

¹Indywidualna Specjalistyczna Praktyka Lekarska

²Studenckie Koło Naukowe Nadciśnienia Tętniczego przy Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

³Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej i Molekularnej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

⁴Klinika Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Przemiany Materii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

Polimorfizm insercyjno-deleccyjny genu ACE a dobowa zmienność ciśnienia, albuminuria i sodowrażliwość u chorych na nadciśnienie tętnicze

Insertion-deletion polymorphism of the ACE gene, blood pressure profile, albuminuria, and sodium sensitivity in patients with arterial hypertension

Summary

Background We studied the frequency of insertion-deletion polymorphism of the ACE gene in patients with arterial hypertension and associations of this polymorphism with blood pressure profiles, albuminuria, and sodium sensitivity recognized as markers of early cardiovascular events.

Material and methods The study group consisted of 69 patients with stage I or II essential arterial hypertension according to the Polish Arterial Hypertension Society. Patients were hospitalized and were given a controlled diet in 7-day cycles containing 100–120 mmol, 10–20 mmol, and 220–240 mmol of sodium per day. 24 h urine collection was started on day 6 and 7 of the high- and low-sodium diet cycle. We measured urine volume and excretion of sodium, potassium, creatinine, and albumin. 24 h blood pressure monitoring according to ABPM was started on day 7 of the high- and low-sodium diet cycle. During each diet cycle venous blood was sampled and ARO, ALDO, sodium, potassium, and creatinine concentrations were determined using routine laboratory methods. 10 ml venous blood was obtained on a single occasion and DNA was isolated for PCR assessment of I/D polymorphism of the ACE gene.

Results A higher frequency of the DD genotype and D allele was noted in sodium-sensitive patients. During the low-sodium cycle, sodium-sensitive patients regardless of the I/D genotype demonstrated similar UAE, Ccr, UNa, UK, Uvol, mean 24 h, day and night blood pressure values, as well as nocturnal dip in blood pressure (N/D). During the high-sodium cycle, 24MAP, DMAP, NMAP and STD increased and the nocturnal dip in blood pressure decreased significantly in the genotype groups. The mean N/D value was nevertheless smaller in DD patients. UAE and Ccr increased to a greater extent during the high-sodium diet in DD patients. In DD patients as compared with ID/II patients, ARO and ALDO were modestly but significantly higher on the low-sodium diet and the rise in ARO and ALDO values was significantly suppressed on the high-sodium diet.

Conclusions

1. The deletion genotype (DD) is found more often in Caucasian sodium-sensitive hypertensive patients.
2. High-sodium diet induced a smaller nocturnal dip in blood pressure, greater albuminuria, and smaller reduction in ARO and ALDO values in DD hypertensive patients, suggesting that hypertension combined with a high-sodium diet will over a shorter period of time produce cardiovascular and renal complications in patients with the DD genotype.

key words: arterial hypertension, sodium sensitivity, variability of blood pressure, insertion-deletion polymorphism of the ACE gene, cardiovascular events
Arterial Hypertension 2006, vol. 10, no 5, pages 362–369

Adres do korespondencji: dr hab. med. Krystyna Widecka
Klinika Endokrynologii, Nadciśnienia Tętniczego
i Chorób Przemiany Materii PAM
ul. Arkońska 4, 71–455 Szczecin
tel.: (091) 431–62–41, faks: (091) 431–62–43
e-mail: widecka@o2.pl

 Copyright © 2006 Via Medica, ISSN 1428–5851

Wstęp

Chorzy na samoistne nadciśnienie tętnicze charakteryzują się zróżnicowaną odpowiedzią ciśnienia tętniczego na zmiany podaży sodu w diecie. Na tej podstawie arbitralnie dzieli się chorych na sodowrażliwych i sodoniewrażliwych. Sodobrażliwość łączy się z częstymi powikłaniami naczyniowymi i nerkowymi, co objawia się bardzo wczesnie mikroalbuminurią, brakiem nocnego spadku ciśnienia i większą zmiennością dobową ciśnienia w profilach 24-godzinnego pomiaru metodą ABPM (*ambulatory blood pressure monitoring*, automatyczny pomiar ciśnienia tętniczego).

Zainteresowanie znaczeniem genetycznych nieprawidłowości w układzie renina-angiotensyna-aldosteron u chorych na nadciśnienie tętnicze wynika z co najmniej trzech powodów. Po pierwsze, układ ten jest jednym z najważniejszych mechanizmów homeostazy organizmu, regulującym ciśnienie tętnicze krwi oraz gospodarkę wodną i elektrolitową. Po drugie, angiotensyna II pobudza rozrost i proliferację błony mięśniowej gładkiej naczyń i mięśnia sercowego. Po trzecie, istnieją leki, które są w stanie modyfikować aktywność tego układu na różnym poziomie [1–4].

