview 4.2 (<http://www.chgb.org.cn/lda/lda.htm>) [19].

Результаты

Анализ генетической структуры исследованной выборки, состоящей преимущественно из индивидов татарской и русской этнической принадлежности, не выявил статистически значимых различий по изученным локусам гена *ACE* (табл. 2). Учитывая отсутствие генетической дифференциации по изученным локусам и с целью увеличения численности групп, мы провели поиск ассоциаций без учета этнического фактора.

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных для генотипирования изученных локусов гена *ACE*

Локус	Последовательность праймеров (5' -> 3')	Фермент рестрикции	Размеры аллелей (п.н.)	Ссылка
<i>rs4343</i>	F-CTGACGAATGTGATGGCCGC R-TGATGAGTTCCACGTATTTTCG	BstUI 60°C	*A (122) *G (103+19)	[17]
<i>rs4291</i>	F-TCGGGGCTGGGAAGATCGAGC R-GAGAAAGGGCCTCTCTCT	XbaI 37°C	*A (137) *T (114+23)	
<i>rs4340</i>	F-CTGGAGACCACTCCCATCATTTCT R-ATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT	—	*D (190) *I (490)	[18]

Таблица 2

Сравнительный анализ распределения частот аллелей изученных локусов гена *ACE* между группами сравнения различной этнической принадлежности

Вид ремоделирования	Этническая принадлежность	rs4343		rs4340		rs4291	
		*A	*G	*I	*D	*A	*T
ЭксГс дил	Русск. (N = 50)	0,57	0,43	0,45	0,55	0,635	0,364
ЭксГс дил	Татар. (N = 34)	0,573	0,426	0,485	0,514	0,590	0,409
χ^2 ; p		0,310; 0,578		0,203; 0,652		0,328; 0,567	
ВКГ	Русск. (N = 76)	0,5526	0,447	0,486	0,513	0,6513	0,3486
ВКГ	Татар. (N = 24)	0,5625	0,4375	0,4375	0,5625	0,625	0,375
χ^2 ; p		0,114; 0,735		0,356; 0,551		0,110; 0,739	
УКГ	Русск. (N = 43)	0,523	0,476	0,476	0,523	0,581	0,4186
УКГ	Татар. (N = 30)	0,55	0,45	0,417	0,583	0,566	0,433
χ^2 ; p		0,102; 0,749		0,515; 0,473		0,031; 0,590	
Контроль	Русск. (N = 117)	0,589	0,4102	0,572	0,427	0,6853	0,3146
Контроль	Татар. (N = 60)	0,5677	0,4322	0,5416	0,458	0,6166	0,3833
χ^2 ; p		0,155; 0,693		0,309; 0,578		1,667; 0,197	
Примечание. (ЭГдил) — больные с эксцентрической гипертрофией ЛЖ с дилатацией; (ВКГ) — больные с выраженной концентрической гипертрофией ЛЖ; (УКГ) — больные с умеренной концентрической гипертрофией ЛЖ							

Результаты исследования трех полиморфных локусов гена *ACE* — *rs4343* (2350 G>A), *rs4291* (240A>T), *rs4340* (I/D) у больных с различными типами ремоделирования сердца и в контрольной группе приведены в табл. 3. Распределение частот генотипов указанных полиморфных локусов гена *ACE* соответствовало распределению Харди—Вайнберга ($p>0,05$).

При исследовании полиморфного локуса *rs4343* (2350 G >A), локализованного в интроне 17 гена *ACE*, было установлено, что как в группе больных с эксцентрической гипертрофией ЛЖ (ЭГдил), так и в группе больных с выраженной концентрической гипертрофией ЛЖ (ВКГ) статистически значимо чаще встречается гомозиготный генотип *G*G 21,7%, и 22,9% соответственно, по сравнению с контрольной группой 10,8% ($p = 0,017$, $p = 0,004$). Риск формирования ХСН как с дилатационным, так и гипертрофическим типами ремоделирования у носителей генотипа *G*G гена *ACE* был повышен (OR = 2,28, 95%ДИ 1,143—4,553 и OR = 2,44, 95%ДИ 1,309—4,563 соответственно). Наблюдается градиент накопления частоты рискованного генотипа *G*G от 0,108 в группе контроля до 0,229 в группе с выраженной концентрической гипертрофией. Аллель *A локуса *rs4343* (2350 G>A) в контрольной группе встречался достоверно чаще, чем в объединенной выборке больных ($p = 0,044$).

