

Кускаева А. В.¹, Никулина С. Ю.¹, Чернова А. А.¹, Аксютин Н. В.¹, Кускаев А. П.², Черкашина И. И.¹
¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ, Красноярск

² КГБУЗ «КМКБ № 20 им. И. С. Берзона», Красноярск

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА I/D ГЕНА ACE В РАЗВИТИИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, I/D полиморфизм гена ACE.

Ссылка для цитирования: Кускаева А. В., Никулина С. Ю., Чернова А. А., Аксютин Н. В., Кускаев А. П., Черкашина И. И. Роль полиморфизма I/D гена ACE в развитии фибрилляции предсердий. *Кардиология*. 2018;58(2):5–9.

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить полиморфизм I/D гена ACE, ассоциированный с фибрилляцией предсердий (ФП), для создания групп риска пациентов, подверженных развитию данного заболевания. **Материалы и методы.** Обследованы 90 пробандов с подтвержденным диагнозом ФП и 144 их родственников I, II, III степени родства, которые составили основную группу исследования. Группа контроля была сформирована из 100 здоровых лиц без сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе. Всем пациентам были проведены следующие исследования: исследование гормонов щитовидной железы (ТТГ, Т3 свободный, Т4 свободный), методы инструментальных исследований (ЭКГ, ХМ ЭКГ, ЭхоКГ, ВЭМ, ЧПСАП), молекулярно-генетический анализ. **Результаты.** Установлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа II среди пробандов с первичной ФП (30±7,2%) по сравнению с лицами контрольной группы (14±3,5%; p=0,028). Кроме того, установлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа DD среди лиц контрольной группы (36±4,8%) по сравнению с пробандами с первичной ФП (15±5,6%; p=0,014). Получено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю среди пробандов с вторичной ФП (34±6,7%) по сравнению с группой контроля (14±3,5%; p=0,004). Кроме того, было выявлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю среди лиц группы контроля (36±4,8%) по сравнению с пробандами с вторичной ФП (10±4,2%; p=0,001). **Заключение.** Установлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю среди пробандов как с первичной, так и с вторичной ФП по сравнению с лицами группы контроля. В то же время имеется статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю в группе контроля по сравнению с пробандами основной группы. Полученные данные свидетельствуют о гетерогенном характере ФП и подтверждают, что носительство гомозиготного генотипа DD может обладать условно протективным эффектом в отношении развития ФП.

Kuskaeva A. V.¹, Niculina S. U.¹, Chernova A. A.¹, Aksutina N. V.¹, Kuskaev A. P.², Cherkashina I. I.¹

¹ Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V. F. Voyno-Yasenecky, Krasnoyarsk, Russia

² City hospital № 20 named after I. S. Berzon, Krasnoyarsk, Russia

THE ROLE OF THE I/D POLYMORPHISM OF THE ACE GENE IN THE DEVELOPMENT OF ATRIAL FIBRILLATION

Keywords: atrial fibrillation; I/D ACE gene polymorphism.

For citation: Kuskaeva A.V., Nikulina S.U., Chernova A.A., Aksutina N.V., Kuskaev A.P., Cherkashina I.I.

The Role of the I/D Polymorphism of the ACE Gene in the Development of Atrial Fibrillation. *Kardiologiya*. 2018;58(2):5–9.

SUMMARY

Objective. To study associations of I/D polymorphism of the ACE gene with risk of atrial fibrillation (AF) with the aim of detecting groups of patients prone to development of this disease. **Materials and methods.** We examined 90 probands with confirmed diagnosis of AF and 144 their I, II, III degrees relatives. These families constituted a core group of our study. The control group comprised 100 relatively healthy people without history of cardiovascular diseases. Methods used in all patients included clinical examination, electrocardiography, echocardiography, Holter ECG monitoring, veloergometry, transesophageal left atrial pacing, molecular-genetic tests. **Results.** We found statistically significant predominance of genotype II homozygous carriers among probands with primary AF compared with the control group (30.0±7.2% and 14.0±3.5%, respectively; p=0.028). Homozygous carriers of DD genotype statistically significantly prevailed in the control group compared with group of probands with primary AF (36.0±4.8% and 15.0%±5.6%; p=0.014). Carriers of homozygous genotype II for common allele statistically significantly prevailed among probands with secondary AF compared with the control group (34.0±6.7% and 14.0±3.5%, respectively; p=0.004). Homozygous carriers of DD genotype for the rare allele statistically significantly prevailed among control subjects compared to probands with secondary AF (36.0±4.8% and 10.0%±4.2%, respectively; p=0.001).