Jednym z kluczowych elementów układu renina-angiotensyna jest enzym konwertujący angiotensynę (ACE, *angiotensin-converting enzyme*). U ludzi stwierdzono istnienie zmienności (polimorfizmu) insercyjno-delecyjnej nukleotydów DNA w 16. intronie genu ACE, wynikającej z obecności (insercja-I) lub braku (delecja-D) 287 par zasad w 16. intronie tego genu w prążku q23 chromosomu 17. Przejawem powyższego polimorfizmu jest występowanie genotypów homozygotycznych (insercyjny II i delecyjny DD) oraz genotypu heterozygotycznego insercyjno-delecyjnego ID. Genotyp DD wiąże się z wyższymi stężeniami ACE we krwi i w tkankach, co teoretycznie może sprzyjać nasilonemu tworzeniu angiotensyny II i zwiększonemu unieczynnianiu bradykininy z konsekwencjami takiego stanu [5–8]. Związek występowania allelu delecyjnego z rozwojem nadciśnienia tętniczego potwierdzono w badaniach doświadczalnych u szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) [9]. W badaniach u ludzi istnienie związku między genotypem DD lub występowaniem allelu D, a nadciśnieniem tętniczym budzi kontrowersje. Ostatnio sugerowano jednak, że związek taki można wykazać, badając dużą populację [10]. Wcześniej stwierdzono zależność między występowaniem genotypu DD a chorobami układu krążenia i powikłaniami nadciśnienia tętniczego. W roku 1992 Cambien i wsp. [1] opublikowali pracę wskazującą na zwiększone ryzyko zawału serca u osób z allelem

delecyjnym genu ACE. Kolejne analizy sugerowały również związek allelu delecyjnego genu ACE z przerostem mięśnia lewej komory, przebudową mięśnia sercowego po zawale i częstszym występowaniem nefropatii w przebiegu cukrzycy [2, 3, 11]. Wyniki większości badań dotyczyły jednak niewielkich grup chorych.

Celem pracy były:

1. ocena częstości insercyjno-delecyjnego polimorfizmu genu ACE w dobrze scharakteryzowanej, jednorodnej grupie chorych populacji polskiej, rasy białej, z nadciśnieniem tętniczym samoistnym sodowrażliwym i sodoniewrażliwym;

2. powiązanie występowania genotypu DD z wskaźnikami wczesnych powikłań sercowo-naczyniowych — zmiennością ciśnienia tętniczego, albuminurią i sodowrażliwością — w zależności od różnej podaży sodu w diecie.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 69 chorych (19 kobiet i 50 mężczyzn) na samoistne nadciśnienie tętnicze I stopnia (łagodne) lub II stopnia (umiarkowane) według klasyfikacji Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (PTNT) [12]. Wykluczenie nadciśnienia wtórnego ustalono w warunkach szpitalnych, stosując rutynowe badania kliniczne, biochemiczne i radiologiczne. Do badań kwalifikowano wyłącznie osoby, u których w rodzinie wystąpiły przypadki nadciśnienia tętniczego. Za obciążenie rodzinne uznano występowanie nadciśnienia tętniczego u co najmniej jednego z rodziców. Badaniami objęto wyłącznie chorych bez otyłości, bez niewydolności nerek, krążenia i wątroby oraz bez zaburzeń rytmu serca i obrzęków. Chorzy nie przyjmowali wcześniej leków hipotensyjnych, a przez 3 tygodnie poprzedzających badania także żadnych innych. Sodobrażliwość nadciśnienia tętniczego rozpoznano na podstawie kryteriów zaproponowanych przez Sullivana [13] i Bigaziego [14], według których nadciśnienie tętnicze można uznać za sodowrażliwe, gdy średnie ciśnienie tętnicze (MAP, *mean arterial pressure*) wzrasta powyżej 10 mm Hg przy zmianie niskiej podaży sodu w diecie (10–20 mmol/24h) na wysoką (220–240 mmol/24h), stosowanej przez co najmniej 5 dni. Na podstawie tych kryteriów chorych na nadciśnienie tętnicze podzielono na 2 grupy: grupa 1: chorzy na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe (SS) — 46 osób w wieku $36,1 \pm 8$ lat, BMI (*body mass index*, wskaźnik masy ciała) $23,5 \pm 0,9$ kg/m²; grupa 2: chorzy na nadciśnienie tętnicze sodoniewrażliwe (SR) — 23 osoby w wieku $23,4 \pm 0,9$ roku, BMI $23,4 \pm 0,9$ kg/m².

Wszystkich badanych szczegółowo poinformowano o sposobie oraz celu badań i wyrazili oni zgodę na ich przeprowadzenie. Uzyskano także zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej.