Учитывая, что при анализе частот генотипов проводится сравнение трех вариантов генотипов, мы применили поправку на множественность сравнений Бонферрони и оказалось, что все полученные нами ассоциации генотипов локуса *rs4343* гена *ACE* статистически значимы на уровне достоверности $p<0,017$ (0,05/3).

Анализ частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs4291* (240A>T), расположенного в промоторной области гена *ACE*, у больных ХСН с различными типами ремоделирования миокарда и в контрольной группе не выявил статистически значимых различий между группами сравнения.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs4340* (I/D), локализованного в интроне 16 гена *ACE*, определило тенденцию к преобладанию в группах больных с ЭГдил и с ВКГ гомозиготного генотипа *D*D. При объединении этих двух групп обнаружено статистически значимое повышение частоты генотипа *D*D по сравнению с контрольной группой, вероятно, за счет увеличения объема выборки (29,3% и 20,4% соответственно, $p = 0,039$). Анализ отношения шансов показал повышенный риск для носителей *D*D генотипа развития этих двух типов ремоделирования ЛЖ (OR = 1,62, 95%ДИ 1,022—2,57). Однако при применении поправки Бонферрони, различия не достигали уровня статистической значимости ($p>0,017$). Наблюда-

Таблица 3

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов изученных локусов гена *ACE* у больных ХСН с различными типами ремоделирования миокарда и в контрольной группе

Локус	Аллели и генотипы	Больные (ЭГдил) N = 83	Больные (ВКГ) N = 119	Больные (УКГ) N = 69	Контроль N = 194
<i>rs4343</i>	*A	89 (0,536)	126 (0,534)	75 (0,543)	235 (0,606)
	*G	77 (0,464)	110 (0,466)	63 (0,457)	153 (0,394)
	*A*A	24 (0,289)	35 (0,297)	19 (0,275)	62 (0,320)
	*A*G	41 (0,494)	56 (0,474)	37 (0,536)	111 (0,572)
	*G*G	18 (0,217)	27 (0,229)	13 (0,189)	21 (0,108)
	χ^2 ; p; OR (95% ДИ)	GG (5,669; 0,017; 2,28 (1,143-4,553))	GG (8,193, 0,004; 2,44 (1,309-4,563))	GG (2,906, 0,088)	A (4,04, 0,044; 0,75 (0,56-0,99))
<i>rs4291</i>	*A	104 (0,627)	146 (0,613)	82 (0,594)	251 (0,647)
	*T	62 (0,373)	92 (0,387)	56 (0,406)	137 (0,353)
	*A*A	30 (0,361)	43 (0,361)	22 (0,319)	75 (0,386)
	*A*T	44 (0,530)	60 (0,504)	38 (0,551)	101 (0,521)
	*T*T	9 (0,109)	16 (0,135)	9 (0,13)	18 (0,093)
<i>rs4340</i>	*I	78 (0,464)	111 (0,474)	65 (0,471)	210 (0,536)
	*D	90 (0,536)	123 (0,526)	73 (0,529)	182 (0,464)
	*I*I	19 (0,226)	28 (0,239)	16 (232)	54 (0,276)
	*I*D	40 (0,476)	55 (0,47)	33 (0,478)	102 (0,520)
	*D*D	25 (0,298)	34 (0,291)	20 (0,290)	40 (0,204)
	χ^2 ; p; OR (95% ДИ)	—	—	—	—

Примечание. (ЭГдил) — больные с эксцентрической гипертрофией ЛЖ с дилатацией; (ВКГ) — больные с выраженной концентрической гипертрофией ЛЖ; (УКГ) — больные с умеренной концентрической гипертрофией ЛЖ

