

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ПРИ ОЦЕНКЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА И ЕГО ФАКТОРАМИ РИСКА

Максимов В. Н.¹, Орлов П. С.¹, Иванова А. А.¹, Ложкина Н. Г.², Куимов А. Д.², Савченко С. В.², Новоселов В. П.², Воевода М. И.¹, Малютина С. К.¹

Цель. Оценить использование комплексной оценки информативности в Российской популяции генетических маркеров инфаркта миокарда, идентифицированных в полногеномных ассоциативных исследованиях.

Материал и методы. Группа больных ИМ (200 человек) и контрольная группа (420 человек) были сформированы на основе популяционной выборки 45-69 летних жителей г. Новосибирска (9400 человек), которая была собрана в ходе работы по международному проекту HAPIEE. Пациенты с инфарктом миокарда, поступившие в блок интенсивной терапии ГКБ № 1 (160 человек). Лица, умершие внезапной сердечной смертью, подвергнутые судебно-медицинскому исследованию (n=285). Группа долгожителей собиралась в ходе домашних визитов и среди пациентов домов престарелых г. Новосибирска (85 человек). Геномную ДНК выделяли из венозной крови и ткани миокарда методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфизм генов тестировали с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом фирмы производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems, USA) на приборе ABI 7900HT. В исследование были взяты следующие ОНП: rs499818, rs619203, rs10757278 и rs1333049 (хр. 9), rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637.

Результаты. ОНП, которые на этапе отбора для исследования не имели существенных различий, показали на нашей популяции очень разнородные результаты. Два ОНП оказались тесно сцепленными rs10757278 и rs1333049 (хр. 9) и для дальнейшего анализа был оставлен rs1333049. Из семи других, только пять ОНП показали ассоциацию с ИМ разной степени надежности. Такие, как rs1333049 показали ассоциацию с ИМ на всех группах и подгруппах, другие только в отдельных группах, с ограничениями по полу и возрасту. rs2549513 и rs17465637 вообще оказались не ассоциированными с ИБС. Но при этом rs2549513 показал ассоциацию с показателями липидного и углеводного обмена, а также с выраженностью коронарного атеросклероза и неблагоприятным прогнозом в течение года после ИМ. Тогда как rs17465637 оказался только слабо ассоциированным с ИМТ.

Заключение. Комплексный подход к изучению роли полиморфизма весьма трудоемок, но он дает достаточную уверенность в значимости полученных результатов, в их неслучайном характере, позволяет отобрать наиболее надежные, показавшие ассоциацию не только с основным патологическим фенотипом, но и его факторами риска.

Российский кардиологический журнал 2017, 10 (150): 33–41
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-33-41>

Ключевые слова: инфаркт миокарда, однонуклеотидный полиморфизм, rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637.

¹НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск; ²ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Максимов В. Н.* — д.м.н., доцент, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, Орлов П. С. — н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, Иванова А. А. — к.м.н., м.н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, Ложкина Н. Г. — д.м.н., доцент кафедры факультетской терапии лечебного факультета, Куимов А. Д. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой факультетской терапии лечебного факультета, Савченко С. В. — д.м.н., профессор кафедры судебной медицины, Новоселов В. П. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой судебной медицины, Воевода М. И. — д.м.н., академик РАН, директор, Малютина С. К. — д.м.н., профессор, зав. лабораторией этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
 medik11@mail.ru

ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения, ВСС — внезапная сердечная смерть, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, ИМТ — индекс массы тела, КА — коронарный атеросклероз, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ОКС — острый коронарный синдром, ОНП — однонуклеотидный полиморфизм, ОХС — общий холестерин, ОШ — отношение шансов, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФВЛЖ — фракция выброса левого желудочка, ЧСС — частота сердечных сокращений, HAPIEE — Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe.

Рукопись получена 27.06.2017

Рецензия получена 30.06.2017

Принята к публикации 04.09.2017

COMPLEX EVALUATION OF THE SIGNIFICANCE OF POPULATION GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH MYOCARDIAL INFARCTION AND RISK FACTORS

Maksimov V. N.¹, Orlov P. S.¹, Ivanova A. A.¹, Lozhkina N. G.², Kuimov A. D.², Savchenko S. V.², Novoselov V. P.², Voevoda M. I.¹, Maljutina S. K.¹

Aim. To evaluate the utilization of complex significance evaluation in Russian population, of genetic markers of myocardial infarction identified in entire-genomic associative studies.

Material and methods. Group of MI patients (n=200) and control group (n=420) were created based on populational selection of 45-69 year old citizens of Novosibirsk (9400 persons), collected during the international project HAPIEE; myocardial infarction patients, admitted to intensive care unit of the Hospital № 1 (160 persons); sudden cardiac death victims, post forensic investigation (n=285). Longevity group was collected during home visits and in the nursing houses (n=85). Genomic DNA was extracted from venous blood and myocardial tissue by phenol-chloroform method. Genes polymorphism was tested with PCR real-time according to the protocol by equipment developer (TaqMan, Applied Biosystems, USA), device ABI 7900HT. For the study, the following MNP were selected:

rs499818, rs619203, rs10757278 and rs1333049 (chr. 9), rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637.

Results. Mononucleotide polymorphisms, that did not show differences at pretest stage, showed significant distinctions in the studied population. Two MNP were closely linked: rs10757278 and rs1333049 (chr. 9) so for further assessment the rs1333049 was retained. Among other seven, only five MNP showed relation with MI of various strength. Some, like the rs1333049 showed association with MI in all groups and subgroups, while the others — only in separate groups, with restriction by sex and gender. The rs2549513 and rs17465637 showed to be not associated with CHD at all, though rs2549513 showed association with lipid and glucose metabolism, as with the severity of coronary atherosclerosis and adverse prognosis for 1 year post-MI. The rs17465637 was just poorly associated with BMI.

