

Связь полиморфизмов генов TLRs со степенью атеросклеротического поражения коронарного русла у пациентов со стабильной формой ИБС

А. В. Понасенко¹, М. В. Хуторная¹, А. Г. Кутихин¹, И. И. Жидкова¹, А. С. Головкин³, О. Л. Барбараш¹,
Л. С. Барбараш^{1,2}

¹ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово

² Государственное образовательное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Кемерово

³ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Институт молекулярной биологии и генетики г. Санкт-Петербург имени академика Е. Н. Мешалкина» МЗ РФ, г. Новосибирск

Абстракт

Цель. Выявить ассоциации полиморфных вариантов генов Toll-подобных рецепторов (TLRs) со степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий (КА), оцененной по шкале SYNTAX SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation).

Материалы и методы. В исследование включено 292 пациента со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС). Генотипирование проводилось в 96-луночном формате посредством технологии TaqMan.

Результаты. У пациентов с ИБС генотип C/C полиморфизма rs3804099 гена TLR2 ассоциирован с повышением вероятности развития тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов) (ОШ = 2,03, 95%ДИ = 1,09–3,77, $p = 0,025$). Других ассоциаций полиморфных вариантов генов TLR1 (rs5743551 и rs5743611), TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986790 и rs4986791), TLR6 (rs3775073 и rs5743810) со степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий, не выявлено. В результате построения первой математической модели оценки величины риска каждого из возможных предикторов при включении и исключении 16 клинических факторов риска были определены 2 предиктора – фракция выброса (ФВ) $< 55\%$ (повышает в 1,92 раза риск тяжелого поражения КА) и одностороннее поражение КА (снижает в 6,25 раза риск тяжелого поражения КА). Площадь под ROC-кривой составила 0,677 (0,620–0,730), что является средним показателем классифицирующей модели. В результате построения второй математической модели с включением и исключением, помимо 16 клинических факторов риска были включены в анализ 8 генетических маркеров. В этой модели наряду с 2 клиническими предикторами были определены 2 генетических: полиморфизм rs5743551 гена TLR1 (генотип C/T повышает в 1,83 раза риск тяжелого поражения КА), полиморфизм rs4986790 гена TLR4 (генотип A/G снижает в 3 раза риск тяжелого поражения КА). Площадь под ROC-кривой составила 0,710 (0,654–0,762), что является хорошим показателем классифицирующей модели.

Заключение. При выявлении генотипа C/T полиморфизма rs5743551 гена TLR1 и ФВ менее 55% можно прогнозировать наличие у пациента с ИБС тяжелых форм коронарного атеросклероза.

Ключевые слова: атеросклероз; иммунитет, ишемическая болезнь сердца; Toll-подобные рецепторы; генные полиморфизмы, шкала SYNTAX SCORE.

Association of TLR gene polymorphisms with the severity of coronary atherosclerosis in patients with stable coronary artery disease

A. V. Ponasenko¹, M. V. Khutornaya¹, A. G. Kutikhin¹, I. I. Zhidkova¹, A. S. Golovkin³, O. L. Barbarash¹,
L. S. Barbarash^{1,2}

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

² Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russia

³ Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Institute of Molecular Biology and Genetics, St. Petersburg, Russia

Abstract

Aim. To investigate the associations of the Toll-like receptor (TLR) gene polymorphisms with the severity of coronary atherosclerosis (CA) estimated by SYNTAX (Systematic Coronary Risk Evaluation) score.

Methods. We recruited 292 patients with stable coronary artery disease (CAD). Genotyping was performed in 96-well format using the TaqMan SNP genotyping assay.

Results. We revealed that the C/C genotype of the rs3804099 polymorphism within the TLR2 gene was significantly associated with severe (SYNTAX ≥ 23) coronary atherosclerosis (OR = 2.03, 95%CI = 1.09–3.77, $p = 0.025$). However, there were no statistically significant associations of the TLR1 (rs5743551 and rs5743611), TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986790 and rs4986791), and TLR6 (rs3775073 and rs5743810) gene polymorphisms with the severity of coronary atherosclerosis. When we performed stepwise logistic regression using 16 clinical risk factors, left ventricular ejection fraction (LVEF) $< 55\%$ and < 2 affected CA were associated with 1.92-fold higher and 6.25-fold lower risk of severe coronary atherosclerosis, respectively, with the area under the ROC curve (AUC) of 0.677 (0.620–0.730). However, when we added all 8 TLR gene polymorphisms into the regression, we found that the C/T genotype of the rs5743551 polymorphism within the TLR1 gene and the A/G genotype of the rs4986790 polymorphism within the TLR4 gene were associated with 1.83-fold higher and 3-fold lower risk of severe coronary atherosclerosis, respectively. Moreover, AUC increased to 0.710 (0.654–0.762).

