

Локус 9p21.3 – генетический предиктор тяжести атеросклероза коронарных артерий

П. А. Шестерня, А. С. Сергеева, В. А. Шульман, С. Ю. Никулина, В. В. Козлов

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ, Красноярск

Абстракт

Цель исследования – изучить связь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) rs10757278 и rs1333049 локуса 9p21.3 с тяжестью коронарного атеросклероза. в исследование включались больные инфарктом миокарда (ИМ) европеоидной расы в возрасте ≤ 65 лет. За период с 01.01.2009 по 30.06.2010 года в исследование было включено 255 больных ИМ ($52,56 \pm 7,98$ лет). в исследуемой группе преобладали мужчины – 211 (82,7%), женщин было 44 (17,3%). Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфизм генов тестировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в соответствии с протоколом фирмы производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems 7900HT). в исследовании изучались два ОНП, расположенные в локусе 9p21.3 – rs10757278 и rs1333049. Для оценки степени тяжести поражения коронарного русла помимо стандартного протокола коронарографии в заслепленном режиме производился счет количества пораженных сегментов и рассчитывались интегральные индексы Gensini и SYNTAX. Впервые в российской популяции доказана взаимосвязь генотипов GG rs10757278 и CC rs1333049 локуса 9p21.3 с тяжестью коронарного атеросклероза.

Ключевые слова: слова: инфаркт миокарда, однонуклеотидные полиморфизмы, rs10757278, rs1333049, локус 9p21.3, атеросклероз.

Locus 9p21.3 – genetic predictor of coronary atherosclerosis severity.

P.A. Shesternya, A.S. Sergeeva, V.A. Shulman, S.Yu. Nikulina, V.V. Kozlov

Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. Voino-Yasensky, Krasnoyarsk

Abstract

The purpose of this study was to investigate association between 9p21.3 locus single nucleotide polymorphisms (SNP) and severity of coronary atheromatous burden. A total of 255 Caucasians (211 male, 44 female) with myocardial infarction age younger 65 old (mean $52,56 \pm 7,98$ years) were recruited from 01.01.2009 to 30.06.2010. The study was approved by Ethic Committee of the KrasGMU. All participants were included in the study after written informed consent form. Genome DNA was extracted from leukocytes of venous blood using the phenol-chloroform extraction method. Two SNPs rs10757278 and rs1333049 (locus 9p21.3) were tested using real-time polymerase chain reaction (PCR) according to protocol (probes TaqMan, Applied Biosystems, 7900HT). The coronary angiograms were reviewed by independent angiographers who were blinded to the results of the genotype. The total number of lesions, Gensini scores and SYNTAX score were derived. For the first time in Russian population, genotype CC rs1333049 and genotype GG rs10757278 locus 9p21.3 demonstrated a direct strong association with severity of coronary atheromatous burden.

Keywords: myocardial infarction, single nucleotide polymorphisms, rs10757278, rs1333049, locus 9p21.3, atherosclerosis.

Переворот в изучении генетики ишемической болезни сердца (ИБС) произвело секвенирование полного генома и создание каталога однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) человека. В 2007 году впервые в полногеномных ассоциативных исследованиях (Genome-Wide Association Study – GWAS) у европейцев была идентифицирована роль локуса 9p21.3 в развитии инфаркта миокарда (ИМ). Эти данные были подтверждены в различных популяциях, включая и российскую [1, 2]. В последующем было выявлено несколько десятков

новых ОНП, ассоциированных с развитием ИБС и ИМ [3, 4]. Но наиболее строгим и достоверным генетическим предиктором ИБС и ИМ остается небольшой участок генома (размером примерно 58 kb), расположенный на коротком плече 9-й хромосомы (локус 9p21.3). Однако механизм реализации феномена данного участка генома остается не известным до сих пор.

Обсуждается вопрос о возможном влиянии данного участка генома на клеточную пролиферацию, приводящую к дестабилизации атеросклеротиче-



ской бляшки, нарушению ее целостности и созданию предпосылок для коронарного тромбоза [5, 6].