Conclusion. Complex approach to assessment of polymorphism role is quite demanding, but provides with a high grade of insurance in the significance of the results obtained, of non-random character of the results, and makes it to choose the most credible, that have showed association not only with the main pathological phenotype, but with its risk factors.

Russ J Cardiol 2017, 10 (150): 33–41

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-33-41>

Key words: myocardial infarction, mononucleotide polymorphism, rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637.

¹SRI of Therapy and Prevention Medicine — branch of FSBSI Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SD RAS, Novosibirsk; ²FSBEI HE Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Поиск генетических маркеров повышенного риска развития распространенных заболеваний продолжается уже не одно десятилетие. Особенно активно он велся в первые годы после завершения программы “Геном человека”. Для анализа обычно отбирались ОНП (от единичных до нескольких десятков, иногда сотен) в функционально значимых генах. Один из существенных недостатков такого подхода заключается в исключении из анализа участков ДНК, содержащих не идентифицированные гены, а также генов, продукты которых, по современным представлениям, не участвуют в развитии заболевания. Потом, благодаря быстрому совершенствованию технологий массового генотипирования, получили распространение полногеномные ассоциативные исследования. Все известные в настоящее время гены занимают менее 2% от общей последовательности ДНК человека. Использование полногеномного подхода позволило найти ОНП маркеры в межгенных участках ДНК. В ведущих мировых журналах опубликован целый ряд результатов исследований, посвященных идентификации новых генетических маркеров, ответственных за наследственную предрасположенность к ИБС, выполненных на уровне полногеномного анализа [1-4]. Принципиальными общими особенностями этих исследований является анализ больших выборок пациентов и соответствующих контрольных групп (несколько тысяч индивидов), обязательное реплицирование анализа ассоциаций на независимо обследованных выборках и использование высоко разрешающих методов генотипирования, как правило, высокоплотных чипов для генотипирования по нескольким сотням тысяч генетических маркеров. В частности, был выполнен полногеномный анализ на Фремингемской когорте. Фремингемское исследование является одним из первых эталонных крупномасштабных эпидемиологических когортных проектов, направленных на динамическое наблюдение за распространенностью сердечно-сосудистых заболеваний в популяции, оценку их ассоциации с различными факторами риска [2]. В 2007г был обнаружен локус на коротком плече 9-й хромосомы (9p21), ассоциированный с инфарктом миокарда [4]. В последующие годы исследования генетической компоненты предрасположенности к ИБС продолжались на разных этнических группах [5-7]. До сих пор, спустя 10 лет после первой публикации, нет еди-

ного мнения о вкладе в риск развития ИБС даже локуса 9p21. Так, в Корею в 2008г Shen GQ, et al. показали ассоциацию локуса 9p21 с ИБС, однако в 2016г Lee CJ, et al. пришли к выводу, что при проспективном наблюдении маркер rs1333049 оказался не связанным с исходами [8]. Кроме того, до сих пор неясны механизмы реализации замен в нуклеотидной последовательности этого участка ДНК в патологический фенотип. Когда исследователь имеет дело с изменением участка ДНК, кодирующего структуру белка-фермента, задача по оценке последствий такого изменения значительно упрощается: можно оценить количество белка и его функциональные свойства в зависимости от генотипа. В случае же с межгенным промежутком получается, что известно изменение в последовательности ДНК и известен фенотип, а о механизме реализации одного в другое остается только строить гипотезы. Если не стоит цель использовать этот участок ДНК как мишень для неких терапевтических воздействий, то для использования ОНП в качестве маркера повышенного риска развития того или иного патологического фенотипа совершенно необязательно знать механизм реализации. Более важно убедиться, что маркер является полиморфным в нашей этнической группе и ассоциирован с изучаемым фенотипом, поскольку ни то, ни другое, не гарантировано априори. Маркер, который работает в Западной Европе, может оказаться мономорфным в русской популяции или со слишком низкой частотой “аллеля риска” или не играть роль для значимого повышения риска развития заболевания в русской популяции. Помимо обычных реплицирующих исследований в поисках ответа на вопрос о роли того или иного маркера в развитии заболевания в нашей популяции может помочь комплексный подход к оценке его информативности в российской популяции. Это и исследования случай-контроль с основным фенотипом, и исследования патогенетически близких фенотипов, факторов риска, исследования в проспективном дизайне с регистрацией новых случаев и оценкой прогностической ценности маркера. Если же мы предполагаем заметный вклад в развитие заболевания, являющегося одной из основных причин смертности населения, то — исследования частот генотипов и аллелей в разных возрастных группах (от подростков до стариков). Отчасти такой подход реализован нами для оценки нескольких мар-

керов повышенного риска развития ИБС по данным зарубежных полногеномных ассоциативных исследований.

Материал и методы

1) Группа больных инфарктом миокарда и контрольная группа (подобранная по полу и возрасту, отношение 1:2) были сформированы на основе популяционной выборки 45-69-летних жителей Октябрьского и Кировского районов г. Новосибирска (9400 человек), которая была собрана НИИ терапии СО РАМН в ходе работы по международному проекту НАPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe). Программа исследования включала следующее: измерение артериального давления, антропометрия (рост, вес, объем талии, бедер), социально-демографические характеристики, опрос о курении, потреблении алкоголя (частота и типичная доза), уровне физической активности, оценку липидного профиля (общий холестерин; триглицериды, холестерин липопротеидов высокой плотности), опрос на выявление стенокардии напряжения (Rose), ЭКГ покоя в 12 отведениях. Выборка больных инфарктом миокарда 200 человек (мужчины 129, женщины 71), контрольная выборка без признаков ИМ 420 человек (мужчины 270, женщины 150). При формировании группы больных использовались эпидемиологические критерии ИМ на основе кодирования ЭКГ изменений по Миннесотскому коду, опросника Rose и документированного инфаркта миокарда в анамнезе: определенный инфаркт миокарда (М.К. 1-1 — 1-2-7), возможный инфаркт миокарда (М.К. 1-2-8 — 1-3), документированный инфаркт миокарда в анамнезе [9].