Conclusion. The C/T genotype within the rs5743551 polymorphism within the TLR1 gene and left ventricular ejection fraction $< 55\%$ are associated with severe coronary atherosclerosis in patients with stable CAD.

Keywords: atherosclerosis; immunity; coronary artery disease; Toll-like receptors; gene polymorphisms; SYNTAX score.

Введение

В патогенез атеросклероза вовлечено огромное количество клеток иммунной системы, биологически активных веществ, оказывающих различные влияния на сосудистую стенку и участвующих в реализации универсальной реакции воспаления. В настоящее время особое внимание уделяется воспалительному повреждению сосудистой стенки с участием врожденного и адаптивного иммунного ответа – атрибуту всех стадий развития атеросклероза – от его инициации, прогрессирования до перехода атеросклеротической бляшки (АСБ) в нестабильное состояние [1]. Актуальным является поиск пускового фактора, осуществляющего запуск провоспалительных реакций в артериальной стенке, а также триггерных механизмов, способных оказывать влияние на степень выраженности воспалительной реакции. Наиболее перспективными для изучения являются рецепторы врожденного иммунитета – Toll-подобные рецепторы (TLRs), демонстрирующие участие в атерогенезе [2]. Активация TLRs индуцирует экспрессию большого количества генов, кодирующих белки, участвующие в реализации окислительного стресса и фагоцитоза, вызывающих продукцию цитокинов [фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), и других] и апоптоз, что способствует поддержанию локального воспаления

в сосудистой стенке и прогрессированию атеросклеротического поражения [3].

Межиндивидуальные различия в генах, кодирующих TLRs, могут определять различный характер течения воспалительного ответа и специфических иммунных реакций, что может быть ассоциировано с высоким риском тяжелого клинического течения и осложнений [4]. Однако отсутствуют данные о связи изучаемых полиморфизмов генов TLRs со степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий (КА).

Цель исследования: выявить ассоциации полиморфных вариантов генов TLRs со степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий, оцененной по шкале SYNTAX SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation).

Материалы и методы

В исследование были включены 292 пациента [239 мужчин, 53 женщины в возрасте от 40 до 70 лет (средний возраст 57,75 лет, стандартное отклонение от среднего 6,14 лет, 95%-ный доверительный интервал (ДИ) для среднего 57,04–58,45 лет)] с установленным и подтвержденным по результатам коронароангиографии (КАГ) диагнозом ишемической болезни сердца (ИБС). Работа выполнена в рамках проведения регистра коронарного шунтирования (КШ) на базе ФГБНУ «НИИ КПССЗ»

с 2011 по 2012 гг., пациенты проходили подготовку к операции КШ. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института.

Критериями включения в исследование были принадлежность пациента к русской популяции, проживание в Кемеровской области в течение по меньшей мере двух поколений (на основании

анкетных и паспортных данных), ангиографически подтвержденный стеноз КА и наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании. Критериями исключения были онкологические, аутоиммунные, хронические инфекционные и психические заболевания в анамнезе. Клинико-анамнестические характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-анамнестические характеристики обследованных пациентов

Показатель	Количество
Показатели	Количество
Мужчины	239 (81,85%)
Возраст > 55 лет	185 (63,36%)
Сумма баллов по шкале SYNTAX > 22	112 (38,36%)
Число пораженных атеросклерозом коронарных артерий > 1	223 (76,37%)
МФА	253 (86,64%)
Гемодинамически значимый стеноз ($\geq 50\%$ просвета) БЦА и/или АНК	83 (28,42%)
ХСН III–IV ФК по NYHA	82 (28,08%)
Стенокардия III–IV ФК	139 (47,60%)
ИМ в анамнезе	224 (76,71%)
ОНМК по ишемическому типу в анамнезе	31 (10,62%)
АГ	262 (89,73%)
НУО	87 (29,79%)
Дислипидемия	228 (78,08%)
Курение	196 (67,12%)
ИМТ > 25	220 (75,34%)

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; АНК – артерии нижних конечностей; БЦА – брахиоцефальные артерии; ИМТ – индекс массы тела; МФА – мультифокальный атеросклероз; НУО – нарушения углеводного обмена (сахарный диабет второго типа и нарушение толерантности к углеводам); ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу; ФК – функциональный класс; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; NYHA – New York Heart Association.