В ряде исследований изучалась ассоциация полиморфных вариантов различных ОНП локуса 9p21.3 с тяжестью и характером поражения коронарного русла. Получены данные о взаимосвязи аллеля риска G rs10757278 с многососудистым и проксимальным типом поражения коронарных артерий (КА), стенозом ствола левой КА [7]. В крупном канадском исследовании Ottawa Heart Genomics Study была выявлена ассоциация с тяжестью поражения КА для другого ОНП данного локуса rs1333049 [8]. По данным ряда авторов отмечено влияние различных ОНП 9p21.3 не только на степень выраженности, но и темпы прогрессирования коронарного атеросклероза [7, 9, 10].

Определенный итог подведен в недавно опубликованном мета-анализе, объединившем более 20 исследований, направленных на изучение роли локуса 9p21.3 у больных ИБС/ИМ. При анализе клинических и ангиографических данных авторами сделан вывод об ассоциации локуса 9p21.3 именно с тяжестью коронарного атеросклероза, а не с развитием ИМ [11]. В России до настоящего времени отсутствуют публикации, посвященные изучению этого вопроса.

Цель.

Изучить связь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) rs10757278 и rs1333049 локуса 9p21.3 с тяжестью коронарного атеросклероза.

Материал и методы.

В исследование включались больные ИМ, госпитализированные с диагнозом ИМ в крупнейшие кардиологические центры г.Красноярска «Городская клиническая больница № 20 им. И. С. Берзона» и «Краевая клиническая больница», удовлетворяющие критериям включения.

Критериями включения являлись:

1) верифицированный диагноз ИМ; 2) мужчины и женщины в возрасте ≤ 65 лет; 3) европеоидная раса; 4) наличие подписанного информированного согласия пациента. Научное исследование одобрено Этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета. За период с 01.01.2009 по 30.06.2010 года в исследование было включено 255 больных ИМ в возрасте от 22 до 65 лет (средний возраст $52,56 \pm 7,98$ лет; квартили 25 %, 50 %, 75 % = 47,0 / 53,0 / 59,0). В исследуе-

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика больных ИМ.

Возраст, М $\pm$ SD	52,56 $\pm$ 7,98
Пол (мужской/женский)	211 (82,7 %) / 44 (17,3 %)
Сахарный диабет в анамнезе	25 (9,8 %)
Артериальная гипертензия в анамнезе	170 (66,7 %)
Гиперхолестеринемия (более 5,0 ммоль/л)	162 (63,5 %)
Курение	152 (59,6 %)
Избыточная масса тела (ИМТ ≥ 25)	167 (65,5 %)
Ожирение (ИМТ ≥ 30)	63 (24,7 %)
Характеристика ИМ	
ИМ с подъемом сегмента ST	199 (78,0 %)
ИМ без подъема сегмента ST	56 (22,0 %)
Передняя локализация ИМ	112 (43,9 %)
Не передний ИМ (включая нижний, боковой, задний)	118 (46,3 %)
Циркулярный ИМ	25 (9,8 %)
Q-волновой ИМ	180 (70,6 %)
Ангиографические данные	
Поражение коронарных артерий:	
– однососудистое	96 (37,7 %)
– двухсосудистое	84 (32,9 %)
– трехсосудистое	57 (22,4 %)
– отсутствие атеросклеротического поражения	18 (7 %)
Количество гемодинамически значимых стенозов, М $\pm$ SD	2,20 $\pm$ 1,38
Индекс GENSINI, М $\pm$ SD	48,27 $\pm$ 39,55
Индекс SYNTAX, М $\pm$ SD	13,90 $\pm$ 8,27

мой группе преобладали мужчины – 211 больных (82,7 %), женщин было 44 (17,3 %). Клиническая и демографическая характеристика больных приведена в таблице 1.

Молекулярно-генетические исследования.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов венозной крови фенол-хлороформным методом. Полиморфизм генов тестировали с помощью ПЦР в режиме реального времени в соответствии с протоколом фирмы производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems, USA) на приборе AB 7900HT. В исследовании изучались два ОНП, расположенные в локусе 9p21.3 – rs10757278 и rs1333049.

Статистическая обработка

полученных данных выполнялась при помощи программы SPSS, версии 19.0. Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных признаков в виде процентных долей и их стандартных ошибок, для количественных – в виде средних арифметических (М) и стандартных отклонений (σ). Значимость различий качественных признаков в группах наблюдения оценивали при помощи непараметрического критерия χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность. При частоте встречаемости признака 5 и менее использовался точный критерий Фишера. Для оценки значимости статистических различий по количественным признакам проводили сравнение групп по непараметрическому ранговому критерию Манна-Уитни. Различия во всех случаях оценивали, как статистически значимые при $p < 0,05$.