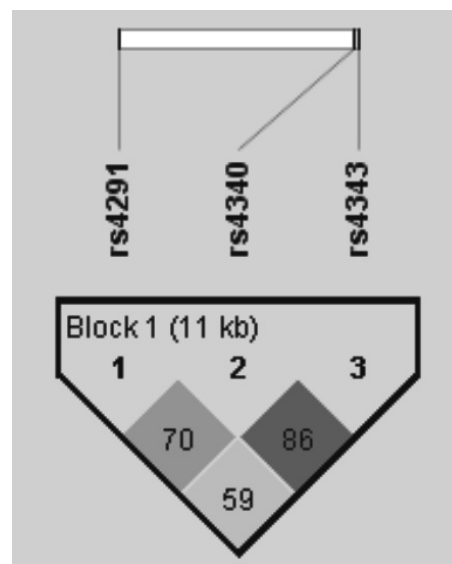
ется накопление частоты рискового генотипа **D*D* в группе с дилатационным типом ремоделирования по сравнению с группой контроля от 0,204 к 0,298 у больных. Также отмечается снижение частоты протективного генотипа **I*I* в группе с дилатационным типом ремоделирования (0,226) по сравнению с контрольной группой (0,276).

Мы провели анализ неравновесия по сцеплению изученных локусов гена *ACE* с последующим гаплотипическим анализом (рисунок).

Обнаружено 7 гаплотипов как у больных ХСН в целом, так и в контрольной группе (табл. 4). Наиболее частыми оказались гаплотипы **AIA* и **TDG*, которые чаще встречались в общей группе больных по сравнению с контролем, достигая статистически значимых различий по частоте гаплотипа **TDG*. Так, в объединенной группе больных ХСН частота гаплотипа **TDG* была значительно выше, чем в контрольной выборке (31,6% и 23,6% соответственно, $\chi^2 = 6,259$, $p = 0,0124$; OR = 1,48, 95% ДИ 1,08–2,03). При этом редкий гаплотип **TIA* чаще встречался в контрольной группе по сравнению с группой больных и оказался маркером пониженного риска развития ХСН (2,7% и 7,2% соответственно, $\chi^2 = 8,497$, $p = 0,0036$, OR = 0,36; 95% ДИ 0,18–0,73). При использовании поправки Бонферрони на множественность сравнений только различия по частоте гаплотипа **TIA* оказались также статистически значимыми (0,005/7 = 0,007).

Мы также проанализировали гаплотипы на основе двух полиморфных локусов гена *ACE* — *rs4340* и *rs4343*. Показатель неравновесия по сцеплению для данных локусов оказался наиболее высоким ($D' = 0,84$, $r^2 = 0,541$). Из всех гаплотипов, определенных с частотой более 1%, у больных с ВКГ гаплотип **DG* встречался статистически значимо чаще, чем в группе контроля (44,5% и 35,1% соответственно, $\chi^2 = 5,448$, $p = 0,0196$) (табл. 5).

Аллель **T* полиморфного варианта *rs4291* в сочетании с аллелями **I* и **A* локусов *rs4340* и *rs4343* является маркером пониженного риска развития ХСН, тогда как при его отдельном анализе он не являлся значимым, что



Структура неравновесия по сцеплению полиморфных вариантов в гене *ACE* в совокупной группе больных ХСН и контроля (*rs4291*, *rs4340* — $D' 0,708$; $r^2 0,297$; *rs4291*, *rs4343* — $D' 0,594$; $r^2 0,27$).

свидетельствует о целесообразности анализа гаплотипов двух локусов гена *ACE*.

В группе больных с ЭГдил наблюдалась схожая тенденция — гаплотип **DG* встречался статистически значимо чаще, чем в группе контроля (44,2% и 35,1% соответственно, $\chi^2 = 4,165$, $p = 0,0413$). Для локусов *rs4340* и *rs4343* гена *ACE* у больных с ЭГдил величина неравновесия по сцеплению оказалась высокой ($D' = 0,827$, $r^2 = 0,515$). При анализе гаплотипов всех трех полиморфных локусов *ACE* (*rs 4291*, *rs4340* и *rs4343*) не наблюдалось статистически значимых различий по гаплотипу **TDG* между выборкой больных с эксцентрическим типом ремоделирования ЛЖ и контрольной группой.