Badania przeprowadzono w warunkach szpitalnych u osób stosujących przez 7 dni kontrolowaną dietę, zawierającą kolejno: 100–120 mmol, 10–20 mmol, 220–240 mmol sodu na dobę. Zawartość potasu we wszystkich rodzajach diet była stała i wynosiła 40–50 mmol/24h. Przygotowanie posiłków i ich spożywanie było nadzorowane przez dietetyczkę. Przestrzeganie diety kontrolowano dobowym wydalaniem sodu w moczu. W 6. dobie spożywania diety normosodowej (100–120 mmol sodu na dobę) zakładano dobową zbiórkę moczu, w której oznaczano wydalanie sodu, potasu i kreatyniny oraz objętość wydalonego moczu. W następnym dniu badanie przeprowadzano u osób pozostających w pozycji leżącej po 8-godzinym spoczynku nocnym i będących na czczo. Pobierano krew w celu oznaczenia stężenia sodu, potasu, kreatyniny w surowicy oraz aktywności reninowej osocza i stężenia aldosteronu w osoczu, określając je jako warunki podstawowe. Następnie badani spożywali kolejno dietę niskosodową (10–20 mmol sodu), a potem wysokosodową (220–240 mmol sodu na dobę). W 6. i 7. dobie spożywania diety niskosodowej oraz wysokosodowej zakładano dobowe zbiórki moczu, w których oznaczano objętość moczu, wydalanie sodu, potasu i kreatyniny oraz wydalanie albumin; do dalszych obliczeń przyjmowano wartość średnią albuminurii z obu zbiórek. W 7. dobie każdej z diet od badanych, będących po 8-godzinym spoczynku i pozostających nadal w pozycji leżącej oraz na czczo, pobierano próbki krwi celem wykonania oznaczeń. Pobranie krwi było poprzedzone dokonaniem trzykrotnego pomiaru ciśnienia za pomocą sfigmomanometru rtęciowego. Obliczano średnie ciśnienia skurczowego (SBP, *systolic blood pressure*), rozkurczowego (DBP, *diastolic blood pressure*) oraz średnie ciśnienie tętnicze ($MAP = DBP + 1/3\{BPs-BPd\}$). O godzinie 9.00 rozpoczęto 24-godzinny pomiar ciśnienia tętniczego metodą ABPM aparatem firmy Spacelabs 90207. Pomiar ciśnienia opierał się na metodzie oscylometrycznej. Rejestrację rozpoczynano o godzinie 9.00 i kończono o tej samej porze następnego dnia. Pomiary były dokonywane co 20 minut w ciągu dnia i co 30 minut w nocy, a następnie analizowane za pomocą programu komputerowego. Za okres dzienny przyjęto godziny 6.00–22.00, za okres nocny — godziny 22.00–6.00. Obliczano średnie dobowe ciśnienie (24hMAP), dzienne średnie (DMAP, *day mean arterial pressure*), nocne średnie (NMAP, *night mean arterial pressure*). Ponadto oceniano zmienność średniego ciśnienia do-

bowego, której miarą było odchylenie standardowe (STD) ze wszystkich pomiarów w ciągu doby, oraz nocny spadek średniego ciśnienia dziennego (N/D). Określano cechę *dippers*, gdy spadek nocny średniego ciśnienia dziennego wynosił co najmniej 10%, natomiast cechę *non-dippers* przy spadku tego ciśnienia poniżej 10%, zgodnie z przyjętymi kryteriami [15].

Elektrolity (sód i potas) w surowicy i w moczu oznaczano metodą fotometrii płomieniowej; stężenie kreatyniny w surowicy i w moczu mierzono wykorzystując autoanalyzer firmy Technicon. Klirens kreatyniny endogennej obliczano, stosując standardowe wzory.

Aktywność reninową osocza (PRA, *plasma renin activity*), stężenie aldosteronu (ALDO) określano, wykorzystując zestawy RIA-Serono. Wydalanie albumin z moczem — metodą radioimmunologiczną, stosując zestawy firmy LKB.

Komórki jądrzaste krwi obwodowej uzyskiwano przez wirowanie w gradiencie osmotycznym (Gradi-sol L, Polfa-Kutno). DNA izolowano z komórek jądrzastych krwi obwodowej metodą z zastosowaniem SDS, proteinazy K i ekstrakcji fenolem [16].

Łańcuchowe reakcje polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*), a następnie trawienie enzymami restrykcyjnymi wykonywały osoby nieznające przynależności poszczególnych próbek DNA do grup badanych. Amplifikując DNA 16. intronu genu ACE metodą PCR, aby dokonać oceny polimorfizmu I/D, stosowano parę oligonukleotydów: 5'GCCCTG-CAGGTGTCTGCAGCATGT3' jako primer sensowy (ACE-s) i 5'GGATGGCTCTCCCCGCT-TGTCTC3' jako primer antysensowy (ACE-as). Produktami PCR z primerami ACE-s i ACE-as były fragmenty cDNA:

1. dla allelu D fragment o długości 319 par zasad;
2. dla allelu I fragment o długości 597 par zasad.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu Statistica (Statsoft, Inc. Stany Zjednoczone). Normalność rozkładu badano testem Shapiro-Wilka. Zależności dotyczące cech niezależnych mierzalnych o rozkładzie normalnym badano przy użyciu testów t , z lub bez oceny jednorodności wariancji (dla grup powyżej 50 przypadków). Cechy o rozkładzie nieprawidłowym badano testami nieparametrycznymi, najczęściej testem Kołmogorowa-Smirnowa. Zmienne zależne o rozkładzie normalnym badano testem t dla prób zależnych. Natomiast zmienne zależne o rozkładzie nieprawidłowym — testem znaków lub Wilcoxon. Analizę zmiennych niemierzalnych przeprowadzono testem Chi-kwadrat (χ^2) Pearsona oraz dokładnym testem Fishera dla małej liczebności grup i testem Mc Nemara (testy nieparametryczne).

Tabela I. Częstości genotypów i alleli genu enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) w grupie chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe (SS) i sodoniewrażliwe (SR)

Table I. Frequency of genotypes and alleles of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene in sodium-sensitive (SS) and sodium-resistant (SR) patients with arterial hypertension

Grupa	Częstość genotypów (%)				Częstość alleli (%)		
	DD	ID	II	p	D	I	p
SS n = 46	16 (94,1)	27 (61,4)	3 (37,5)	< 0,005	59 (75,6)	34 (56,7)	< 0,005
SR n = 23	1 (5,9)	17 (38,6)	3 (62,5)		19 (24,4)	26 (43,3)	< 0,005

$\chi^2 = 9,38$

Wyniki

W tabeli I przedstawiono rozkład częstości genotypów i alleli genu I ACE w grupie chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe i sodoniewrażliwe.