Диагноз ИБС верифицирован на основании Национальных рекомендаций Российского кардиологического общества [5]. Всем пациентам с целью верификации наличия и степени тяжести атеросклероза КА, топической диагностики стенозирующих поражений КА проводилась диагностическая КАГ по методу M. Judkins (1967) на ангиографическом аппарате Innova 3100 Cardiac Angiography System (General Electric Healthcare, США). Стеноз просвета сосуда $\geq 50\%$ определялся как гемодинамически значимый. Для дальнейшей оценки выраженности коронарного стеноза использовалась шкала SYNTAX SCORE [6]. Медиана по шкале SYNTAX SCORE составила 19,50 [14,00–26,50] (95%ДИ для медианы 19,00–21,50).

В зависимости от показателей по шкале SYNTAX SCORE пациенты были разделены на две группы: в группу с низким риском (0–22 баллов) включены 180 (61,64%) пациентов, а в группу со средним и высоким риском (от 23 баллов и выше) – 112 (36,38%) человек. Клинико-анамнестические характеристики групп пациентов приведены в табл. 2.

Тремя основными критериями для выбора однонуклеотидных полиморфизмов были (1) высокая распространенность их в популяции (частота минорного аллеля $\geq 5\%$ в русской популяции согласно HarMap), (2) предполагаемые или доказанные функциональные последствия на молекулярном уровне и (3) малое количество или отсутствие исследований роли относительно



Таблица 2. Клинико-анамнестические различия пациентов в зависимости от показателей по шкале SYNTAX SCORE

Показатели	SYNTAX SCORE ≤22 баллов, n = 180 (64,64%)	SYNTAX SCORE ≥23 баллов, n = 112(36,38%)	p
Мужчины, n (%)	147 (81,67)	92 (82,14)	0,76
Возраст, лет	58,00 (53,00;63,00)	58,00 (54,00;63,00)	0,50
ИМТ, (кг/м²)	28,41 (24,49;31,30)	28,67 (25,81;32,69)	0,14
НУО, n (%)	50 (27,78)	37 (33,04)	0,09
ОНМК, n (%)	17 (9,44)	14 (12,50)	0,36
ИМ, n (%)	134 (74,44)	90 (80,36)	0,19
АГ, n (%)	159 (88,33)	103 (91,96)	0,36
Курящие, n (%)	130 (72,22)	66 (58,93)	0,05
МФА, n (%)	156 (86,67)	97 (86,61)	0,34
Стенокардия III–IV ФК, n (%)	79 (43,89)	60 (53,57)	0,17
Длительность ИБС, лет	2,00 (1,00;6,00)	3,00 (1,00; 7,50)	0,028
≥ двухсосудистое поражение КА, n (%)	119 (66,11)	104 (92,86)	< 0,0001
ХСН (НУНА) ФК III–IV, n (%) (%)	53 (29,44)	29 (25,89)	0,44
ФВ ЛЖ, n (%)	60,00 (50,00;64,00)	55,00 (47,00;63,00)	0,20
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,03 (0,85;1,22)	0,92 (0,78;1,09)	0,007

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; ИМТ – индекс массы тела; КА – коронарные артерии; МФА – мультифокальный атеросклероз; НУО – нарушения углеводного обмена (сахарный диабет второго типа и нарушение толерантности к углеводам); ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу; ФВ – фракция выброса левого желудочка ФК – функциональный класс; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ХС ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; НУНА – New York Heart Association.

выраженности атеросклероза. Для выбора полиморфизмов использовались базы данных NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), SNPinfo (<http://snpinform.niehs.nih.gov/snpinform/snpfunc.htm>) и SNPnexus (<http://www.snp-nexus.org/>) [7, 8]. Всего было исследовано 8 полиморфизмов в 4 генах: TLR1 (rs5743551 и rs5743611), TLR2 (rs3804099 и rs5743708), TLR4 (rs4986790 и rs4986791), TLR6 (rs3775073 и rs5743810). Геномная ДНК выделялась из лейкоцитов фенол-хлороформным методом в соответствии со стандартным протоколом. Генотипирование проводилось в 96-луночном формате по технологии TaqMan (аллель-специфичная ПЦР в реальном времени) при помощи амплификатора Applied Biosystems ViiA 7 Real-Time PCR System в соответствии с протоколом производителя.