Интересным является тот факт, что для больных с УГ ЛЖ частоты гаплотипов по двум полиморфным локусам гена *ACE* — *rs4340* и *rs4343* не различались с таковыми в контрольной группе. При рассмотрении гаплотипов

Анализ гаплотипов по локусам *rs4291*, *rs4340* и *rs4343* гена *ACE* в общей выборке больных ХСН и контрольной группе

Таблица 4

Гаплотипы	Частоты		χ^2	p	OR (95% ДИ)
	Больные ХСН	Контроль			
<i>*AIA</i>	0,430	0,417	0,129	0,7195	—
<i>*TDG</i>	0,316	0,236	6,259	0,0124	1,48 (1,08-2,03)
<i>*ADG</i>	0,130	0,116	0,389	0,533	—
<i>*ADA</i>	0,045	0,076	3,354	0,067	—
<i>*TIA</i>	0,027	0,072	8,497	0,0036	0,36 (0,18-0,73)
<i>*TDA</i>	0,036	0,039	0,045	0,8329	—
<i>*AIG</i>	0,015	0,037	3,563	0,0591	—

всех трех полиморфных локусов *ACE* (*rs4291*, *rs4340* и *rs4343*) тенденция к преобладанию гаплотипа **TDG* у больных с УГ ЛЖ была статистически значимой, аналогично больным с ВКГ ($\chi^2 = 4,136$, $p = 0,042$, $OR = 1,55$ 95% ДИ 1,010–2,366). Наличие данного гаплотипа, вероятнее всего, приводит к развитию гипертрофии ЛЖ различной степени выраженности, тем самым подтверждая значимость полиморфных вариантов гена *ACE* в патогенезе ремоделирования сердца.

Обсуждение

Большинство исследований сфокусировано на инсерционно-делеционном полиморфизме (*rs4340*) гена *ACE*. В предыдущих исследованиях было продемонстри-

ровано влияние *I/D* полиморфизма на экспрессию ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в миокарде, у носителей **D*D* генотипа данного полиморфизма отмечалось повышение активности тканевого АПФ, также носительство данного генотипа ассоциировалось с развитием систолической сердечной недостаточности и выраженной гипертрофией ЛЖ [6, 20, 21]. Схожие с нашими данными были получены итальянскими исследователями. *I/D* полиморфизм гена *ACE* существенно влиял на процесс ремоделирования ЛЖ у больных ХСН, на изменение конечного диастолического и конечного систолического объема ЛЖ. Носительство аллеля **D* и генотипа **D*D* способствовало развитию резистентности к терапии ингибиторами АПФ и спиронолактоном у пациентов с ХСН [21]. В другом исследовании *I/D* поли-

Таблица 5

Анализ гаплотипов по изученным локусам гена *ACE*
у больных ХСН с разным типом ремоделирования миокарда ЛЖ и в контрольной группе

Гаплотипы	Частоты		χ^2 , p	OR (95% ДИ)
	Больные ХСН с ВКГ	Контроль		
Блок 1				
*IA	0,461	0,488	0,437; 0,5085	—
*DG	0,445	0,351	5,448; 0,0196	1,49 (1,07-2,07)
*DA	0,077	0,115	2,399; 0,121	—
*IG	0,017	0,045	3,485; 0,0619	—
Блок 2				
*AIA	0,434	0,415	0,227; 0,634	—
*TDG	0,332	0,238	6,526; 0,011	1,6 (1,127-2,297)
*ADG	0,112	0,116	0,004; 0,949	—
*ADA	0,053	0,080	1,607; 0,205	—
*TIA	0,028	0,073	5,86; 0,016	0,39 (0,17-0,89)
*TDA	0,024	0,038	0,667; 0,414	—
*AIG	0,017	0,038	2,095; 0,148	—
Гаплотипы	Частоты		χ^2 , p	OR (95% ДИ)
	Больные ХСН с ЭГдил	Контроль		
Блок 1				
*IA	0,454	0,488	0,533; 0,4655	—
*DG	0,442	0,351	4,165; 0,0413	1,46 (1,01-2,11)
*DA	0,088	0,115	0,969; 0,3249	—
*IG	0,016	0,045	2,89; 0,0891	—
Блок 2				
*AIA	0,423	0,415	0,049; 0,824	—
*TDG	0,286	0,238	1,965; 0,161	—
*ADG	0,156	0,116	1,303; 0,254	—
*ADA	0,038	0,080	2,683; 0,101	—
*TIA	0,032	0,073	3,819; 0,051	—
*TDA	0,049	0,038	0,217; 0,642	—
*AIG	0,014	0,038	2,174; 0,140	—