Для оценки риска развития инфаркта миокарда по конкретному аллелю или генотипу производили оценку отношения шансов в таблицах сопряженности 2x2 с расчетом доверительных интервалов.

Ангиография коронарных артерий проводилась на аппарате Philips Allura Xper FD10. Помимо стандартного протокола полипроекционной коронарографии всем больным в заслепленном режиме для оценки степени тяжести поражения коронарного русла производился простой счет количества пораженных сегментов КА и рассчитывались индексы Gensini и SYNTAX.

Простой счет количества стенозов основывался на суммировании гемодинамически значимых (> 50 % просвета) стенозов в десяти сегментах коронарного русла (ствол левой КА, проксимальный, средний и дистальный сегменты каждой из магистральных артерий – огибающей ветви, передней межжелудочковой ветви левой КА и правой КА).

В индексе Gensini учитывается пятнадцать сегментов коронарного русла, к вышеперечисленным добавляются септальные, первая и вторая диагональные ветви передней нисходящей артерии, ветвь тупого края, задне-нисходящая артерии. Существенной особенностью индекса Gensini является учет функциональной значимости каждого стеноза. Сужению просвета до 25 % присваивается

1 балл, 25-50 % – 2, 50-75 % – 4, 75-90 % – 8, 90-99 % – 16, полной окклюзии – 32 балла. После этого полученное значение умножается на коэффициент от 0,5 до 5 в зависимости от локализации данного стеноза. При наличии нескольких стенозов полученные значения для каждого из них суммируются [12].

Для расчета индекса SYNTAX использовались не только величина и локализация, но и протяженность стеноза, наличие кальциноза КА и др. Другой отличительной особенностью шкалы SYNTAX является учет острой тромботической окклюзии без наличия атеросклеротических изменений в сосуде. Сумма баллов ≤ 22 отражает наименее тяжелое, 23-32 балла – среднее и ≥ 33 баллов – тяжелое поражение коронарного русла [13].

Результаты и обсуждение.

Из 255 больных ИМ 96 (37,7 %) имели поражение одной КА, 84 (32,9 %) двухсосудистый и 57 (22,4 %) трехсосудистый тип поражения, у 10 (3,9 %) пациентов были выявлены интактные КА, у 8 (3,1 %) из них найдена тромботическая окклюзия без атеросклеротических изменений в КА. Пациенты без атеросклеротических изменений КА были исключены из дальнейшего статистического учета. В случае наличия чрескожных коронарных вмешательств в анамнезе больных (5,5 %) расчет индексов не производился.

Генотипами риска исследуемых ОНП являлись генотип CC rs1333049 и генотип GG rs10757278. Нами не выявлено статистически значимой ассоциации между вариантами генотипов локуса 9p21.3 и количеством пораженных сосудов. Тем не менее, среди больных с трехсосудистым типом поражения генотип CC rs1333049 выявлен у 32,0 % против 21,0 % больных с одно- и двухсосудистым поражением. Генотип GG rs10757278 – у 33,3 % больных с трехсосудистым поражением против 23,3 % больных с одно- и двухсосудистым поражением. Суммарное количество стенозов у гомозигот по аллелю риска rs1333049 и rs10757278 было выше, но не было статистически значимо. Однако в наиболее тяжелой группе больных с наличием более трех стенозов достоверно преобладали пациенты с генотипами CC rs1333049 (42,2 % против 21,5 % в группе 1-3 стенозов, $p = 0,005$) и GG rs10757278 (36,6 % против 20,7 % в группе 1-3 стенозов, $p = 0,005$). Отношение шансов наличия более трех стенозов вдвое выше при генотипе CC rs1333049 (ОШ 2,10 95 % ДИ 1,26-3,50) и генотипе GG rs10757278 (ОШ 2,21 95 % ДИ 1,06-4,61).