Статистическую обработку результатов исследований проводили на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ «SPSS for Windows, versions 13.0, 17.0» (SPSS Inc., США). Нормальность распределения оценивалась

в соответствии с критерием д'Агостино-Пирсона. Для описания количественных данных вычислялось среднее арифметическое, стандартное отклонение, медиана, межквартильный размах и 95%-ный доверительный интервал для среднего арифметического и медианы. Для описания качественных данных вычислялись доли (MedCalc, MedCalc Software, Бельгия). Статистический анализ результатов генотипирования проводился посредством программы SNPStats [9]. Равновесие Харди-Вайнберга определялось при помощи критерия хи-квадрат Пирсона с одной степенью свободы для сравнения наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов. Распределение частот генотипов во всех исследуемых группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Для оценки риска вычислялись отношение шансов (ОШ) и 95% ДИ для ОШ по пяти моделям наследования (кодминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Выбор наиболее вероятной модели наследования осуществлялся по информационному критерию

Таблица 3. Связь полиморфизма гена TLR2 (rs3804099) с риском прогностически неблагоприятного показателя по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов

Модели наследования	Генотипы	Число баллов SYNTAX 0–22	Число баллов SYNTAX > 22	ОШ (95% ДИ)	p
rs3804099 TLR2					
Кодоминантная	T/T	82 (45,60%)	41 (36,90%)	1,00	0,066
	C/T	74 (41,10%)	44 (39,60%)	1,19 (0,70–2,03)	
	C/C	24 (13,30%)	26 (23,40%)	2,21 (1,13–4,35)	
Доминантная	T/T	82 (45,60%)	41 (36,90%)	1,00	0,14
	C/T-C/C	98 (54,40%)	70 (63,10%)	1,44 (0,88–2,34)	
Рецессивная	T/T-C/T	156 (86,70%)	85 (76,60%)	1,00	0,025
	C/C	24 (13,30%)	26 (23,40%)	2,03 (1,09–3,77)	
Сверхдоминантная	T/T-C/C	106 (58,90%)	67 (60,40%)	1,00	0,79
	C/T	74 (41,10%)	44 (39,60%)	0,94 (0,58–1,52)	
Лог-аддитивная	–	–	–	1,43 (1,03–1,99)	0,031

Акаике (Akaike information criterion, AIC); модель с наименьшим значением этого критерия принималась в качестве наиболее вероятной. Различия признавались статистически значимыми при вероятности отклонить верную нулевую гипотезу p менее 0,05. Поправка на множественные сравнения проводилась при помощи вычисления средней доли ложных отклонений гипотез (False Discovery Rate, FDR, <http://users.ox.ac.uk/~npike/fdr/>) и критерия перестановок (permutation test, Statxact 9, Cytel Inc., MA, США).

Математические модели расчета рисков рассчитывались посредством бинарной логистической регрессии с пошаговым включением и исключением предикторов. В данных моделях зависимой переменной являлось наличие рассчитанного показателя по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов (на основании анализа данных проведенных КАГ); переменные вводились в модель при уровне p менее 0,05, а исключались при p более 0,1.

Результаты

Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что пациенты с прогностически неблагоприятным показателем по шкале SYNTAX SCORE (от 23 баллов и выше) характеризовались более длительным течением ИБС, закономерно более тяжелым атеросклеротическим поражением КА по данным КАГ (двухсосудистым и более поражением КА). Кроме того, у этой группы пациентов уровни антиатерогенного ХС ЛПВП были достоверно ниже, по сравнению с пациентами с низким риском по шкале SYNTAX SCORE.

Генетический анализ показал, что генотип C/C полиморфизма rs3804099 гена TLR2 статистически значимо ассоциирован с повышением вероятности

развития тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов) у пациентов с ИБС (ОШ = 2,03, 95%ДИ = 1,09–3,77, $p = 0,025$) согласно рецессивной модели наследования, независимо от пола и возраста (табл. 3).

Других ассоциаций полиморфных вариантов генов TLR1 (rs5743551 и rs5743611), TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986790 и rs4986791), TLR6 (rs3775073 и rs5743810) со степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий, оцененной по шкале SYNTAX SCORE, не выявлено.