морфизм гена *ACE* оказался предиктором тяжести сердечной недостаточности, причем независимо от стандартных прогностических маркеров, таких, как N-концевой промозговой натрийуретический пептид. В этом же исследовании не выявлено значение другого полиморфного локуса *rs4291* (*240A>T*) гена *ACE* для тяжести и клинических исходов сердечной недостаточности [6]. Схожие данные для этого полиморфного локуса получены и нами — у больных ХСН с различными типами ремоделирования миокарда и в контрольной группе не наблюдалось статистически значимых различий. По данным китайских исследователей, при изучении тех же полиморфных вариантов гена *ACE* (*rs4343* и *rs4340*) у пациентов с ИБС и артериальной гипертензией, с наличием дисфункции ЛЖ, была выявлена значительная корреляционная зависимость между распределением частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs4343* гена *ACE* с развитием фибрилляции предсердий, а комбинация двух гомозиготных генотипов двух локусов (**I*/I** и **A*/A**) явилась протективным фактором для развития фибрилляции предсердий [3].

В то же время проведенный метаанализ существующих результатов исследований *I/D* полиморфизма у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) по поиску фенотипических ассоциаций не позволил однозначно подтвердить его роль, эксперименты *in vitro* также не выявили какого-либо влияния *I/D* полиморфизма на транскрипцию или сплайсинг гена [22]. Противоречивость исследований по поиску генетических ассоциаций может быть обусловлена целым рядом причин: критериями отбора пациентов, количеством больных в выборке, дизайном исследования, этническими различиями, эпистатическими межгенными взаимодействиями, когда эффект изучаемого гена замаскирован эффектом других генов, вовлеченных в патогенез заболевания.

В ассоциативных исследованиях рекомбинации между маркерными SNPs и аллелями, причинно связанными с заболеваниями, могут «размывать» неравновесие по сцеплению между ними, и снижать выраженность ассоциации [23]. Португальскими исследователями при изучении полиморфных вариантов *rs4340* *I/D* и *rs4343* *A11860G* гена *ACE* выявлен гаплотип **11860 A/I* пониженного риска развития ИБС как для всей популяции, так и для мужчин [24]. Согласно данным канадских исследователей, комбинация полиморфных вариантов двух генов ангиотензиногена и ангиотензин-конвертирующего фермента *AGT* (*235T*) / *ACE* (*D*) значимо увеличивала риск развития сердечной недостаточности [7]. При изучении девяти полиморфных вариантов в гене *ACE* в мексиканской популяции были выявлены полиморфные варианты *rs4291*, *rs4335*, *rs 4353*, *rs4362* и *rs4363*, играющие важную роль в развитии артериальной гипертензии, также был выявлен один рискованный и один протективный гаплотипы. У лиц с рискованным гаплотипом уровень *ACE* плазмы крови оказался повышенным [25].

Предыдущие исследования по изучению гаплотипического разнообразия гена *ACE* выявили кладиристическую структуру, включающую три больших клада (А, В и С), уровень ангиотензин-превращающего фермента варьирует при различных комбинациях в гаплотипах, принадлежащих к А, В или С кладу. При изучении гаплотипов гена *ACE* у больных с нефротическим синдромом выявлена сильная ассоциация отдельных гаплотипов с толерантностью к лекарственным препаратам, тяжестью развития гипертензии и степенью поражения почек [26].

По результатам нашего исследования мы пришли к следующему заключению. Значимыми в развитии ХСН и различных типов ремоделирования миокарда ЛЖ являются гомозиготный генотип **G*G* локуса *rs4343* и гаплотип двух локусов **DG* гена *ACE*. При рассмотрении гаплотипов всех трех полиморфных вариантов гена *ACE* (*rs4291*, *rs4340* и *rs4343*) преобладание гаплотипа **TDG* было статистически значимым у больных с выраженной гипертрофией ЛЖ и умеренной гипертрофией ЛЖ. Таким образом, проведенное нами исследование подтверждает важную роль гена *ACE* в патогенезе развития ХСН и таких типов ремоделирования миокарда ЛЖ, как ЭГдил и ВКГ. Изучение полиморфных вариантов данного гена может послужить основой для ранней дифференциальной диагностики различных типов ремоделирования ЛЖ и индивидуального подхода к превентивному лечению ХСН.