Conclusion. Thus, compared with controls statistically significant preponderance of carriers of homozygous genotype II for common allele was found among probands with both primary and secondary AF. At the same time compared with probands there was a statistically significant predominance of homozygous carriers of DD genotype for the rare allele in the control group. Our findings suggest the heterogenous nature of AF and confirm that DD genotype homozygosity can be protective against the development of AF.

Фибрилляция предсердий (ФП) остается одной из наиболее распространенных и сложных аритмий в клинической практике. ФП занимает первое место среди всех аритмий и может проявляться как самостоятельное заболевание, так и как осложнение при структурно-функциональных изменениях сердца. В большинстве случаев возникновению ФП способствуют определенные сочетания полиморфизмов различных генов, поэтому изучение генов подверженности и их полиморфизма является одним из актуальных методов диагностики данного заболевания.

Развитие молекулярной медицины, генетики и транскрипционных биомедицинских исследований позволило иначе взглянуть на патогенез целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Более полное понимание молекулярных и электрофизиологических механизмов, которые лежат в основе развития ФП, будет способствовать появлению новых подходов в диагностике, лечении и профилактике заболевания.

Цель исследования: изучить полиморфизм I/D гена ACE, ассоциированный с ФП, для создания групп риска пациентов, подверженных развитию данного заболевания.

Материал и методы

Обследованы 90 пробандов с подтвержденным диагнозом ФП и 144 их родственников I, II, III степени родства. Данные семьи составили основную группу исследования. Набор пациентов осуществляли в период амбулаторного или стационарного лечения в кардиологическом отделении КГБУЗ «КМКБ №20 им. И. С. Берзона». Родственников выявляли путем их активного посещения на дому с последующим вызовом в амбулаторно-консультативное отделение и отделение ультразвуковой и функциональной диагностики КГБУЗ «КМКБ № 20 им. И. С. Берзона».

Критерии включения в исследование: женский и мужской пол, любой возраст; проживание в Красноярске; подтвержденный диагноз ФП для пробандов; подтвержденный диагноз ФП для родственников пробанда с I, II, III степенью родства; отсутствие ФП в анамнезе для родственников пробанда; способность больного выполнять необходимые процедуры; согласие пациента на исследование.

Критерии исключения: родственные связи пациента с исследователем, проживание в других регионах РФ; нежелание выполнять процедуры; отказ от включения в исследование.

Дизайн исследования сформирован согласно Национальному стандарту РФ «Надлежащая клиническая практика» (Good Clinical Practice, утвержден приказом

Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27.09.2005 №232-ст). В соответствии с Хельсинкской декларацией для проведения исследования было получено разрешение локального Этического комитета КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, а также информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования.

Согласно цели исследования все пробанды были разделены на 2 подгруппы:

1. Семьи пробандов с первичной ФП (n=40). Возникновение ФП у пробанда не имело связи с каким-либо ССЗ или другими заболеваниями, осложнением которых может стать ФП;
2. Семьи пробандов с вторичной ФП (n=50). Случаи возникновения ФП у пробандов в этих семьях имели четкую связь с каким-либо ССЗ или заболеванием, имеющим отношение к возникновению нарушения ритма сердца.

Всем обследуемым был проведен молекулярно-генетический анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При оценке полиморфных аллельных вариантов изучаемых генов у больных с ФП и их родственников для сравнения использовали контрольную группу, сформированную из здоровых лиц без ССЗ в анамнезе. Данную группу составили 100 человек, у которых также проведено молекулярно-генетическое тестирование. Участники основной групп и группы контроля были сопоставимы по полу и возрасту.

При проведении молекулярно-генетического исследования основной и контрольной групп материалом исследования служил образец ДНК, выделенный из венозной крови пациентов, для этого применяли

фенол-хлороформный метод. Для выделения ДНК использовали 5–10 мл периферической крови с последующей экстракцией фенол-хлороформом [1].

Аmplификацию фрагмента исследуемого гена проводили с помощью реактивов PCR-master mix (информация для исследуемого гена содержится в паспорте набора) и Taq-полимеразы. Сама реакция амплификации проходила в программируемом термостате с функцией «горячая крышка», при этом пробы помещали в предварительно разогретый термостат для достижения эффекта «горячего старта».

Процесс мини-секвенирования осуществляли с использованием реактивов: Extention-mix (информация, специфичная для исследуемого гена, содержится в паспорте набора); TermiPol DNA Polymerase. Мини-секвенирование проводили в программируемом термостате, при этом про-

бы помещали в предварительно разогретый термостат для достижения эффекта «горячего старта».