Występowanie genotypu DD stwierdzono u 17 badanych: 16 chorych sodowrażliwych (94,1%) i tylko 1 osoby sodoniewrażliwej (5,9%). Częstość allelu D u chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe wynosiła 75,6%, a u osób z nadciśnieniem sodoniewrażliwym — 24,4%. Testem χ^2 stwierdzono istotnie ($p < 0,005$) większą częstość genotypu DD i allelu D u osób sodowrażliwych. Genotyp heterozygotyczny ID stwierdzono u 34 osób: 27 (61,4%) sodowrażliwych i 17 (38,6%) sodoniewrażliwych. Natomiast genotyp II odpowiednio u 6 badanych: 3 (37,5%) SS i 3 (62,5%) SR. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w częstości allelu I u osób z nadciśnieniem tętniczym sodowrażliwym (56,7%) i niewrażliwym (43,3%).

W tabeli II porównano oznaczane parametry kliniczne i biochemiczne u chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe z genotypem DD i ID/II, pozostających na diecie normosodowej (warunki podstawowe).

Chorzy z nadciśnieniem sodowrażliwym o genotypie DD nie różnili się wiekiem i BMI w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. W warunkach diety normosodowej wykazywali podobne wydalanie sodu, potasu, objętości moczu (Uvol) oraz klirens kreatyniny (Ccr). Ponadto wartości średnie ich ciśnienia tętniczego, mierzonego tradycyjnie, nie różniły się znacząco w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. Stwierdzono u nich nieznacznie, ale znacząco ($p < 0,05$) wyższą PRA i wyższe stężenie ALDO.

Tabela II. Charakterystyka kliniczna i biochemiczna chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe z genotypem DD i genotypem ID/II genu ACE w warunkach diety normosodowej (warunki podstawowe)

Table II. Clinical and biochemical data in sodium-sensitive hypertensive patients with DD and ID/II genotype during the normal sodium diet (basal conditions)

	DD n = 16	ID/II n = 30	P
Wiek (lata)	32,2 ± 7,8	36,5 ± 8,4	NS
BMI [kg/m ²]	23,2 ± 1,0	23,6 ± 0,8	NS
SBP [mmHg]	158,0 ± 6,8	156,1 ± 10,5	NS
DBP [mmHg]	101,0 ± 3,4	101,3 ± 3,2	NS
MAP [mmHg]	120,0 ± 3,8	119,4 ± 4,9	NS
SNa [mmol/l]	141,8 ± 3,3	142,0 ± 3,2	NS
SK [mmol/l]	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,3	NS
Uvol [ml/24h]	1230 ± 206	1245 ± 220	NS
UNa [mmol/24h]	110,9 ± 6,7	112,4 ± 7,8	NS
UK [mmol/24h]	51,0 ± 4,8	50,4 ± 5,0	NS
Ccr [ml/min]	108,8 ± 6,5	104,6 ± 8,4	NS
PRA [ng/Al/ml/h]	2,80 ± 0,43	2,44 ± 0,54	< 0,05
ALDO [pg/ml]	253,4 ± 48,1	228,6 ± 40,7	< 0,05

ALDO — stężenie aldosteronu. Ccr — klirens kreatyniny. PRA — aktywność reninowa osocza; SK — stężenie kreatyniny; SNa — stężenie sodu; Uvol — objętość moczu; rozwinięcie pozostałych skrótów w tekście

Porównanie wartości ciśnienia tętniczego, a także jego zmienności i wielkości spadku nocnego w ABPM u DD i ID/II w warunkach diety niskosodowej i wysokosodowej przedstawiono w tabeli III.

W warunkach diety niskosodowej chorzy sodowrażliwi z genotypem DD i ID/II nie różnili się wartościami średniego dobowego, dziennego i nocnego ciśnienia tętniczego, a także jego spadkiem nocnym oraz zmiennością. Dieta wysokosodowa zarówno u osób z genotypem DD jak i ID/II wywoływała podobny, znaczący ($p < 0,001$) wzrost 24MAP, DMAP, NMAP i STD.

Dieta wysokosodowa istotnie ($p < 0,001$) hamowała spadek nocnego ciśnienia zarówno u chorych z genotypem DD (7,3 ± 2,8%), jak i ID/II (9,5 ± 3,2%), przy czym u tych pierwszych średnia wartość N/D była istotnie ($p < 0,05$) mniejsza u DD.

Porównanie wartości średnich (± SD) albuminurii, Ccr, dobowego wydalania sodu, potasu, objętości moczu oraz PRA i ALDO u chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe z genotypem DD i ID/II, przebywających na diecie niskosodowej i wysokosodowej, przedstawiono w tabeli IV.