В результате построения первой математической модели оценки величины риска каждого из возможных предикторов, при включении и исключении 16 клинических факторов риска, были определены 2 предиктора – ФВ < 55% (повышает в 1,92 раза риск тяжелого поражения КА) и однососудистое поражение КА (снижает в 6,25 раза риск тяжелого поражения КА) (табл. 4). При оценке качества (тестировании) первой модели установили, что логарифмическое правдоподобие для нулевой модели равнялось 388,77, а для полной – 354,46 при значении Хи-квадрата для пяти степеней свободы 34,31 ($p < 0,0001$). При этом установлено, что правильность отнесения пациентов с применением таких оценочных критериев, как ФВ < 55% и однососудистое поражение КА, для модели в среднем составляет 64,95%. Качество бинарной классификации, отображающее соотношение между долей объектов от общего количества носителей признака, верно классифицированных как несущих признак, оценивалось с помощью построения ROC-кривой и измерением площади под этой кривой. Площадь под ROC-кривой составила 0,677 (0,620–0,730), что является средним показателем классифицирующей модели (табл. 4).



Таблица 4. Результаты бинарной логистической регрессии с пошаговым включением и исключением клинических предикторов и клинических предикторов + генетических

Переменные		ОШ	95% ДИ для ОШ
ФВ < 55%		1,8598	1,1218 – 3,0832
Однососудистое поражение КА		0,1621	0,0761 – 0,3454
Реальная группа	Предсказанная группа		Процент правильно классифицированных пациентов
	SYNTAX SCORE ≤ 22	SYNTAX SCORE ≥ 23	
SYNTAX SCORE ≤ 22	138	40	77,53 %
SYNTAX SCORE ≥ 23	62	51	45,13 %
Усредненный процент случаев правильной классификации			64,95 %
Переменные		ОШ	95% ДИ для ОШ
ФВ < 55%		1,9168	1,1431 – 3,2139
Однососудистое поражение КА		0,1598	0,0742 – 0,3441
С/Т генотип TLR1 rs5743551		1,8335	1,0550 – 3,1865
А/Г генотип TLR4 rs4986790		0,3635	0,1665 – 0,7935
Реальная группа	Предсказанная группа		Процент правильно классифицированных пациентов
	SYNTAX SCORE ≤ 22	SYNTAX SCORE ≥ 23	
SYNTAX SCORE ≤ 22	131	46	74,01 %
SYNTAX SCORE ≥ 23	48	65	57,52 %
Усредненный процент случаев правильной классификации			67,59 %

Примечание: ДИ – доверительный интервал; ОШ – отношение шансов; ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка; КА – коронарная артерия

В результате построения второй математической модели с включением и исключением помимо 16 клинических факторов риска были включены в анализ 8 генетических маркеров. В этой модели, наряду с 2 клиническими предикторами, были определены 2 генетических: полиморфизм rs5743551 гена TLR1 (генотип С/Т повышает в 1,83 раза риск тяжелого поражения КА), полиморфизм rs4986790 гена TLR4 (генотип А/Г снижает в 3 раза риск тяжелого поражения КА). При оценке качества (тестировании) второй модели установили, что логарифмическое правдоподобие для нулевой модели равнялось 387,78, а для полной – 344,14 при значении Хи-квадрата для пяти степеней свободы 43,64 ($p < 0,0001$). При этом установлено, что правильность отнесения пациентов с применением таких оценочных критериев, как ФВ < 55% и однососудистое поражение КА, генотип С/Т полиморфизма rs5743551 гена TLR1, генотип А/Г полиморфизма rs4986790 гена TLR4 для модели в среднем составляет 67,59% (табл. 4). Качество бинарной классификации, отображающее соотношение между долей объектов и общим количеством носителей признака, верно классифицированных как

несущих признак, оценивалось с помощью построения ROC-кривой и измерением площади под этой кривой. Площадь под ROC-кривой составила 0,710 (0,654–0,762), что является хорошим показателем классифицирующей модели (таблица 4).

Таким образом, добавление в логистическую регрессию с включением и исключением помимо клинических, генетических предикторов увеличивает чувствительность метода на 12,50%.