2) В исследование были включены пациенты с инфарктом миокарда, поступившие в блок интенсивной терапии городской клинической больницы № 1 (2009-2010гг) 160 человек (113 мужчин и 47 женщин). Средний возраст мужчин был $56,2 \pm 5,2$ года, женщин — $62,1 \pm 5,3$ года. Диагноз ИМ устанавливался по совокупности критериев, разработанных Европейским обществом кардиологов и Американской коллегией кардиологов (2000), включающих: а) типичный болевой приступ, б) изменения ЭКГ в двух и более последовательных отведениях (высокоамплитудный Т, отрицательный Т, подъем сегмента ST, патологический Q, депрессия сегмента ST, наличие QR), в) динамические изменения в уровне ферментов (КФК, КК-МВ, ТнТ, ТнI).

3) В период с 1999 по 2012гг был сформирован банк ДНК лиц, умерших внезапной сердечной смертью ($n=285$, средний возраст — $53,2 \pm 8,8$ года, мужчины составили 69,9%, женщины 30,1%). ДНК была выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда внезапно умерших жителей Октябрьского района г. Новосибирска, подверг-

нутых судебно-медицинскому исследованию (без морфологических изменений характерных для инфаркта миокарда, дилатационной и гипертрофической кардиомиопатий и др.). С учетом ограниченной информации о времени развития фатального события в исследуемую группу включены случаи смерти, развившейся в течение одного часа или при отсутствии свидетелей смерти в течение не более 24 часов с момента возникновения первых симптомов и расцененных по данным аутопсии как смерть сердечного генеза.

4) Группа долгожителей собиралась в ходе домашних визитов и среди пациентов домов престарелых г. Новосибирска. Всего генотипировано 85 человек: 43 мужчины и 42 женщины. Возраст 90-105 лет. Средний возраст $91,89 \pm 1,72$ г.

Протоколы всех исследований, включенных в настоящий анализ, были одобрены Этическими комитетами учреждений-исполнителей.

Геномную ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфизм генов тестировали с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом фирмы производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems, USA) на приборе ABI 7900HT. В исследование были взяты следующие ОНП: rs499818 (хр. 6), rs619203 гена *ROS1*, rs10757278 и rs1333049 (хр. 9), rs1376251 гена *TAS2R50*, rs2549513 (хр. 16), rs4804611 гена *ZNF627* и rs17465637 гена *MIAF3*.

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ SPSS 11.5. Первым этапом определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых ОНП в исследуемых группах, потом оценивали соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга в контрольной группе (по критерию хи-квадрат). Сравнение уровня таких показателей, как рост, масса тела, индекс массы тела, артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое), частота сердечных сокращений, общий холестерин, холестерин липопротеидов низкой плотности, холестерин липопротеидов высокой плотности, триглицериды, индекс атерогенности, глюкоза крови, у носителей разных генотипов проводили после проверки нормальности распределения этих признаков по тесту Колмогорова-Смирнова. Если признак отвечал критериям нормального распределения, то использовали однофакторный дисперсионный анализ. Достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью t-теста для двух независимых выборок. В случае, если изучаемый признак не удовлетворял критериям нормального распределения, сравнение уровня этого признака у носителей разных генотипов проводилось с помощью теста Крускала-Уоллиса, достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли

Таблица 1

Частоты генотипов ОНП в группе больных инфарктом миокарда и в контрольной группе

ОНП	Генотипы	Геронты		Контроль		Популяционный ИМ		Клинический ИМ		Внезапная смерть	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
rs17465637	AA	8	9,4	30	7,4	20	10,1	13	8,2	13	4,6
	CA	29	34,1	167	41	80	40,6	63	39,6	121	43,2
	CC	48	56,5	210	51,6	97	49,3	83	52,2	146	51,2
rs619203	CC	8	9,5	26	6,5	20	10,1	15	9,8	20	7,2
	CG	38	45,2	174	43,8	68	34,3	70	45,8	133	47,7
	GG	38	45,2	197	49,6	110	55,6	68	44,4	126	45,1
rs4804611	AA	48	57,8	226	54,1	107	54	95	59,7	167	58,6
	AG	30	36,1	173	41,4	81	40,9	58	36,5	103	36,1
	GG	5	6,0	19	4,5	10	5,1	6	3,8	15	5,3
rs2549513	AA	61	73,5	228	69,2	140	72,9	101	63,5	195	69,4
	AC	18	21,7	116	27,6	49	24,6	51	32,1	82	29,2
	CC	4	4,8	12	2,9	3	1,9	7	4,4	4	1,4
rs1376251	CC	35	41,7	214	51,6	99	50,5	73	46,2	122	46,2
	CT	43	51,2	163	39,3	79	40,3	66	41,8	110	41,7
	TT	6	7,1	38	9,2	18	9,2	19	12	32	12,1
rs1333049	CC	12	14,1	75	18	58	26,6	49	31	68	24,7
	GC	45	52,9	230	55,1	86	43,9	81	51,3	149	54,2
	GG	28	32,9	112	26,9	52	26,5	28	17,7	58	21,1
rs499818	AA	1	1,2	32	7,6	6	3	8	5,1	18	6,3
	AG	31	36,9	147	35	82	41,2	52	33,3	117	40,9
	GG	52	61,9	241	57,4	111	55,8	96	61,5	151	52,8

с помощью теста Манна-Уитни для двух независимых выборок. Ассоциация ОНП с факторами риска проверялась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц для сравнения выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Относительный риск заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ).