Процедуру дефосфорилирования проводили с использованием реактивов: фосфатаза арктических креветок (1 ед/мкл), 10·ПЦР-буфер, вода деионизированная. Процесс дефосфорилирования осуществлялся также в программируемом термостате при следующих условиях: 30 мин при температуре 37°C (инкубация), 10 мин при температуре 85°C (инактивация).

Процедуру очистки продуктов реакции катион-обменной смолой проводили при помощи реактива катион-обменной смолы, суспензированной в воде. Масс-спектрометрический анализ продуктов реакции выполняли при помощи реактива масс-спектрометрической матрицы (на основе 3-гидроксипиколиновой кислоты). По наличию в масс-спектрах продуктов реакции мини-секвенирования пиков, соответствующих ионам определенной ожидаемой молекулярной массы, выносили суждение о нуклеотидном контексте в данном положении.

Ключевым этапом данной методики является реакция мини-секвенирования. Ее суть заключается в проведении реакции амплификации с использованием олигонуклеотидного зонда, 3'-конец которого отжигается непосредственно перед нуклеотидом, в котором происходит полиморфизм. Кроме того, используется определенный набор 2'-дезоксиди- и 2',3'-дидезокситринуклеотидов (dNTP и ddNTP). ddNTP являются терминаторами амплификационной реакции, поскольку не способны создавать фосфодиэфирную связь со следующим нуклеотидом. В ходе мини-секвенирования высокоточная полимеразы удлиняет зонд комплементарно матрице, в роли которой выступает продукт ПЦР нужного участка гена. Регистрация продуктов производится на времяпролетном MALDI масс-спектрометре. Таким образом, исследуя спектр масс образца после реакции мини-секвенирования, можно определить генотип SNP для любого образца ДНК.

При определении Alu Ins/Del, полиморфизма I>D гена ACE олигонуклеотидный зонд имеет массу 5405 или 5301 дальтон, а продукты реакции 5574 дальтон – аллель D и аллель I – 5678 дальтон.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel и SPSS 22.0. При статистической обработке результатов использовали стандартный алгоритм статистических процедур [2], при этом методы статистического анализа применяли в зависимости от характера учетных признаков и числа групп сравнения. Для определения вида распределения количественных показателей использовали критерий Шапиро–Уилка. В отсутствие нормального распределения описательная статистика представлена в виде медианы и перцентилей. Для определения значимости различий при множественном сравнении применяли критерий

Крускала–Уоллиса, для попарного сравнения – критерий Манна–Уитни. При нормальном распределении показателей использована описательная статистика, представленная в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Достоверность различий нормально распределенных показателей в сравниваемых группах определяли с использованием критерия Стьюдента (критерия t) [3]. Качественные критерии представлены в виде процентных долей со стандартной ошибкой доли [4]. Для определения статистической значимости различий между качественными признаками применяли критерий χ^2 . Если ожидаемые частоты были менее 5, использовали точный критерий Фишера. Силу связи между изученными признаками определяли с помощью критерия корреляции Пирсона, при непараметрическом распределении – критерия Спирмена.

Относительный риск (ОР) заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ) [5]. ОШ рассчитывали для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития заболевания по стандартной формуле:

$$ОШ = (a \times d) / (b \times c),$$

где a – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, b – частота аллеля (генотипа) в контрольной группе, c – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных, d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. ОШ определяли с 95% доверительным интервалом (ДИ). Соответствие распределения наблюдаемых частот генотипов исследуемых генов в группе контроля, теоретически ожидаемого по равновесию Харди–Вайнберга, оценивали по критерию χ^2 . Вычисление проводили с помощью онлайн-калькулятора: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> [6]. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

С целью изучения роли полиморфизма I/D гена ACE в развитии ФП обследованы 90 пробандов с ФП, 144 их родственника I–III степени родства и 100 человек контрольной группы. Все пробанды были разделены на 2 группы в зависимости от этиологии развития ФП (первичная ФП и вторичная ФП). Результаты анализа полиморфизма I/D гена ACE среди пробандов с первичной ФП представлены ниже.

Частота гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю у пробандов с первичной ФП составила $30 \pm 7,2\%$, гетерозиготного генотипа ID – $55 \pm 7,9\%$, гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю – $15 \pm 5,6\%$. В контрольной группе преобладали лица по гетерозиготному генотипу ID – $50 \pm 5\%$. Носителей гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю оказалось $14 \pm 3,5\%$, а гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю – $36 \pm 4,8\%$.