Обсуждение

Атеросклероз, приводящий к поражению КА, является мультифакторным заболеванием, детерминирующимся сложным, сочетанным взаимодействием различных факторов (генетических, окружающей среды), которые определяют длительность латентного периода, варианты клинических проявлений, осложнения, течение и прогноз заболевания. Наследственная предрасположенность к атеросклерозу характеризуется возникновением и течением воспалительных реакций в артериальной стенке на фоне экспрессии в ней биологически активных веществ

и молекул в связи с влиянием различных генов, белковые продукты которых вовлечены в атерогенез [10]. Основой развития атеросклеротического процесса является иммуноопосредованное повреждение артерий (воспалительная теория) [11, 12]. Ключевую роль в развитии универсальной воспалительной реакции вносят рецепторы врожденного иммунитета – TLRs

Как известно, шкала SYNTAX SCORE, оценивая тяжесть поражения коронарного русла, является шкалой стратификации сердечно-сосудистых осложнений у пациентов, являющихся кандидатами на чрескожное коронарное вмешательство или КШ, и атрибутом увеличения риска развития коронарных событий [13].

В последнее время посредством полногеномных ассоциативных исследований GWAS (Genome-Wide Association Study) идет поиск и активно изучаются генетические маркеры атеросклероза, предикторов развития сердечно-сосудистых заболеваний. Учитывая существенный вклад генетических факторов и воспаления в развитие атеросклеротического поражения КА, в настоящей работе проведен анализ генетических ассоциаций аллельных вариантов генов TLRs со степенью поражения коронарного русла (оцененной по шкале SYNTAX SCORE).

Немногие полиморфизмы генов TLRs были изучены в отношении их связи со степенью атеросклеротического поражения КА. В ряде исследований аллель G полиморфизма rs4986790 гена TLR4 (аллель 299Gly) не ассоциирован с выраженным атеросклеротическим поражением КА при ИБС [14, 15], однако также сообщалось о протективном эффекте данного аллеля в отношении риска развития этого заболевания [10, 16, 17]. Была показана ассоциация аллеля 299Gly с большим количеством пораженных атеросклерозом сосудистых бассейнов [18], но в то же время не было выявлено его связи с атеросклерозом аорты [19]. Хотя в первых работах аллель 299Gly был ассоциирован со сниженной толщиной КИМ (комплекса интима-медиа) [10], эти результаты не подтвердились в дальнейших исследованиях [20, 21]. Последний релевантный мета-анализ также не показал ассоциации полиморфизма rs4986790 (Asp299Gly) с атеросклерозом [4]. В данной работе мы также не обнаружили статистически значимой связи аллеля 299Gly с выраженностью коронарного атеросклероза. Однако, было впервые показано, что генотип C/C полиморфизма rs3804099 гена TLR2 может быть статистически значимо ассоциирован с повышением вероятности развития тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов) у пациентов с ИБС (независимо от пола и возраста).

Доказано, что в эндотелии сосудов имеются TLR2 – и TLR4 [12]. Установлено, что активация TLR2 способствует формированию дисфункции эндотелия (ДЭ) в КА на фоне преходящей ишемии [22]. Благодаря повышенной активности TLRs в стенках сосудов поддерживается хроническое воспаление и ДЭ, что способствует развитию и прогрессированию атеросклероза с более выраженным атеросклеротическим поражением КА.

Известно, что, шесть смысловых SNPs [single nucleotide polymorphisms (однонуклеотидных полиморфизмов)] гена TLR2 связаны с заменой аминокислоты в цитозольной части рецептора, включая 5 SNPs в пределах TIR (Toll-interleukin-1 receptor) домена. Эти полиморфизмы приводят к снижению активации NF- κ B, повышают восприимчивость к инфекции [23]. Вполне вероятно, что данный механизм способствует повышенной микробной контаминации на фоне которой в связи со снижением иммунного ответа происходит развитие неконтролируемого воспалительного процесса, приводящего к прогрессированию атеросклеротического поражения КА.

С учетом возможного влияния многих факторов риска на степень атеросклеротического поражения КА и, в том числе, генетических, для построения шкалы расчета риска тяжелого атеросклеротического поражения КА (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов) использовали построение двух математических моделей.

На основании проведенной бинарной логистической регрессии с пошаговым включением и исключением предикторов из 16 клинических и 8 генетических факторов риска установлено: при генотипе C/T полиморфизма rs5743551 гена TLR1 и ФВ менее 55 % можно прогнозировать выявление тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов). Добавление в модель прогнозирования генетических предикторов увеличивает чувствительность метода на 12,50%.