Список литературы

1. Greenberg B. An ACE in the hole: Alternative Pathways of the Renin Angiotensin System and Their Potential Role in Cardiac Remodeling // J. Am. Coll. Cardiol. — 2008. — Vol. 52. — P. 755–757.
2. Der Sarkissian S., Huentelman M.J., Stewart J., Kato-vich M.J., Raizada M.K. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 2006. — May–Jun. — Vol. 91(1–2). — P. 163–198.
3. Wang Yazhu, Li Ying, Fan Jinqi et al. Association study of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene *rs4340* and *rs4343* polymorphism with atrial fibrillation // Heart. — 2011. — Vol. 97. — A57 doi:10.1136/heartjnl-2011-300867.168.
4. Liza U Ljungberg, Carl Johan Ostgren, Fredrik H Nystrom et al. Associations of genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system with central aortic and ambulatory blood pressure in type 2 diabetic patients. Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System published online 28 January 2013. <http://jra.sagepub.com/content/early/2013/01/28/1470320312474052>
5. Rudnicki M., Mayer G. Significance of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular and renal disease // Pharmacogenomics. — 2009. — 10. — P. 463–476.
6. Fatini Cinzia MD, PhD; Sticchi, Elena BS, Marcucci, Ros-salla MD, PhD et al. ACE Insertion/Deletion, but not -240A>T polymorphism, modulate the severity in heart failure // Journal of Investigative Medicine. — 2008. — December. — Vol. 56. — Issue 8. — P. 1004–1010.
7. Marcin Zakrzewski-Jakubiak, Simon de Denus, Marie-Pierre Dube et al. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2008. — 65:5. — P. 742–751.