Интегральным показателем тяжести поражения коронарного русла в данном случае можно считать индекс Gensini, учитывающий не только количество, но и гемодинамическую значимость различных стенозов. Носители генотипов CC rs1333049 и GG rs10757278 имели достоверно более высокие значения индекса Gensini в сравнении

Таблица 2. Ассоциация полиморфных вариантов генов rs1075728 и rs1333049 с ангиографическими характеристиками коронарного атеросклероза.

	rs 1075728			*p	rs 1333049			#p
	AA	AG	GG		GG	CG	CC	
Поражение ствола ЛКА, n (%)	6 (27,3 %)	5 (22,7 %)	11 (50,0 %)	0,002	5 (23,8 %)	6 (27,3 %)	11 (50,0 %)	0,004
ОШ (95 % ДИ)	3,75 (1,53-9,22)				3,16 (1,41-7,07)			
Суммарное количество стенозов, M±SD	2,08±1,34	2,19±1,24	2,38±1,50	0,238	2,00±1,41	2,17±1,27	2,44±1,55	0,105
Наличие более трех стенозов, n (%)	10 (24,4 %)	16 (39,0 %)	15 (36,6 %)	0,031	9 (20,0 %)	17 (37,8 %)	19 (42,2 %)	0,005
ОШ (95 % ДИ)	2,21 (1,06-4,61)				2,10 (1,26-3,50)			
Индекс Gensini, M±SD	48,94±43,89	45,02±34,67	59,40±45,07	0,031	45,98±43,69	43,84±34,74	58,13±45,24	0,019
Значение индекса Gensini ≥70 баллов	13 (20,3 %)	30 (46,9 %)	21 (32,8 %)	0,048	10 (15,4 %)	30 (46,1 %)	25 (38,5 %)	0,006
ОШ (95 % ДИ)	1,38 (1,11-2,42)				1,78 (1,19-2,65)			
Индекс SYNTAX, M±SD	13,68±8,59	13,73±7,90	15,53±9,08	0,161	13,45±8,78	13,38±7,86	15,44±9,15	0,100
Трехсосудистое поражение КА, n (%)	8 (16,2 %)	26 (51,8 %)	16 (32,0 %)	0,111	8 (14,8 %)	28 (51,9 %)	18 (33,3 %)	0,138
Диффузное поражение КА, n (%)	9 (17,0 %)	32 (60,4 %)	12 (22,6 %)	0,820	9 (15,5 %)	36 (62,1 %)	13 (22,4 %)	0,494
Кальцификация КА, n (%)	2 (14,3 %)	11 (78,6 %)	1 (7,1 %)	0,125	2 (14,3 %)	11 (78,6 %)	1 (7,1 %)	0,095

* статистически значимые различия по конкретному признаку между носителями генотипа GG rs1075728
 # статистически значимые различия по конкретному признаку между носителями генотипа CC rs1333049

Таблица 3.

Индекс GENSINI	0–30 баллов	30–69 баллов	70–99 баллов	100 и более баллов
rs1075728 генотип GG	14 (18,2 %)*	20 (22,2 %)*	12 (30,8 %)*	9 (36,0 %)*
rs1333049 генотип CC	18 (21,4 %)*	19 (20,9 %)*	15 (36,6 %)*	10 (41,7 %)*
Шкала SYNTAX	легкая степень (0–22 балла)	средней степени (23–32 балла)	тяжелое поражение (>32 баллов)	
rs1075728 генотип GG	44 (22,8 %)*	7 (24,1 %)*	4 (44,4 %)*	—
rs1333049 генотип CC	48 (23,9 %)*	10 (33,3 %)*	4 (44,4 %)*	—
Количество стенозов	1–2 стеноза	3–4 стеноза	5–6 стенозов	
rs1075728 генотип GG	30 (21,4 %)*	21 (25,9 %)*	4 (40,0 %)*	—
rs1333049 генотип CC	34 (22,9 %)*	22 (27,8 %)*	6 (46,2 %)*	—

*Указано абсолютное количество носителей генотипа риска (генотипа GG rs1075728 и генотипа CC rs1333049) и доля от общего количества обследованных, имеющих данный признак.