В ранее проведенном исследовании также было установлено, что G аллель полиморфизма rs5743551 данного гена ассоциирован с повышенной TLR1-опосредованной продукцией цитокинов [24], а повышенная продукция цитокинов индуцирует прогрессирование атеросклероза в сосудистой стенке КА. Кроме того, было показано, что у пациентов с гомозиготными и гетерозиготными генотипами полиморфизмов rs4986790 (Asp299Gly) гена TLR4 происходит подавление активности NF- κ B, являющегося мощным индуктором воспалительных реакций организма, за счет ослабления аффинности рецептора к лигандам. Определено, что носители аллеля G данного полиморфизма гена TLR4 имеют более низкие уровни циркулирующих провоспалительных цитокинов, острофазных белков (в том числе C – реактивного белка, IL-6, фибриногена в плазме крови), растворимых адгезивных молекул и других медиаторов воспаления [14], что соответственно будет способствовать снижению риска выраженного атеросклеротического поражения КА.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что при генотипе C/T полиморфизма rs5743551 гена TLR1 и ФВ менее 55% можно прогнозировать выявление тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов). Кроме того, генотип C/C полиморфизма rs3804099 гена TLR2 также статистически значимо ассоциирован



с двукратным риском повышения вероятности развития тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов). Ассоциаций полиморфных вариантов генов TLR1 (rs5743551 и rs5743611), TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986790 и rs4986791), TLR6 (rs3775073 и rs5743810) со степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий, оцененной по шкале SYNTAX SCORE, у пациентов с ИБС не выявлено.

Основным преимуществом нашего исследования является значительное количество проанализированных полиморфизмов (восемь полиморфизмов четырех генов TLRs). Кроме того, это первое исследование связи полиморфизмов генов TLRs с повышением вероятности развития тяжелых форм коронарного атеросклероза (показатель по шкале SYNTAX SCORE ≥ 23 баллов и многососудистое поражение КА) в русской популяции.

Таким образом, проведенное исследование подтверждает гипотезу мультифакториального генеза ИБС и вклада в тяжелое атеросклеротическое поражение КА как хорошо известных клинических факторов, так и генетических. Поэтому в дальнейшем возможно использование генетических маркеров TLRs с целью стратификации групп высокого риска сердечно-сосудистых осложнений ИБС.

Представленные данные расширяют знания о роли рецепторов врожденного иммунитета (TLRs) и их генов в патогенезе ИБС и атеросклероза, под-

тверждают иммуновоспалительную концепцию атерогенеза. Результаты настоящего исследования являются перспективными для дальнейших исследований генетических основ формирования ИБС и ее клинических проявлений и, возможно, для первичной профилактики сердечно-сосудистых событий. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для подтверждения роли этих генных полиморфизмов в качестве предиктивных и патогенетических маркеров атеросклероза.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Источник финансирования

Проект финансировался из федерального бюджета, выделяемого институту в рамках фундаментальной темы ФГБНУ «НИИ КПССЗ»: «Вклад генетических, иммунологических и метаболических факторов в развитие атеросклероза различной локализации, формирование патогенетически обоснованного подхода к лечебно-диагностическим мероприятиям в условиях крупного промышленного региона Сибири» Шифр 05; № госрегистрации 01201281884 от 18.02.2012 г. Утверждена Постановлением № 1 33 (LVII) сессии Общего собрания ФГБУ СО РАМН от 4 декабря 2012 г. Других источников финансирования не было.

Список литературы

1. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852–66.
2. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140:805–20.
3. Van Lammeren GW, Moll FL, Borst GJ, de Kleijn DP, de Vries JP, Pasterkamp G. Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr. Cardiol. Rev*. 2011;7(1):22–7.
4. Zhang K, Zhang L, Zhou B, Wang Y, Song Y, Rao L, Zhang L. Lack of association between TLR4 Asp299Gly polymorphism and atherosclerosis: evidence from meta-analysis. *Thromb Res*. 2012;130(4):203–8.
5. *Diseases of the heart and blood vessels: the leadership of the European Society of Cardiology*. AD Camm, ed. M.: GJeOTAR-Media, 2011. 1480 p. Russian (Болезни сердца и сосудов: руководство Европейского общества кардиологов. под ред. АД Кэмма. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2011. 1480 с.).
6. Sianos G, Morel MA, Kappetein AP, Morice MC, Colombo A, Dawkins K, van den Brand M, Van Dyck N, Russell ME, Mohr FW, Serruys PW. The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention*. 2005;1(2):219–27.
7. Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:600–5.
8. Dayem Ullab AZ, Lemoine NR, Chelala C. SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants (2012 update). *Nucleic Acids Res*. 2012;40:65–70.
9. Soli X, Guiny E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928–9.
10. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberholzenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347(3):185–92.
11. Shih PK, Chyu KY, Dimayuga PC, Nilsson J. Vaccine for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(25):2779–91.
12. Eguchi K, Manabe I. Toll-like receptor, lipotoxicity and chronic inflammation: the pathological link between obesity and cardiometabolic disease. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(7):629–39.