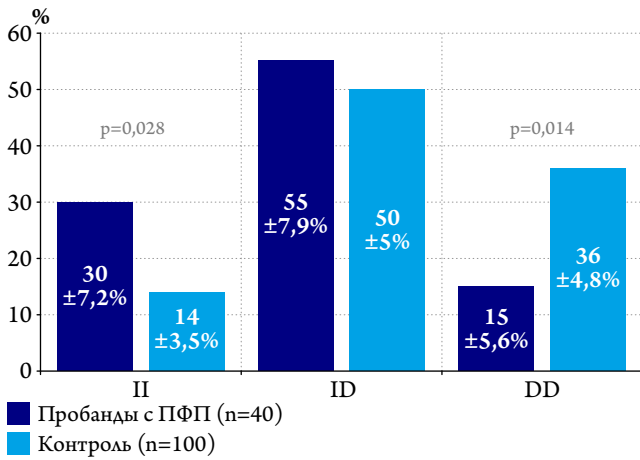


Рис. 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма I/D гена ACE среди пробандов с первичной ФП и лиц контрольной группы.

Здесь и на рис. 2: ФП – фибрилляция предсердий.
ПФП – первичная фибрилляция предсердий.

По результатам исследования установлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа II среди пробандов с первичной ФП (30±7,2%) по сравнению с лицами контрольной группы (14±3,5%; $p=0,028$). Установлено также статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа DD среди лиц контрольной группы (36±4,8%) по сравнению с пробандами с первичной ФП (15±5,6%; $p=0,014$) (рис. 1).

На рис.2 представлено распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма I/D гена ACE среди пробандов с вторичной ФП и лиц контрольной группы. При анализе распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма I/D гена ACE среди пробандов с вторичной ФП выявлено преобладание гетерозиготного генотипа ID – 56±7%. В контрольной группе также преобладал гетерозиготный генотип, его частота составила 50±5%. Частота носителей гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю среди пробандов с вторичной ФП составила 34±6,7%, в контрольной группе – 14±3,5%. Частота носителей гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю среди пробандов с вторичной ФП составила 10±4,2%, в контрольной группе – 36±4,8%.

Выявлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю среди пробандов со вторичной ФП (34±6,7%) по сравнению с группой контроля (14±3,5%; $p=0,004$). Кроме того, выявлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю среди лиц группы контроля (36±4,8%) по сравнению с пробандами с вторичной ФП (10±4,2%; $p=0,001$) (см. рис. 2). При распределении частот генотипов и аллелей I/D полиморфизма гена ACE среди боль-

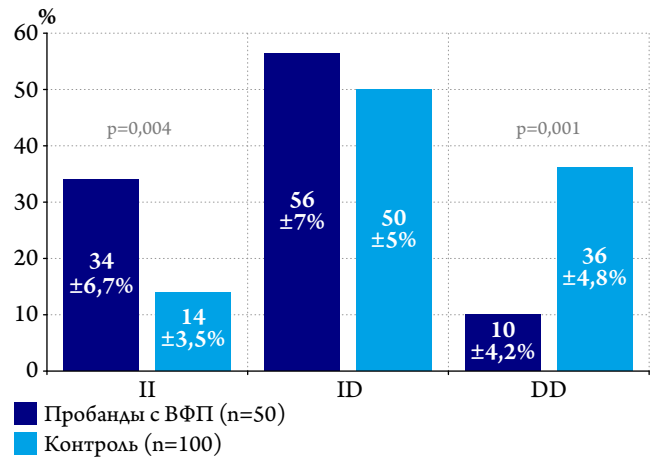


Рис. 2. Распределение генотипов гена ACE среди пробандов с вторичной ФП и лиц группы контроля.

ВФП – вторичная фибрилляция предсердий.

ных и здоровых родственников пробандов как с первичной, так и со вторичной ФП, и лиц контрольной группы статистически значимых результатов не получено.

По результатам исследования, частота гомозиготного генотипа II по распространенному аллелю среди больных пробандов с первичной и вторичной ФП статистически значимо выше, чем у лиц контрольной группы. В подгруппе пробандов с первичной ФП ОШ 2,116 для аллеля I составило при 95% ДИ от 1,250 до 3,583 ($p=0,005$), в то же время для носителей гомозиготного генотипа II по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа ID и гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю ОШ составило 2,633 при 95% ДИ от 1,091 до 6,354 ($p=0,028$). В подгруппе пробандов с вторичной ФП для аллеля I ОШ составило 2,552 при 95% ДИ от 1,558 до 4,181 ($p=0,00017$), но для носителей гомозиготного генотипа II по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа ID и гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю ОШ составило 3,165 при 95% ДИ от 1,403 до 7,137 ($p=0,004$).