Результаты и обсуждение

Частоты генотипов rs17465637, rs2549513, rs1376251, rs499818, rs619203 в контрольной группе находятся в равновесии Харди-Вайнберга. Распределение частот генотипов rs1333049 и rs4804611 в контрольной группе отклонено от равновесия Харди-Вайнберга ($\chi^2=5,22$ и $\chi^2=3,91$, соответственно). При этом, в возрастной группе до 55 лет частоты генотипов rs1333049, rs4804611 находятся в равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,95$, $\chi^2=0,56$), а в группе старше 50 лет возникают отклонения от него. Это свидетельствует о выбывании “генотипов риска” из популяции с возрастом.

rs1333049 и rs10757278, расположенные на 9-й хромосоме, в нашем исследовании были полностью сцеплены [10]. Вследствие этого, нами представлен один из них, а именно rs1333049. В 2011г в исследовании PAGE (США) полиморфизмы rs1333049 и rs10757278

были проверены на корреляцию по неравновесному сцеплению в двух группах исследуемых, коэффициент корреляции составил 0,85 и более [11]. Ассоциация с ИБС была показана для rs1333049 в исследовании в США и Португалии, где CC генотип полиморфизма rs1333049 был ассоциирован с повышенным риском ИБС [12-14]. Кроме того, носители CC генотипа имели повышенный уровень триглицеридов и холестерина в крови [15]. По данным Ellis, et al. (2010) этот ОНП ассоциирован с ранним началом ИБС. А согласно результатам, полученным Buyschaert, et al. (2010) еще и с повторным ИМ и сердечной смертью после острого коронарного синдрома [15, 16].

В нашем исследовании rs1333049 ассоциирован с популяционным ИМ (p=0,003) и с клиническим ИМ (p=0,001) (табл. 1). Аналогичные частоты генотипов и аллелей rs1333049 получены в группе клинического ИМ (500 человек), сформированной на базе двух ведущих кардиологических клиник г. Красноярска [17]. В популяционной выборке отношение шансов иметь ИМ для носителей генотипа CC повышено почти в 2 раза, ОШ =1,9 (95% ДИ 1,3-2,9; p=0,002), носительство генотипа CG является протективным фактором в отношении развития ИМ ОШ =0,6 (95% ДИ 0,5-0,9; p=0,009). rs1333049 ассоциирован с частотой сердечных сокращений (p=0,007, в тесте Крускала-Уоллиса): у носителей генотипа GG она ста-

Таблица 2

Частоты генотипов ОНП у мужчин в группе больных инфарктом миокарда и в контрольной группе

ОНП	Генотипы	Геронты		Контроль		Популяционный ИМ		Клинический ИМ		Внезапная смерть	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
rs17465637	AA	4	9,3	17	6,4	12	9,5	9	8,0	10	5,2
	CA	17	39,5	109	42,3	54	42,9	49	43,8	80	41,9
	CC	22	51,2	138	52,3	60	47,6	54	48,2	101	52,9
rs619203	CC	4	9,5	20	7,9	17	13,3	14	13,1	12	6,2
	CG	18	42,9	102	40,3	38	29,9	49	45,8	91	47,4
	GG	20	47,6	131	51,8	72	56,7	44	41,1	89	46,4
rs4804611	AA	22	52,4	148	55,2	72	56,7	72	64,3	118	59,9
	AG	18	42,9	108	40,3	51	40,2	37	33,0	68	34,5
	GG	2	4,8	12	4,5	4	3,1	3	2,7	11	5,6
rs2549513	AA	33	78,6	192	71,9	94	75,2	68	60,7	138	71,1
	AC	7	16,7	69	25,8	29	23,2	40	35,7	53	27,3
	CC	2	4,8	6	2,2	2	1,6	4	3,6	3	1,5
rs1376251	CC	19	45,2	129	48,5	67	53,2	51	45,9	84	45,9
	CT	23	54,8	112	42,1	45	35,7	49	44,1	79	43,2
	TT			25	9,4	14	11,1	11	9,9	20	10,9
rs1333049	CC	6	14,0	45	16,9	44	35,2	34	30,6	49	26,2
	GC	23	53,5	151	56,8	56	44,8	52	46,8	98	52,4
	GG	14	32,6	70	26,3	25	20	25	22,5	40	21,4
rs499818	AA	1	2,4	26	9,7	4	3,1	3	2,8	14	7,1
	AG	12	28,6	95	35,3	53	41,4	36	33,0	75	38,3
	GG	29	69,0	148	55	71	55,5	70	64,2	107	54,6

статистически значимо выше, чем у носителей генотипа CG ($p=0,002$, в тесте Манна-Уитни). В группе с клиническим ИМ у носителей генотипа CC фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ) самая высокая по сравнению с носителями двух других генотипов ($p=0,034$). При разделении по полу оказалось, что у мужчин статистически значимых различий нет. А у женщин, наоборот, различия оказались более выраженными и статистически значимыми, $p=0,001$ [18]. Кроме того, в группе с клиническим ИМ по результатам коронарной ангиографии выявлена ассоциация rs1333049 с многососудистым поражением коронарных артерий ($p<0,001$). Отношение шансов многососудистого поражения коронарных артерий у носителей генотипа GG в 5,4 раза меньше, чем у носителей аллеля C [19]. Найдены статистически значимые различия по частотам аллелей rs1333049 в группе ВСС и контрольной группе ($p=0,024$). В группе ВСС наблюдается увеличение доли гомозиготных генотипов CC rs1333049 по сравнению с контрольной группой ($p=0,05$). Отношение шансов ВСС у мужчин-носителей генотипа CC полиморфизма rs1333049 в 1,7 раз выше, чем в контрольной группе (95% ДИ 1,1-2,8, $p=0,019$) (табл. 2). Достоверных различий между контролем в целом и геронтами по частотам генотипов rs1333049 — нет. Однако, если посмотреть частоту генотипа CC в исследуемых группах (табл. 1), то прослеживается четкая динамика ее