Na diecie niskosodowej u osób z genotypem DD nie stwierdzono istotnych różnic w UAE, Ccr, UNa, UK,

Tabela III. Porównanie wartości średnich (\pm SD), mierzonych metodą ABPM: średniego ciśnienia dobowego (24MAP), średniego ciśnienia dziennego (DMAP), średniego ciśnienia nocnego (NMAP), spadku nocnego średniego ciśnienia (N/D), odchylenia standardowego średniego ciśnienia dobowego (STD) u chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe z genotypem DD i ID/II, przebywających na diecie niskosodowej (20) i wysokosodowej (200)

Table III. Mean values (\pm SD) measured according to ABPM: 24 h mean arterial blood pressure (24MAP), day mean arterial blood pressure (DMAP), night mean arterial blood pressure (NMAP), nocturnal dip in blood pressure (N/D), standard deviation of 24 h mean arterial blood pressure (STD) in sodium-sensitive hypertensive patients with DD and ID/II genotype during the low-sodium (20) and high-sodium (200) diet

	DD n = 16	ID/II n = 30	p
24MAP 20	107,8 \pm 5,7	110,1 \pm 5,4	NS
[mm Hg] 200	125,3 \pm 3,9*	125,4 \pm 4,9*	NS
DMAP 20	114,3 \pm 4,7	115,9 \pm 5,2	NS
[Mm Hg] 200	129,5 \pm 3,5*	130,6 \pm 4,6*	NS
NMAP 20	101,9 \pm 5,3	101,9 \pm 6,2	NS
[mm Hg] 200	120,9 \pm 4,4*	118,5 \pm 6,4*	NS
N/D 20	11,1 \pm 3,6	12,5 \pm 3,4	NS
(%) 200	7,3 \pm 2,8*	9,5 \pm 3,2*	< 0,05
STD 20	8,3 \pm 0,6	8,2 \pm 0,9	NS
[mm Hg] 200	15,1 \pm 0,6*	15,4 \pm 1,0*	NS

*p < 0,001 w porównaniu z wartościami na diecie „20”

Uvol w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. U jednych i u drugich dieta wysokosodowa wywoływała znamienne ($p < 0,001$) wzrost wydalania UAE i Ccr, ale był on istotnie ($p < 0,05$) większy u osób z genotypem DD. Wartości UNa wzrastały znamienne ($p < 0,001$), ale podobnie w obu badanych grupach. Natomiast w obu grupach nie stwierdzono istotnych różnic w UK i Uvol w tych warunkach badania.

W warunkach diety niskosodowej stwierdzono nieznacznie, ale znamienne ($p < 0,05$) wyższą PRA i ALDO u osób z genotypem DD w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. Dieta wysokosodowa wywoływała znamienne ($p < 0,001$) zahamowanie ARO i ALDO w obu grupach, ale średnie wartości tych parametrów były znamienne wyższe u osób z genotypem DD.

Dyskusja

W badaniach własnych wykazano istotnie większą częstość genotypu DD u osób sodowrażliwych w porównaniu z osobami sodoniewrażliwymi. Wcześniej ocenę polimorfizmu genu ACE u chorych na nadciś-

Tabela IV. Porównanie wartości średnich (\pm SD) albuminurii (UAE), klirensu kreatyniny (Ccr), dobowego wydalania sodu (UNa), dobowego wydalania potasu (UK), objętości moczu (Uvol) oraz aktywności reninowej osocza (PRA) i stężenia aldosteronu (ALDO) na diecie niskosodowej (20) i wysokosodowej (200) u chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe z genotypem DD i ID/II

Table IV. Mean values (\pm SD) of albuminuria (UAE), creatinine clearance (Ccr), 24 h urinary sodium excretion (UNa), 24 h urinary potassium excretion (UK), urinary volume (Uvol), plasma renin activity (PRA), and aldosterone concentration (ALDO) in sodium-sensitive hypertensive patients with DD and ID/II genotype during the low-sodium (20) and high-sodium (200) diet

	DD n = 16	ID/II n = 30	p
UAE 20	6,95 \pm 0,53	7,06 \pm 0,53	NS
[μ g/min] 200	19,84 \pm 0,69*	16,23 \pm 1,23*	< 0,05
Ccr 20	106,7 \pm 6,7	102,0 \pm 7,2	NS
ml/min 200	126,3 \pm 9,8*	112,6 \pm 11,3*	< 0,001
UNa 20	15,9 \pm 4,2	14,9 \pm 4,4	NS
mmol/24 h 200	221,0 \pm 8,4*	237 \pm 8,3*	NS
UK 20	52 \pm 4,4	52,1 \pm 4,2	NS
mmol/24 h 200	49,8 \pm 4,0	50,8 \pm 4,9	NS
Uvol 20	1100 \pm 237	1120 \pm 227	NS
ml/24 h 200	1021 \pm 140	1122 \pm 136	NS
ARO 20	4,99 \pm 0,32	4,54 \pm 0,36	< 0,05
Ng/Al/ml/h 200	1,38 \pm 0,29*	1,12 \pm 0,42*	< 0,05
ALDO 20	407,3 \pm 25,1	370,5 \pm 28,5	< 0,05
Pg/ml 200	142,6 \pm 25,5*	124,7 \pm 24,1*	< 0,05

*p < 0,001 w porównaniu z wartościami na diecie „20”

nienie tętnicze sodowrażliwe i sodoniewrażliwe dokonali badacze japońscy, stwierdzając u tych pierwszych istotnie większą częstość genotypu II [17]. Ta odmienność wyników może być związana z różnicami etnicznymi. Udowodniono, że częstość alleli D i I w poszczególnych populacjach wykazuje znaczne zróżnicowanie. Największe rozpowszechnienie allelu I wykazano u Samończyków (0,90) i Indian Yanomami (0,85), pośrednie u Japończyków (0,60–0,65) i mniejsze u przedstawicieli rasy białej (0,40) [18–21].