с пациентами, имевшими в генотипе лишь один аллель риска или не имевшие их вовсе. Отношение шансов тяжелого поражения коронарного русла (индекс Gensini ≥ 70 баллов) составило 1,78 (95 % ДИ 1,19-2,65) для CC rs1333049 и 1,38 (95 % ДИ 1,11-2,42) для GG rs10757278. Значения индекса SYNTAX было выше у носителей генотипов риска обоих изучаемых ОНП, однако различия не были достоверными. Вероятной причиной этого является включение острого тромбоза без атеросклеротических изменений КА при расчете индекса SYNTAX, в то время как индекс Gensini рассчитывался только у пациентов с атеросклерозом КА. В отношении кальцификации, диффузного поражения КА существенных различий в распределении частот генотипов rs10757278 и rs1333049 нами не обнаружено. Результаты представлены в таблице 2.

Отдельного внимания заслуживает ассоциация ОНП локуса 9p21.3 с поражением ствола левой КА. Всего этот тяжелый вариант поражения КА был выявлен у 22 из 255 больных (8,6 %). При этом половина из них одновременно были носителями генотипа CC rs1333049 и генотипа GG rs10757278.

Носители этих 2 генотипов имели втрое более высокий риск развития стеноза ствола левой КА: для генотипа CC rs1333049 ОШ = 3,16 (95 % ДИ 1,41-7,07) и для генотипа GG rs10757278 ОШ = 3,75 (95 % ДИ 1,53-9,22).

Представленные в таблицах 2 и 3 данные отражают практически полное совпадение в распределении носителей генотипов риска (генотипа GG rs10757278 и генотипа CC rs1333049) как по тяжести, так и по характеру атеросклеротического поражения коронарного русла. Изучаемые ОНП rs1333049 и rs10757278 расположены достаточно близко – на расстоянии 1025 нуклеотидных пар. Оба генотипа риска GG rs10757278 и CC rs1333049 являются мультиколлинеарными, связь между ними приближается к линейной зависимости ($r = 0,949$). Очевидно, что ОНП rs10757278 и rs1333049 в нашей популяции входят в один блок сцепления и соответственно достаточно генотипирования одного ОНП. Таким образом, в нашей работе впервые в российской популяции подтверждена связь локуса 9p21.3 с тяжестью коронарного атеросклероза.

Список литературы.

1. Максимов В.Н., Куликов И.В., Орлов П.С. и др. Проверка взаимосвязи между девятью однонуклеотидными полиморфизмами и инфарктом миокарда на сибирской популяции. Вестник РАМН 2012; 5: 24-29.
2. Шестерня П.А., Шульман В.А., Никулина С.Ю. и др. Предикторная роль полиморфизмов хромосомы 9p21.3 и их взаимосвязь с отягощенной наследственностью в развитии инфаркта миокарда. Российский кардиологический журнал 2012; 6(98): 14-18.
3. Prins B.P., Lagou V., Asselbergs F.W. et al. Genetics of coronary artery disease: genome-wide association studies and beyond. Atherosclerosis 2012; 225 (1): 1-10.
4. Deloukas P., Kanoni S., Willenborg C. et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. Nature Genetics 2012; 45 (1): 25-33.
5. Schunkert H., Erdmann J., Samani N.J. Genetics of myocardial infarction: a progress report. Eur. Heart J. 2010; 31(8): 918-925.
6. Buysschaert I., Carruthers K.F., Dunbar D.R. 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: 1132-1141.
7. Patel R.S., Su S., Neeland I.J. et al. The chromosome 9p21 risk locus is associated with angiographic and progression of coronary artery disease. Eur Heart J. 2010; 31: 3017-3023.
8. Dandona S., Stewart A.F.R., Chen L. et al. Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 2010; 56: 479-486.
9. Chan K., Motterle A., Laxton R.C. et al. Common variant on chromosome 9p21 predict severity of coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 2011; 57: 1497-1498.
10. Adrissino D., Berzuini C., Merlini P.A. et al. Influence of 9p21.3 genetic variants on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2011; 58(4): 426-434.
11. Chan K., Patel R.S., Newcombe P. et al. Association Between the Chromosome 9p21 Locus and Angiographic Coronary Artery Disease Burden. A Collaborative Meta-Analysis. J Am Coll Cardiol. 2013; 61(4): 957-970.
12. Montorsi P., Ravagnani P.M., Galli S. et al. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial. Eur Heart J. 2006; 27: 2632-2639.
13. Sianos G., Morel M.A., Kappetein A.P. et al. The SYNTAX score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. EuroIntervention 2005; 1: 219-227.