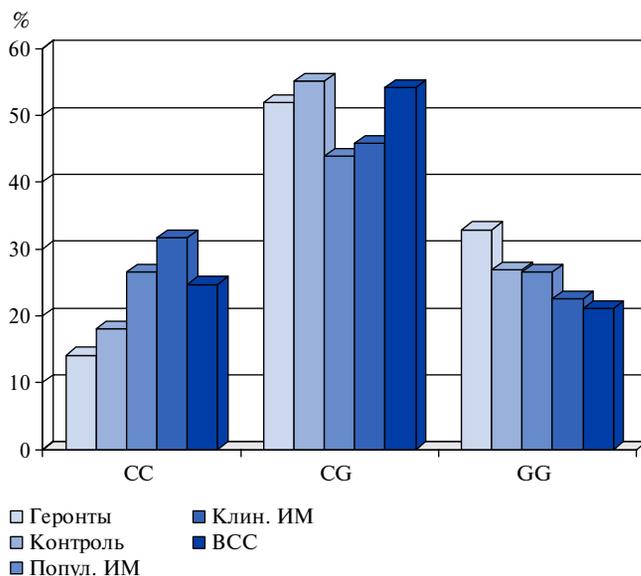


Рис. 1. Частоты генотипов rs1333049 в изучаемых группах.

убывания: клинический ИМ, популяционный ИМ, контроль, геронты (рис. 1). То есть “генотип риска” CC rs1333049, ассоциированный с ИМ, ВСС, факторами риска ССЗ “выбывает” из популяции с возрастом. Такой комплексный подход к изучению роли полиморфизма, конечно, весьма трудоемок, но он дает достаточную уверенность в значимости получен-

Таблица 3

Частоты генотипов ОНП у женщин в группе больных инфарктом миокарда и в контрольной группе

ОНП	Генотипы	Геронты		Контроль		Популяционный ИМ		Клинический ИМ		Внезапная смерть	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
rs17465637	AA	4	10,3	13	9,1	8	11,3	4	8,5	3	3,6
	CA	12	30,8	58	40,6	26	36,6	14	29,8	40	48,2
	CC	23	59,0	72	50,3	37	52,1	29	61,7	40	48,2
rs619203	CC	4	9,8	6	4,2	3	4,2	1	2,2	7	8,6
	CG	19	46,3	72	50	30	42,3	21	45,7	39	48,1
	GG	18	43,9	66	45,8	38	53,5	24	52,2	35	43,2
rs4804611	AA	26	65,0	78	52	35	49,3	23	48,9	45	54,9
	AG	11	27,5	65	43,3	30	42,3	21	44,7	33	40,2
	GG	3	7,5	7	4,7	6	8,5	3	6,4	4	4,9
rs2549513	AA	27	67,5	96	64,4	46	68,7	32	68,1	54	66,7
	AC	11	27,5	47	31,5	20	29,9	12	25,5	26	32,1
	CC	2	5,0	6	4	1	1,5	3	6,4	1	1,2
rs1376251	CC	15	36,6	85	57	32	45,7	22	46,8	34	45,3
	CT	20	48,8	51	34,2	34	48,6	17	36,2	31	41,3
	TT	6	14,6	13	8,7	4	5,7	8	17,0	10	13,3
rs1333049	CC	6	14,6	30	19,9	14	19,7	15	31,9	17	20,7
	GC	21	51,2	79	52,3	30	42,3	29	61,7	50	61,0
	GG	14	34,1	42	27,8	27	38	3	6,4	15	18,3
rs499818	AA			6	4	2	2,8	5	10,6	4	4,8
	AG	19	45,2	52	34,4	29	40,8	16	34,0	38	45,2
	GG	23	54,8	93	61,6	40	56,3	26	55,3	42	50,0

ных результатов. При проспективном наблюдении за группой клинического ИМ в г. Красноярске выявлена ассоциация аллеля С rs1333049 с частотой повторного острого коронарного синдрома (ОКС) в отдаленном периоде наблюдения (6, 12, 24 месяца) у больных ИМ, не подвергавшихся чрескожному коронарному вмешательству [17].

rs499818 расположен на коротком плече 6-й хромосомы (6p24.1). Согласно данным Фремингемского исследования этот ОНП ассоциирован с “атеросклеротическими сердечно-сосудистыми заболеваниями (ИМ, инсульт, фатальная ИБС)” [2]. В 2011г в большом мультиэтническом проспективном исследовании (PAGE, США) была подтверждена ассоциация этого ОНП с новыми случаями ИБС [11]. В нашей популяционной выборке отношение шансов для носителей генотипа AA иметь ИМ равно 0,4 (95% ДИ 0,2-0,9; $p=0,03$), по сравнению с носителями двух других генотипов. Условно протективный эффект носительства генотипа AA в отношении ИМ остается значимым у мужчин, как в группе популяционного, так и клинического ИМ (табл. 1 и 2). Но в группе женщин старше 50 лет с повышенным риском развития ВСС ассоциирован генотип AG rs499818 ($p=0,009$, OR =2,4, 95% CI 1,3-4,6) [10]. У мужчин из контрольной группы отмечено повышение индекса массы тела (ИМТ) в ряду генотипов GG, AG, AA. У носителей генотипа GG ИМТ достоверно меньше по сравнению с носителями двух других генотипов ($p=0,028$). Отно-

шение талия/бедро у мужчин из контрольной группы выше у гетерозигот по сравнению с носителями двух других генотипов ($p=0,05$). Ассоциации rs499818 с ФВЛЖ в общей группе клинического ИМ — не обнаружено. При разделении по полу у женщин ФВЛЖ повышается в ряду генотипов AA, AG, GG ($p=0,05$) [18]. А по результатам коронарной ангиографии, в группе с клиническим ИМ выявлена ассоциация большего объема атеросклеротического поражения коронарных артерий у пациентов с генотипом AA относительно носителей аллеля G ($p=0,046$) [19]. То есть, получаются неоднозначные результаты: с одной стороны, носительство генотипа AA встречается реже в группе с популяционным ИМ, с другой — у носителей этого генотипа в группе клинического ИМ чаще выявляется многососудистое поражение коронарного русла. У геронтов генотип AA встречается реже, чем во всех остальных группах — 1,2%. Таким образом, если сопоставить все данные, результаты проверки этого ОНП оказываются весьма противоречивыми, особенно, на фоне результатов такой же проверки rs1333049, описанных выше.