Polimorfizm insercyjno/delecyjny (I/D) genu kodującego konwertazę stał się w pewnym sensie modelowym obiektem badań typu analizy związku, i to w odniesieniu praktycznie do wszystkich chorób układu krążenia lub ich powikłań, w tym między innymi nadciśnienia tętniczego pierwotnego [22]. Częściowo jest to wynikiem łatwości jego rozpoznania. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji genomowego DNA, otrzymanych metodą PCR, z parą odpowiednio zaprojektowanych primerów po-

zwala na szybką identyfikację trzech możliwych genotypów, czyli II, ID, DD, a weryfikacja wstępnych wyników przy zastosowaniu amplifikacji z parą primerów swoistych dla insertu zapobiega niedoszacowaniu częstości genotypów heterozygotycznych. Po drugie, mimo iż polimorfizm I/D jest tylko jednym z wielu poznanych miejsc polimorficznych genu ACE, to ma on także istotne znaczenie funkcjonalne. Część autorów sugeruje, że w regionie delecji zlokalizowany jest 13. nukleotydowy motyw „wyciszacza” (*silencer*) ekspresji genu, to znaczy miejsce wiążące białko regulatorowe, hamujące ekspresję genu. Brak tego motywu u osób z allelem D ma prowadzić do większej ekspresji genu ACE, a w rezultacie do wyższej aktywności, tak w surowicy, jak i w tkankach [23, 24].

Inni autorzy sądzą, że intronowy polimorfizm I/D pozostaje raczej w ścisłym sprzężeniu z innym, ważnym funkcjonalnie polimorfizmem genu ACE [25]. Niezależnie od natury tego zjawiska pewnym jest fakt, że polimorfizm ten wyjaśnia blisko 27% zmienności aktywności enzymu konwertującego [26, 27]. W większości badanych populacji i grup etnicznych aktywność osoczowa ACE u osób z genotypem DD była o około 20% wyższa niż u heterozygot ID, a nawet o blisko 40% wyższa w porównaniu z homozygotami II [28–30]. Prawdopodobnie tą zależnością można wyjaśnić, stwierdzone w badaniach własnych, istotnie wyższe wartości PRA i ALDO u osób sodowrażliwych z genotypem DD, żywionych dietą normosodową, niskosodową i wysokosodową, w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. Badania na temat roli polimorfizmu I/D genu ACE w patogenezie nadciśnienia przyniosły sprzeczne wyniki. Część autorów nie znalazła żadnego związku pomiędzy polimorfizmem ACE i wysokością ciśnienia [6, 31]. Natomiast Hingorani i wsp. [32] oraz Zee i wsp. [33] wykryli znamienne korelację pomiędzy nadciśnieniem tętniczym i obecnością allelu insercyjnego. Z kolei O'Donnell i wsp. [22], prowadząc badania u ponad 3000 uczestników *Framingham Heart Study*, stwierdzili, że ryzyko nadciśnienia u mężczyzn z genotypem DD lub ID jest znamienne wyższe w porównaniu z mężczyznami o genotypie II.

Przeważa jednak pogląd, że obecność allelu D lub raczej homozygotycznego genotypu DD usposabia w niektórych populacjach nie do nadciśnienia *per se*, lecz raczej do rozwoju jego powikłań narządowych: przerostu lewej komory [34–36] czy udaru mózgu [37, 38]. Część autorów neguje istnienie takiego powiązania [39, 40]. W badaniach własnych chorych sodowrażliwych z genotypem DD i ID/II nie różnili się średnimi wartościami ciśnienia w ABPM: średniego dobowego, dziennego i nocnego, a także jego zmiennością w warunkach diety zarówno niskosodowej,

jak i wysokosodowej. Natomiast wykazano, że dieta wysokosodowa wywołuje słabszy nocny spadek ciśnienia, większą albuminurię oraz hiperfiltrację u osób z genotypem DD w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. Ponadto wykazano, że chorzy z genotypem DD charakteryzują się istotnie większą PRA i stężeniem ALDO niż osoby z genotypem ID/II. Wyniki te sugerują występowanie synergizmu między genotypem DD a tradycyjnymi czynnikami ryzyka, czyli sodowrażliwością, cechą *non-dippers*, mikroalbuminurią, pobudzeniem układu RAA. Można więc przypuszczać, że u chorych na nadciśnienie tętnicze sodowrażliwe z genotypem DD, przy długotrwałym nadciśnieniu i stosowanej przewlekle diecie bogatosodowej, wcześniej rozwinie się nefropatia nadciśnieniowa i wystąpią powikłania sercowo-naczyniowe. W aktualnych doniesieniach sugeruje się, że mechanizm, przez który allel D prowadzi do częstszych incydentów naczyniowych i uszkodzeń narządowych, związany jest z dysfunkcją śródbłonna i większą degradacją bradykininy w wyniku większej aktywności konwertazy tkankowej, z pełnymi konsekwencjami tego stanu [41, 42]. Ponadto w piśmiennictwie wykazano, że u pacjentów o genotypie DD występowało większe osoczowe stężenie PAI-1, czynnika von Willebranda i trombomoduliny, z których wszystkie są wyznacznikami zaburzeń czynności śródbłonna, niezależnymi od czynników wpływających na czynność naczynioruchową [41].