13. Wijns W, Kolb P, Danchin N, Di Mario C, Falk V, Folliguet T, Garg S, Huber K, James S, Knuuti J, Lopez-Sendon J, Marco J, Menicanti L, Ostojic M, Piepoli MF, Pirlet C, Pomar JL, Reifart N, Ribichini FL, Schalij MJ, Sergeant P, Serruys PW, Silber S, Uva MS, Taggart D, Vahanian A, Auricchio A, Bax J, Ceconi C, Dean V, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hobbs R, Kearney P, McDonagh T, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA. Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for CardioThoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2010;31:2501-55.
14. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, Sidiropoulos A, Gerovassili A, Satra M, Vamvakopoulou D, Tsiopoulos F, Papanas N, Skoularigis I, Potamianos SP, Vamvakopoulos N. TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(2):261-7.
15. Guven M, Ismailoglu Z, Batar B, Unal S, Onaran I, Karadag B, Ongen Z. The effect of genetic polymorphisms of TLR2 and TLR4 in Turkish patients with coronary artery disease. *Gene*. 2015;558(1):99-102.
16. Hernesniemi J, Lehtimäki T, Rontu R, Islam MS, Eklund C, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Kajander O, Goebeler S, Viiri LE, Hurme M, Karhunen PJ. Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. *Scand J Clin Lab Invest*. 2006;66(8):667-75.
17. Berg KK, Madsen HO, Garred P, Wiseth R, Gunnes S, Videm V. The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease. *Scand J Immunol*. 2009;69(1):36-42.
18. Vainas T, Stassen FR, Bruggeman CA, Welten RJ, van den Akker LH, Kitslaar PJ, Peca AS, Morru SA. Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and CD14 polymorphisms on the total atherosclerosis burden in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2006;44(2):326-32.
19. Hommels MJ, Kroon AA, Netea MG, de Leeuw PW, Bruggeman CA, Leiner T, Koster DA, Stalenhoef AF, van der Ven AJ. The Asp299Gly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Neth J Med*. 2007;65(6):203-7.
20. Labrum R, Bevan S, Sitzer M, Lorenz M, Markus HS. Toll receptor polymorphisms and carotid artery intima-media thickness. *Stroke*. 2007;38(4):1179-84.
21. Hernesniemi JA, Raitakari OT, Kõhonen M, Juonala M, Hutri-Köhönen N, Marniemi J, Viikari J, Lehtimäki T. Toll-like receptor 4 gene (Asp299Gly) polymorphism associates with carotid artery elasticity. The cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis*. 2008;198(1):152-9.
22. Vasuk UA, Dudarenko OP, Uschuk EN, Shkol'nik EL, Serova MK. «Cytokine» model of pathogenesis of chronic heart failure and the opportunities of new therapeutic strategy in decompensated patients. *Pharmacotherapy Cardiology*. 2006;4:63-70. Russian (Васюк ЮА, Дударенко ОП, Ющук ЕН, Школьник ЕЛ, Серова МК. «Цитокиновая» модель патогенеза хронической сердечной недостаточности и возможности нового терапевтического подхода в лечении декомпенсированных больных. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2006;4:63-70).
23. Hefelfinger C, Pakstis AJ, Speed WC, Clark AP, Haigh E, Fang R, Furtado MR, Kidd KK, Snyder MP. Haplotype structure and positive selection at TLR1. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(4):551-7.
24. Shbelkunova TA, Morozov IA, Rubtsov PM. Changes in the level of gene expression in the aortic intima during atherogenesis. *Biochemistry*. 2013;5:610-9. Russian (Щелжунова ТА, Морозов ИА, Рубцов ПМ. Изменения в уровне экспрессии генов в интиме аорты в ходе атерогенеза. *Биохимия*. 2013;5:610-9).