rs619203 гена *ROS1* (MIM 165020) расположен на длинном плече 6-й хромосомы (6q22). В США в 3-этапном исследовании была показана ассоциация этого ОНП с ИМ [20]. Однако, позднее в Германии [21] и в США [1] не обнаружили ассоциации rs619203 с ИМ. В нашей популяционной выборке носители генотипа CG реже встречаются в группе с ИМ,

по сравнению с группой контроля, ОШ =0,67 (95% ДИ 0,47-0,96, CG vs. CC+GG, $p=0,027$). В тесте Крускала-Уоллиса выявлена ассоциация генотипов rs619203 с объемом бедер ($p=0,038$) и глюкозой ($p=0,037$). У носителей генотипа CC объем бедер ($p=0,011$), ИМТ ($p=0,05$), ОХС ($p=0,019$), и ХС ЛПВП ($p=0,046$) оказались меньше, по сравнению с носителями двух других генотипов. Пульсовое АД ($p=0,023$) и глюкоза ($p=0,016$) достоверно выше в группе носителей генотипа GG, по сравнению с группой носителей двух других генотипов. При анализе результатов исследования клинического ИМ в г. Красноярске показано, что генотип CC rs619203 можно рассматривать как генетический предиктор ИМ, не зависящий от “традиционных” факторов риска и отягощенного семейного анамнеза [22]. В группе клинического ИМ г. Новосибирска тоже есть тенденция к накоплению носителей генотипа CC, однако она не достигает уровня статистической значимости, вероятно, из-за меньшего объема группы. При разделении по полу выявляются различия: в контроле у мужчин частота генотипа CC 7,9%, у женщин — 4,2%, а у больных с ИМ они больше — 13,1% у мужчин (табл. 2) и 2,2% у женщин (табл. 3). Важно отметить, что тенденции противоположные: у мужчин в группе с ИМ носителей генотипа CC больше чем в контроле в 1,6 раза, а у женщин меньше, чем в контроле, в 1,9 раза. Это иллюстрация целесообразности анализа с разделением по полу. То же касается и возраста: когда анализируется выборка, состоящая из лиц широкого возрастного диапазона, в случае возраст-зависимого заболевания. Любая граница, разделяющая непрерывный ряд значений условна, но, тем не менее, клиницистами уже давно ИМ до 55 лет определяется, как преждевременный. Чем раньше произошел ИМ, тем сильнее он отличается по этиологической основе от ИМ в старшем возрасте.

rs4804611, ген *ZNF627* расположен на коротком плече 19-й хромосомы (19p13.2). В США в 3-этапном исследовании была показана ассоциация этого ОНП с ИМ [20]. Потом в Японии в 2008г она была подтверждена [23]. Позднее в Германии [21] и США [1] не обнаружили ассоциации rs4804611 с ИМ. Мы при разделении группы клинического ИМ по возрасту обнаружили ассоциацию rs4804611 с ИМ в виде повышения шансов развития ИМ в старшей возрастной группе (55 лет и старше) для носителей генотипа AA ОШ =1,63 (95% ДИ 1,03-2,45, $p=0,04$, AA vs AG+GG). При анализе ассоциации ФВЛЖ с rs4804611 обнаружено достоверное различие среднего уровня ФВЛЖ у носителей разных генотипов rs4804611 ($p=0,046$). ФВЛЖ повышается в ряду генотипов AA, AG, GG. У носителей генотипа GG она достоверно выше, чем у носителей двух других генотипов ($p=0,027$) [18]. При проспективном наблюдении 280 больных острым коронарным синдромом (ОКС) в г. Новосибирске

в течение года фиксировались “твердые конечные точки” (кардиоваскулярная смерть, госпитализация в связи с повторным ишемическим событием, повторная реваскуляризация). В группе с неблагоприятным прогнозом достоверно чаще встречался генотип GG rs4804611 (9,1% vs 1,8%), ОШ =5,57 (95% ДИ 1,35-22,96); достоверность различий сохранилась у мужчин ($p=0,021$) [24].

rs1376251 гена *TAS2R50*, (MIM 609627) расположен на коротком плече 12-й хромосомы (12p13.2). Оценка механизмов влияния замены нуклеотидов в цепи ДНК усложняется тем, что согласно базе данных NCBI Reference Assembly, этот ОНП входит в последовательности генов PRR4 (MIM 609607) и PRN1 (MIM 168730). В Германии [21] и США [1] не обнаружили ассоциации rs1376251 с ИМ, хотя в более раннем 3-этапном исследовании, выполненном в США, на всех трех этапах была показана ассоциация этого ОНП с ИМ [20]. В нашем исследовании ассоциации rs1376251 с популяционным ИМ без разделения по полу не обнаружено. Но у женщин-носительниц генотипа СТ отношение шансов иметь ИМ равно 1,8 (95% ДИ 1,1-3,2, $p=0,03$), по сравнению с носительницами двух других генотипов. В нашей выборке в целом, в тесте Крускала-Уоллиса выявлена ассоциация генотипов rs1376251 с глюкозой ($p=0,048$). У мужчин с популяционным ИМ этот ОНП ассоциирован с ХС ЛПВП ($p=0,002$). У женщин в контрольной группе выявлена ассоциация с частотой сердечных сокращений ($p=0,044$), а у женщин с ИМ — с отношением талия/бедра ($p=0,006$) и триглицеридами ($p=0,014$). В модель для многофакторного прогнозирования отдаленных исходов ОКС со стойким подъемом сегмента ST на группе пациентов с ИМ вошли: сахарный диабет, ФВЛЖ, высокочувствительный С-реактивный протеин, генотип по полиморфизму rs1376251 [25].