Wnioski

1. Genotyp delecyjny DD występuje istotnie częściej u osób rasy białej badanej populacji, z nadciśnieniem tętniczym sodowrażliwym.
2. Dieta wysokosodowa wywołuje znamienne słabszy nocny spadek ciśnienia, większą albuminurię, mniejszy spadek PRA i aldosteronu u chorych z nadciśnieniem sodowrażliwym o genotypie DD, co może sugerować, że przy długotrwałym nadciśnieniu i przewlekle stosowanej diecie bogatosodowej u tych chorych wcześniej rozwiną się powikłania sercowo-naczyniowe i nerkowe.

Streszczenie

Wstęp W prezentowanym badaniu oceniano częstość insercyjno-delecyjnego polimorfizmu genu konwertazy angiotensyny (ACE) w grupie chorych na nadciśnienie tętnicze oraz jego związek ze zmiennością ciśnienia tętniczego, albuminurią i sodowrażliwością,

uznanymi wskaźnikami wczesnych powikłań sercowo-naczyniowych, w zależności od podaży sodu w diecie. **Materiał i metody** Grupę badaną stanowiło 69 chorych na samoistne nadciśnienie tętnicze I stopnia lub II stopnia według klasyfikacji Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. Badania przeprowadzono w warunkach szpitalnych u osób stosujących przez 7 dni kontrolowaną dietę, zawierającą kolejno: 100–120 mmol, 10–20 mmol, 220–240 mmol sodu na dobę. W 6. i 7. dobie spożywania diety niskosodowej oraz wysokosodowej zakładano dobowe zbiórki moczu, w których oznaczano objętość moczu, wydalanie sodu, potasu i kreatyniny oraz wydalanie albumin. W 7. dobie diety niskosodowej i wysokosodowej dokonywano 24-godzinne pomiary ciśnienia tętniczego metodą ABPM. Na każdej z diet pobierano próbki krwi żyłnej celem oznaczeń rutynowymi metodami: aktywności reninowej osocza (PRA), aldosteronu (ALDO), sodu, potasu i kreatyniny. Ponadto od wszystkich badanych jednorazowo pobierano 10 ml krwi żyłnej w celu izolacji DNA, a następnie oznaczania metodą PCR polimorfizmu I/D genu ACE.

Wyniki Stwierdzono istotnie większą częstość genotypu DD i alleli D u osób sodowrażliwych. W warunkach diety niskosodowej chorzy sodowrażliwi z genotypem DD i ID/II nie różnili się albuminurią (UAE), klirensiem meatyniny (Ccr), dobowym wydalaniem sodu (UNa), dobowym wydalaniem potasu (UK), objętością moczu (Uvol) oraz wartościami średniego dobowego (MAP), dziennego (DMAP) i nocnego ciśnienia tętniczego (NMAP), a także jego spadkiem nocnym. Dieta wysokosodowa wywoływała podobny, znamieny wzrost 24MAP, DMAP, NMAP i STD oraz istotnie hamowała spadek nocnego ciśnienia, zarówno u osób z genotypem DD, jak i ID/II. Jednak średnia wartość N/D była jednak istotnie mniejsza u chorych z genotypem DD. Na diecie wysokosodowej zaobserwowano istotnie większy wzrost wydalania UAE i Ccr u DD. W warunkach diety niskosodowej stwierdzono nieznacznie, ale znamienne wyższą PRA i ALDO u osób z genotypem DD w porównaniu z osobami o genotypie ID/II. Dieta wysokosodowa wywoływała znamienne wyższe zahamowanie PRA i ALDO u osób z genotypem DD w porównaniu z ID/II.

Wnioski 1. Genotyp delecyjny DD występuje istotnie częściej u osób rasy białej badanej populacji, z nadciśnieniem tętniczym sodowrażliwym. 2. Dieta wysokosodowa wywołuje znamienne słabszy nocny spadek ciśnienia, większą albuminurię, mniejszy spadek PRA i ALDO u chorych z nadciśnieniem sodowrażliwym o genotypie DD, co może sugerować, że przy przewlekłym nadciśnieniu i długotrwanie stoso-

wanej diecie bogatosodowej u tych chorych wcześniej rozwiną się powikłania sercowo-naczyniowe i nerkowe.

słowa kluczowe: nadciśnienie tętnicze, sodowrażliwość nadciśnienia tętniczego, zmienność ciśnienia tętniczego, insercyjno-delecyjny polimorfizm genu ACE, powikłania sercowo-naczyniowe
Nadciśnienie Tętnicze 2006, tom 10, nr 5, strony 362–369