В то же время выявлено статистически значимое преобладание носителей гомозиготного генотипа DD по редкому аллелю среди лиц группы контроля по сравнению с пробандами с первичной и вторичной ФП. Таким образом, можно предположить, что генотип DD обладает условно протективным свойством в отношении развития ФП.

Обсуждение

Полученные нами данные противоречат данным зарубежных ученых, по результатам исследований которых было выявлено, что аллель D ассоциирован с риском развития ФП [7, 8].

C. Fatini и соавт. изучали роль полиморфизма I/D гена ACE в развитии первичной и вторичной неклапанной ФП. В ходе исследования было выявлено существенное различие

в частоте аллеля между первичной и вторичной ФП. Аллель D гена ACE был связан с предрасположенностью к развитию первичной ФП [9]. Так, D. Darbar и соавт. в своей работе выявили преобладание D аллеля полиморфизма I/D гена ACE у пациентов с первичной ФП, что еще раз доказывает роль ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в патофизиологии ФП [10]. В ходе нескольких мета-анализов различными исследователями получена взаимосвязь полиморфизма I/D гена ACE с риском развития ФП [11, 12]. Изучалась также взаимосвязь данного полиморфизма с риском рецидива ФП после катетерной абляции [13, 14].

Полученные результаты могут быть обусловлены генетическими особенностями сибирской популяции, и это подтверждает, что ФП является гетерогенным заболеванием.

Сведения об авторах:

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ, Красноярск

Кафедра внутренних болезней №1

Никулина С. Ю. – д. м. н., проф., зав. кафедрой, проректор по учебной работе.

Чернова А. А. – д. м. н., доцент кафедры, руков. Российско-итальянской лаборатории медицинской генетики.

Кускаева А. В. – заочный аспирант кафедры.

Аксютин Н. В. – д. м. н., доцент кафедры.

Черкашина И. И. – д. м. н., проф. кафедры.

КГБУЗ «КМКБ №20 им. И. С. Берзона», Красноярск

Кускаев А. П. – врач отделения ультразвуковой и функциональной диагностики.

E-mail: alina_krsk@mail.ru

Information about the author:

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Vojno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

Alina V. Kuskaeva – graduate student of the department.

E-mail: alina_krsk@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Baruscotti M, Bucchi A., Difrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol Ther* 2005;107 (1):59–79. doi: 10.1016/j. pharmthera. 2005.01.005
- Affi A., Jeizen S. *Statistical analysis*. М.: Мир 1982;194 p. Russian (Аффи А., Эйзен С. Статистический анализ: пер. с нем. М.: Мир 1982;194 с.).
- Shabalin V.N. *Mathematical methods in the study of the genetics of multifactorial diseases*. М.: 1994; 69 p. Russian (Шабалин В. Н. Математические методы в изучении генетики мультифакториальных заболеваний. М.: 1994;69 с.).
- Flejs Dzh. *Statistical methods for the study of tables shares and proportions*. *Finansy i statistika* 1989;319 p. Russian (Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций: пер. с англ. М.: Финансы и статистика 1989;319 с.).
- Pollard D. *Handbook of Computational Statistics Methods*. *Finansy i statistika* 1982;344 p. Russian (Поллард Д. Справочник по вычислительным методам статистики: пер. с англ. М.: Финансы и статистика 1982;344 с.).
- Online calculator frequency distribution of genotypes for the Hardy-Weinberg <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>.
- Huang M., Gai X., Yang X. et al. Functional polymorphisms in ACE and CYP11B2 genes and atrial fibrillation in patients with hypertensive heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2009;47 (1):32–37. DOI: 10.1515/CCLM. 2009.023.
- Gensini F., Padeletti L., Fatini C. et al. Angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003;26 (1):295–298. doi: 10.1046/j. 1460-9592.2003.00036.
- Fatini C., Sticchi E., Gensini F. et al. Lone and secondary nonvalvular atrial fibrillation: role of a genetic susceptibility. *Int J Cardiol* 2007;120 (1):59–65. doi: 10.1016/j. ijcard. 2006.08.079.
- Darbar D., Motsinger A.A., Ritchie M.D. et al. Polymorphism modulates symptomatic response to antiarrhythmic drug therapy in patients with lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2007; 4(6):743–749. doi: 10.1016/j. hrthm. 2007.02.006.
- Ma R., Li X., Su G. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms associated with risk of atrial fibrillation: A meta-analysis of 23 case-control studies. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2015;16 (4):793–800. doi: 10.1177/1470320315587179.
- Xiao P., Ling Z., Woo K. et al. Renin-angiotensin system-related gene polymorphisms are associated with risk of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2010;160 (3):496–505. doi: 10.1016/j. ahj. 2010.06.013.

Поступила 29.12.16 (Received 29.12.16)