8. En-Zhi Jia, Zhen-Xia Xu, Chang-Yan Guo et al. Renin-angiotensin-aldosterone polymorphisms and coronary artery disease: detection of gene-gene and gene-environment interactions // *Cell Physiology and Biochemistry*. — 2012. — Vol. 29. — P. 443–452.
9. QIU Chunguang, HAN Zhanying, LU Wenjie, ZHANG Cuntai. Association of polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and type I angiotensin II receptor genes with coronary heart disease and severity of coronary artery stenosis // *Journal of Huazhong University and Technology*. — 2007. — Vol. 27(6). — P. 660–663.
10. Frank G.A. De Bakker, Peter Groenewegen, Frank Den Hond. A Bibliometric Analysis of 30 Years of Research and Theory on Corporate Social Responsibility and Corporate Social Performance // *Business & Society*. — 2005. — Vol. 44(3). — P. 283–317.
11. Crawford D.C., Akey D.T., Nickerson D.A. The patterns of natural variation in human genes // *Annu Rev Genomics Hum Genet*. — 2005. — 6. — P. 287–312.
12. Bin Zhang and Steve Horvath. Statistical applications in genetics and molecular biology. Volume 4, Issue 1. 2005. Article 17. Department of Human Genetics and Biostatistics, University of California at Los Angeles.
13. Slatkin M. Linkage disequilibrium- understanding the evolutionary past and mapping the medical future // *Nat. Rev. Genet.* — 2008. — Jun. — 9(6). — P. 477–485.
14. Levenstein M.A., Ott J., Gordon D. Are molecular haplotypes worth the time and expense? A cost-effective method for applying molecular haplotypes // *PLoS Genet.* — 2006. — 2.
15. Мареєв В.Ю., Агеев Ф.Т., Арутюнов Г.П. и др. Национальные рекомендации ВНОК и ОССН по диагностике и лечению ХСН (III пересмотр) // *Сердечная недостаточность*. — 2010. — №1(57).
16. Функциональная диагностика в кардиологии: клиническая интерпретация: Учебное пособие / Под ред. Васюка Ю.А. — М.: Практическая медицина, 2009. — 312 с.
17. Hsieh Y.Y., Chang C.C., Tsai F.J., Hsu C.M., Lin C.C., Tsai C.H. Angiotensin I-converting enzyme ACE2350*G and ACE-240*T-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibility to endometriosis // *Mol. Hum. Reprod.* — 2005. — Jan;(1). — P. 11–14.
18. Iwai N., Ohmichi N., Nakamura Y., Kinoshita M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy // *Circulation*. — 1994. — Dec. — Vol. 90(6). — P. 2622–2628.
19. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // *Bioinformatics*. — 2005. — 21(2). — P. 263–265.
20. McNamara D.M. Pharmacogenetics in Heart Failure: Genomic markers of endothelial and neurohumoral function // *Congestive Heart Failure*. — 2004. — 10. — P. 302–308.
21. Marzia Rigolli, Mariantonietta Ciccoira, Corinna Bergamini et al. Progression of left ventricular dysfunction and remodelling under optimal medical therapy in CHF patients: role of individual genetic background // *Cardiology Research and Practice*. — 2011. — Vol. 2011; Article ID 798658
22. Haixin Lei, Ian N.M. Day, Igor Vorechovsky. Exonization of AluYa5 in human ACE gene requires mutations in both 3' and 5' splice sites and it facilitated by a conserved splicing enhancer // *Nucleic Acids Res.* — 2005. — Vol. 33(12). — P. 3897–3906.
23. Воевода М.И., Степанов В.А., Ромашенко А.Т., Максимов В.Н. Этногенетические особенности подверженности атеросклерозу в этнических группах Сибири на примере аполипопротеина Е // *Бюллетень СО РАМН*. — 2006. — №2(120). — С. 63–72.
24. Ana I Freitas, Isabel Mendonca, Maria Brion et al. RAS gene polymorphisms, classical risk factors and the advent of coronary artery disease in Portuguese population // *BMC Cardiovascular Disorders*. — 2008. — 8. — 15.
25. Nancy Martinez-Rodriguez, Carlos Posadas-Romero, Teresa Villarreal-Molina et al. Single Nucleotide Polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene are associated with essential hypertension and increased ACE enzyme levels in Mexican individuals // *PLoS One*. — 2013. — 8(5). — e65700.
26. Paolo Catarsi, Roberto Ravazzolo, Francesco Emma et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) haplotypes and cytosporine A(CsA) response: a model of the complex relationship between ACE quantitative trait locus and pathological phenotypes // *Hum. Mol. Genet.* 2005. — Aug 7. — Vol. 14(16). — P. 2357–2367.

Role of polymorphic variants of angiotensin-converting gene (*ACE*) in heart failure development

Pushkareva A.E.^{1,2}, Khusainova R.I.², Valiev R.R.², Arutyunov G.P.³, Khusnutdinova E.K.^{2*}

¹ — The Bachkir State Medical University, Ufa

² — Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, Ufa

³ — The Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

* e-mail: ekkh@anrb.ru

Chronic heart failure (CHF) is one of the high-end causes of populations disability and mortality. Considering the fundamental role of neurohormonal systems in CHF development, the current approach is the study of genes, what expression products take part in formation of different types for myocardial remodeling and CHF progression. Three polymorphic loci in *ACE* gene- *rs4343* (*2350 G>A*), *rs4291* (*240A>T*), *rs4340* (*I/D*) in 271 patient of CHF (functional class II-IV) with different types of the left ventricle (LV) remodeling and 194 conditionally healthy men and women of corresponding age, also their haplotypes were studied. Homozygous genotypes *G*G locus *rs4343* and *D*D locus *rs4340*, also haplotype, based on these two loci, *DG gene *ACE*, are significant for CHF developing and remodeling LV, considering different types. By revising haplotypes for all three polymorphic loci of *ACE* gene (*rs4291*, *rs4340* and *rs4343*), the predominance of haplotype *TDG was statistically significant for patients with marked hypertrophy LV and moderate hypertrophy LV.

Key words: remodeling of the left ventricle, chronic heart failure (CHF), angiotensin-converting enzyme gene (*ACE*), polymorphic locus, genotype, haplotype