Piśmiennictwo

1. Cambien F., Poirier O., Lecerf L. i wsp. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359 (6396): 588–589.
2. Lindpainter K., Pfeiffer M.A., Kreutz R. i wsp. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 706–711.
3. Mune T., Mune T., White P.C. Apparent mineralocorticoid excess. Genotype is correlated with biochemical phenotype. *Hypertension* 1996; 27: 1193–1199.
4. Norman R.A., Dzielak D.J. Role of renal nerves in onset and maintenance of spontaneous hypertension. *Am. J. Physiol.* 1982; 243: H284–288.
5. Duru K., Duru K., Farrow S., Wang J.M., Lockette W., Kurtz T. Frequency of the deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am. J. Hypertens.* 1994; 7: 759–762.
6. Harrap S.B., Davidson H.R., Connor J.M. i wsp. The angiotensin converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 1993; 21: 455–460.
7. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., 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; 86: 1343–1346.
8. Ueda S., Elliott H.L., Morton J.J., Connell J.M. Enhanced pressor response to angiotensin II in normotensive males with deletion genotype (DD) for angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 1995; 25: 1266–1269.
9. Fukamizu A., Sugimura K., Takimoto K. i wsp. Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 11617–11621.
10. Luft F.C. Molecular genetics of human hypertension. *J. Hypertens.* 1998; 16: 1871–1878.
11. Ohishi M., Rakugi H., Ogiwara T. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 1097–1098.
12. Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze* 2003; 7: supl. A.
13. Sullivan J.M. Salt sensitivity: Definition, conception, methodology, and long-term issues. *Hypertension* 1991; 17 supl. I: 161–168.
14. Bigazzi R., Bianchi S., Baldari D., Sgheri G., Baldari G., Campese V.M. Microalbuminuria in salt-sensitive patients. *Hypertension* 1994; 23: 195–199.
15. Grupa robocza Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego: 24-godzinne automatyczne monitorowanie ciśnienia

- tętniczego krwi w diagnostyce i terapii nadciśnienia tętniczego — stan obecny i perspektywy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1993; 89: 251.
16. Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
17. Hiraga H., Oshima T., Watanabe M. i wsp. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 1996; 27: 569–572.
18. Bloem L.J., Manatunga A.K., Tewksbury D.A., Pratt J.H. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J. Clin. Invest.* 1995; 95 (3): 948–953.
19. Castellano M., Muiesan M.L., Rizzoni D. i wsp. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study. *Circulation*, 1995; 91: 2721–2724.
20. Dudley C., Keavney B., Casadei B., Conway J., Bird R., Ratcliffe P. Prediction of patient responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphism: investigation of renin-angiotensin candidate genes. *J. Hypertens.* 1996; 14: 259–262.
21. Kario K., Kanai N., Saito K., Nago N., Matsuo T., Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation* 1996; 93: 1630–1633.
22. O'Donnell C.J., Lindpaintner K., Larson M.G. i wsp. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97: 1773–1779.
23. Danser J.A.H., Schalekamp M.A., Bax W.A. i wsp. Angiotensin converting enzyme in human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92: 1387–1388.
24. Hunley T., Julian B.A., Phillips J.A. 3rd i wsp. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1996; 49: 571–577.
25. Zhu X., McKenzie C.A., Forrester T. i wsp. Localization of a small genomic region associated with elevated ACE. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 1144–1153.
26. MacKensie C.A., Julier C., Forrester T. i wsp. Segregation and linkage analysis of serum angiotensin I-converting enzyme levels: evidence for two quantitative loci traits. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57: 1426–1435.
27. Villard E., Tiret L., Visvikis S., Rakotovao R., Cambien F., Soubrier F. Identification of new polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation-linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 58: 1268–1278.
28. Foy C.A., McCormack L.J., Knowler W.C., Barrett J.H., Catto A., Grant P.J. The angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism and ACE levels in Pima Indians. *J. Med. Genet.* 1996; 33: 336–337.
29. Lee E.J.D. Population genetics of the angiotensin-converting enzyme in Chinese. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1994; 37: 212–214.
30. Nakai K., Itoh C., Miura Y. i wsp. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199–2202.
31. Schmidt S., van Hoof I.M., Grobbee D.E., Ganten D., Ritz E. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring study. *J. Hypertens.* 1993; 11: 345–348.
32. Hingorani A.D., Jia H., Stevens P.A., Hopper R., Dickerson J.E., Brown M.J. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens.* 1995; 13: 1602–1609.
33. Zee R.Y.L., Lou Y.K., Griffiths L.R., Morris B.J. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 184: 9–15.
34. Gharavi A.G., Lipkowitz M.S., Diamond J.A., Jhang J.S., Phillips R.A. Deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is independently associated with left ventricular mass and geometric remodelling in systematic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 1996; 77: 1315–1319.
35. 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; 90: 2622–2628.
36. Jeng J.R. Carotid thickening, cardiac hypertrophy, and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in patients with hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2000; 13: 111–119.
37. Doi Y., Yoshinari M., Yoshizumi H., Ibayashi S., Wakisaka M., Fujishima M. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infarction. *Atherosclerosis* 1997; 132: 145–150.
38. Kario K., Kanai N., Saito K., Nago N., Matsuo T., Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation* 1996; 93: 1630–1633.
39. Gomez-Angelats, de la Sierra A., Enjuto M. i wsp. Lack of association between ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 2000; 14: 47–49.
40. Lindpaintner K., Lee M., Larson M.G. i wsp. Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1023–1028.
41. Giner V., Poch E., Bragulat E., i wsp. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35 (cz. 2): 512–517.
42. Rossi G.P., Taddei S., Virdis A. i wsp. Exclusion of the ACE D/I gene polymorphism as a determinant of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37: 293–300.