rs2549513, ген *MAF*, расположен на длинном плече 16-й хромосомы (16q23.2). Согласно данным Фремингемского исследования этот ОНП ассоциирован с ИБС (ИМ, фатальная ИБС) [2]. В США в исследовании RAGE была подтверждена ассоциация этого ОНП с новыми случаями ИБС [11]. Однако, на группах ИМ, сформированных в Новосибирске и Красноярске, ассоциация rs2549513 с ИМ не обнаружена. В нашей популяционной выборке выявлена ассоциация генотипов rs2549513 с ОХС ($p=0,042$) и индексом атерогенности ($p=0,015$). У носителей генотипа AA достоверно ниже уровень глюкозы ($p=0,020$), ОХС ($p=0,012$), ХС ЛПВП ($p=0,049$), индекс атерогенности ($p=0,004$) по сравнению с носителями двух других генотипов. По результатам коронарной ангиографии в группе с клиническим ИМ в Новосибирске обнаружена ассоциация rs2549513 со степенью поражения коронарных артерий у мужчин ($p=0,045$) за счет большего объема поражения у носителей мутантного аллеля С (ОШ

Таблица 4

Ассоциации ОНП с фенотипами

Фенотип	rs1333049	rs499818	rs619203	rs4804611	rs1376251	rs2549513	rs17465637
Популяционный ИМ	+	+	+		+		
Клинический ИМ	+	+	+	+			
ВСС	+	+					
ЧСС	+				+		
Пульсовое АД			+				
ФВЛЖ	+	+		+			
КА	+	+				+	
Прогноз после ИМ	+			+	+	+	
ИАТЕР						+	
ХС ЛПНП						+	
ХС ЛПВП			+		+		
ОХС			+			+	
ТГ					+		
Глюкоза			+		+	+	
Объем бедер			+				
Отношение талия/бедра		+			+		
ИМТ		+	+				+

=3,4, 95% ДИ 1,1-10,4). Для группы в целом и у женщин статистически значимых различий не выявлено [19]. При проспективном наблюдении 280 больных ОКС в г. Новосибирске в течение года оценивался прогноз. При анализе частот генотипов rs2549513 выявлены достоверные различия между группами с благоприятным и неблагоприятным прогнозом (p=0,02). В группе с благоприятным прогнозом достоверно чаще встречался генотип AA (70,6% vs 53%), ОШ =0,47 (95% ДИ 0,26-0,85). В группе с неблагоприятным прогнозом достоверно чаще встречался гетерозиготный генотип AC, ОШ =2,32 (95% ДИ 1,28-4,20, p=0,007). При разделении по полу достоверность различий сохранилась только у мужчин (p=0,008) [24].

rs17465637, ген *MIA3*, расположен на длинном плече 1-й хромосомы (1q41). ИМТ в контрольной группе мужчин повышается в ряду генотипов CC, AC, AA (p=0,046). Нами не обнаружено ассоциации rs17465637 с ВСС, популяционным и клиническим ИМ, его осложнениями и прогнозом, ни в группах в целом, ни при разделении по полу и возрасту. Согласно результатам большого проспективного исследования 2010г, ассоциация этого ОНП с ИМ тоже не обнаружена [12], хотя по данным мета-анализа 14 исследований (57916 пациентов) была показана ассоциация этого ОНП с ИБС и липидемией [26]. Вероятно, ассоциация этого ОНП с ИБС сравнительно слабая и поэтому для обнаружения требуются значительные по объему группы больных и контроля, либо в нашей популяции этот маркер входит в другой блок сцепления, поскольку отсутствуют ассоциации rs17465637 с какими-либо изученными фенотипическими показателями.

Таким образом, ОНП, которые на этапе отбора для исследования не имели существенных различий, показали на нашей популяции очень разнородные результаты. Два ОНП оказались тесно сцепленными rs10757278 и rs1333049 (хр. 9) и для дальнейшего анализа был оставлен rs1333049. Из семи других, только пять ОНП показали ассоциацию с ИМ разной степени надежности. Такие как rs1333049, показали ассоциацию с ИМ на всех группах и подгруппах, другие только в отдельных группах, с ограничениями по полу и возрасту. rs2549513 и rs17465637 вообще оказались не ассоциированными с ИБС. Но при этом, rs2549513 показал ассоциацию с показателями липидного и углеводного обмена, а также с выраженностью коронарного атеросклероза и неблагоприятным прогнозом в течение года после ИМ. Тогда как rs17465637 оказался только слабо ассоциированным с ИМТ (табл. 4).

Заключение

Комплексный подход к изучению роли полиморфизма весьма трудоемок, но он дает достаточную уверенность в значимости полученных результатов, в их неслучайном характере, позволяет отобрать наиболее надежные, показавшие ассоциацию не только с основным патологическим фенотипом, но и его факторами риска.

Благодарности. Работа частично поддержана: бюджетными проектами № 0324-2016-0002 и № 0120.0502961, грантами РФФИ (10-04-01448 и 11-04-01875).

Литература

- Horne BD, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. Associations with myocardial infarction of six polymorphisms selected from a three-stage genome-wide association study. *Am Heart J*. 2007 Nov; 154 (5): 969-75.
- Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, et al. Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes. *BMC Med Genet*. 2007 Sep 19; 8 Suppl 1: S5.
- Ozaki K, Tanaka T. Genome-wide association study to identify single-nucleotide polymorphisms conferring risk of myocardial infarction. *Methods Mol Med*. 2006; 128: 173-80.
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 2007, 2357, 443-53.
- Hiura Y, Fukushima Y, Yuno M, et al. Validation of the association of genetic variants on chromosome 9p21 and 1q41 with myocardial infarction in a Japanese population. *Circ J*. 2008 Aug; 72 (8): 1213-7.
- Schunkert H, Götz A, Braund P, et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation*. 2008 Apr 1; 117 (13): 1675-84.
- Shen GQ, Li L, Rao S, et al. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Feb; 28 (2): 360-5.
- Lee CJ, Lee JY, Oum CY, et al. The Effect of FLT1 Variant on Long-Term Cardiovascular Outcomes: Validation of a Locus Identified in a Previous Genome-Wide Association Study. *PLoS One*. 2016 Oct 13; 11 (10).
- MONICA Monograph and Multimedia Sourcebook. World's largest study of heart disease, stroke, risk factors, and population trends 1979-2002. Edited by Hugh Tunstall-Pedoe (with 64 other contributors for the WHO MONICA Project) WHO, Geneva, 2003. 237 p.
- Ivanova AA, Maksimov VN, Orlov PS, et al. Association of the genetic markers for myocardial infarction with sudden cardiac death. *Indian Heart J*. 2017 Apr; 69, Suppl 1: S8-S11.
- Franceschini N, Carty C, Buzkova P, et al. Association of genetic variants and incident coronary heart disease in multi-ethnic cohorts. The PAGE Study. *Circulation*. 2011; 4: 661-72.
- Bressler J, Folsom AR, Couper DJ, et al. Genetic variants identified in a European genome-wide association study that were found to predict incident coronary heart disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol*. 2010 Jan 1; 171 (1): 14-23.
- Foroughmand AM, Nikkha E, Galehdari H, Jadbabaee MH. Association study between coronary artery disease and rs1333049 and rs10757274 polymorphisms at 9p21 locus in South-West Iran. *Cell J*. 2015; 17: 89-98.
- Jansen MD, Knudsen GP, Myhre R, et al. Genetic variants in loci 1p13 and 9p21 and fatal coronary heart disease in a Norwegian case-cohort study. *Mol Biol Rep*. 2014; 41: 2733-43.
- Ellis KL, Pilbrow AP, Frampton CM, et al. A Common Variant at Chromosome 9P21.3 Is Associated with Age of Onset of Coronary Disease but Not Subsequent Mortality. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3 (3): 286-93.
- Buyschaert I, Carruthers KF, Dunbar DR, et al. A variant at chromosome 9p21 is associated with recurrent myocardial infarction and cardiac death after acute coronary syndrome: The GRACE Genetics Study. *Eur Heart J*. 2010, 31 (9): 1132-41.
- Shesternya PA, Nikulina SYu, Shulman VA, et al. Clinical significance of coronary artery disease genetic markers: reality or far future? *Russ J Cardiol*, 2014; 10: 7-12. (In Russ.) Шестерня П. А., Шульман В. А., Никулина С. Ю., и др. Использование генетических маркеров ишемической болезни сердца в клинической практике: реальность или отдаленная перспектива? *Российский кардиологический журнал*, 2014; 10 (114): 7-12. DOI:10.15829/1560-4071-2014-10-7-12
- Lozhkina NG, Maksimov VN, Kulikov IV, et al. Association of genetic markers with lowered retractive heart function at patients with acute coronary syndrome. *Meditcina i obrazovaniye v Sibiri*, 2013; 3. (In Russ.) Ложкина Н.Г., Максимов В.Н., Куликов И.В., и др. Ассоциация генетических маркеров со сниженной сократительной функцией сердца у больных с острым коронарным синдромом. *Медицина и образование в Сибири: Электронный ресурс сетевого научного издания*, 2013; 3. http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1024
- Kulikov IV, Lozhkina NG, Maksimov VN, et al. Genetic markers of severity of coronary vessels stenosis in patients with acute coronary syndrome. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 2013; 33, 4: 65-70. (In Russ.) Куликов И.В., Ложкина Н.Г., Максимов В.Н., и др. Генетические маркеры тяжести поражения коронарных сосудов у больных с острым коронарным синдромом. *Сибирский научный медицинский журнал*, 2013; 33, 4: 65-70.
- Shiffman D, Ellis SG, Rowland CM, et al. Identification of four gene variants associated with myocardial infarction. *Am J Hum Genet*. 2005; 77: 596-605.
- Koch W, Hoppmann P, Schömig A, Kastrati A. Variations of specific non-candidate genes and risk of myocardial infarction: a replication study. *Int J Cardiol*. 2011; Feb 17, 147 (1): 38-41.
- Martynova EA, Shesternya PA, Nikulina SYu. Association of polymorphisms of 6 chromosome with myocardial infarction. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye*, 2013; 2 (80): 24-7. (In Russ.) Мартынова Е.А., Шестерня П.А., Никулина С.Ю. Ассоциация полиморфизмов шестой хромосомы с развитием инфаркта миокарда. *Сибирское медицинское обозрение*, 2013; 2 (80): 24-7.
- Yamada Y, Kato K, Oguri M, et al. Genetic risk for myocardial infarction determined by polymorphisms of candidate genes in a Japanese population. *J Med Genet*. 2008; Apr, 45 (4): 216-21.
- Lozhkina NG, Maksimov VN, Orlov PS, et al. Genetic markers of negative outcomes of the acute coronary syndrome. *Russ J Cardiol*, 2014; 10: 19-22. (In Russ.) Ложкина Н.Г., Максимов В.Н., Орлов П.С., и др. Генетические маркеры неблагоприятных исходов острого коронарного синдрома. *Российский кардиологический журнал*, 2014; 10 (114): 19-22. DOI:10.15829/1560-4071-2014-10-19-22
- Lozhkina NG, Maksimov VN, Ragino Yul, et al. Multifactor prediction of long-term outcomes of acute coronary syndrome with sustained ST segment elevation. *Russ J Cardiol*, 2015; 9: 25-31. (In Russ.) Ложкина Н.Г., Максимов В.Н., Рагино Ю.И., и др. Многофакторное прогнозирование отдаленных исходов острого коронарного синдрома со стойким подъемом сегмента ST. *Российский кардиологический журнал*, 2015; 9 (125): 25-31. DOI:10.15829/1560-4071-2015-9-25-31
- He QC, Hu YY, Zhang QP, et al. A meta-analysis of three identified single nucleotide polymorphisms at 1p13.3 and 1q41 and their associations with lipid levels and coronary artery disease. *Kaohsiung J Med Sci*. 2017; Jan, 33 (1): 1-10.