

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ХРОМОСОМЫ 9P21.3 С ЦЕЛЬЮ СТРАТИФИКАЦИИ РИСКА ИНФАРКТА МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

П.А. Шестерня, С.Ю. Никулина, В.А. Шульман, Е.А. Мартынова, А.И. Демкина, В.В. Козлов
ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Контакты: Павел Анатольевич Шестерня shesternya75@mail.ru

Цель исследования — изучить возможность использования генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) rs10757278 и rs1333049 локуса 9p21.3 в стратификации риска развития инфаркта миокарда (ИМ) по шкале SCORE у пациентов молодого возраста (до 45 лет).

Материалы и методы. Группа больных с ИМ ($n = 103$) и группа контроля ($n = 111$) не имели статистически значимых различий по полу, возрасту, наличию артериальной гипертензии, сахарного диабета, гиперхолестеринемии, избыточной массы тела и ожирения, абдоминального типа ожирения и анамнезу курения. Геномную ДНК выделяли из венозной крови фенол-хлороформным методом. Генетическое тестирование проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (TagMan, AB 7900HT).

Результаты. Выявлена статистически значимая ассоциация rs1333049 и rs10757278 с развитием ИМ. Отношение шансов развития ИМ у носителей аллеля риска С rs1333049 составило 2,53 (95 % доверительный интервал 1,31–4,89), у носителей аллеля риска G rs10757278 — 2,11 (95 % доверительный интервал 1,11–4,01). Статистическая значимость сохранялась и при учете отягощенного семейного анамнеза. С помощью метода множественной логистической регрессии установлено, что наличие в генотипе аллеля С rs1333049 обладало большим предсказательным значением в сравнении с высоким/очень высоким риском фатальных и нефатальных событий по шкале SCORE.

Заключение. ОНП rs1333049 и rs10757278 локуса 9p21.3 являются предикторами ИМ у пациентов молодого возраста, не зависящими как от «традиционных» факторов риска, так и от отягощенного семейного анамнеза. С учетом характера сцепления в нашей популяции достаточно генотипирования одного из них — rs1333049.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, однонуклеотидный полиморфизм, SCORE, предикторы, 9p21.3

PROSPECTS FOR THE USE OF GENOTYPING FOR CHROMOSOME 9P21.3 POLYMORPHISMS FOR MYOCARDIAL INFARCTION RISK STRATIFICATION IN YOUNG PEOPLE

P.A. Shesternya, S.Yu. Nikulina, V.A. Shulman, E.A. Martynova, A.I. Demkina, V.V. Kozlov
Prof. V.F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia

Objective: to study whether genotyping for single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs10757278 and rs1333049 on the 9p21.3 locus may be applied to myocardial infarction (MI) risk stratification using the SCORE scale in young people (less than 45 years).

Subjects and methods. A group of patients with MI ($n = 103$) and a control group ($n = 111$) showed no statistically significant differences in gender, age, hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, overweight and obesity, abdominal obesity, and smoking history. The phenol-chloroform method was employed to extract genomic DNA from venous blood. Genetic tests were carried out using real-time polymerase chain reaction systems (TagMan and AB 7900HT).

Results. There was a statistically significant association of rs1333049 and rs10757278 with the development of MI. The odds ratio for the latter was 2.53 (95 % confidence interval (CI) 1.31–4.89) in carriers of the risk allele C of rs1333049 and 2.11 (95 % CI 1.11–4.01) in those with the risk allele G of rs10757278. The statistical significance also remained with consideration for the family history of MI. Multiple logistic regression analysis established that the presence of the C allele of rs1333049 in the genotype was of great predictive value as compared with the high/very high risk of fatal and nonfatal events according to the SCORE scale.

Conclusion. SNPs 1333049 and rs10757278 on the 9p21.3 locus are the predictors of MI in young people, which are independent of both traditional risk factors and family history. Having regard to the pattern of an association, it will suffice to genotype one of them, namely rs1333049, in our population.

Key words: myocardial infarction, single nucleotide polymorphism, SCORE, predictors, 9p21.3

Введение

Огромное социально-экономическое бремя сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) обусловлено не только прямыми затратами на здравоохранение, но и в гораздо большей степени ущербом, связанным с преждевременной смертностью в трудоспособном возрасте [1]. Абсолютным лидером среди ССЗ является ишемическая болезнь сердца (ИБС), удельный вес которой в структуре смертности от ССЗ составляет более половины, при этом значительное увеличение темпов роста заболеваемости ИБС и смертности от нее начинается с 45-летнего возраста [2, 3].

Комплекс профилактических мер, наглядно продемонстрировавший свою эффективность по снижению заболеваемости и смертности от ССЗ, не позволяет в полном объеме решать задачи первичной профилактики среди населения молодого и среднего возраста. Во многом это обусловлено сложностью оценки степени риска ССЗ, в том числе и с помощью расчета относительного риска по шкале SCORE, у молодых людей [4–6]. У значительной части пациентов в молодом возрасте ИБС дебютирует развитием инфаркта миокарда (ИМ) с высоким уровнем догоспитальной летальности, в ряде случаев при этом выявляются интактные коронарные артерии [7–9]. Таким образом, проблема профилактики и поиска прогностических маркеров ИМ у пациентов молодого и среднего возраста остается крайне актуальной.

В исследованиях последних лет на основе анализа полного генома выявлены новые однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), ассоциированные с развитием ИБС и ИМ. Однако наиболее строгий и достоверный генетический предиктор развития ИМ, известный к настоящему времени, локализован в хромосоме 9p21.3. Особая роль этого региона генома человека в развитии ИБС и ИМ подтверждена в различных этнических группах, в том числе результатами метаанализов [10–16]. Выявлена также ассоциация локуса 9p21.3 с развитием ИБС в молодом возрасте [17–19]. Есть данные о взаимосвязи локуса 9p21.3 с отягощенной наследственностью [20]. Однако лишь в единичных работах проводился жесткий отбор с ограничением возраста больных, имеющих ИМ как наиболее тяжелое проявление ИБС [21]. По нашему мнению, возрастной ценз имеет принципиальное значение. В этом случае можно предполагать большую роль не средовых, а именно генетических факторов, взаимодействие которых со средовыми факторами реализуется в развитии заболевания.

Цель исследования — изучить возможность использования генотипирования ОНП *rs10757278* и *rs1333049* локуса 9p21.3 в стратификации риска развития ИМ у пациентов молодого возраста.

Материалы и методы

В исследование включались пациенты с верифицированным ИМ. Критериями включения были также

возраст ≤ 45 лет, европеоидная раса и наличие информированного согласия. Протокол исследования одобрен этическим комитетом КрасГМУ.

За период с 01.01.2009 по 30.06.2010 в исследовании приняли участие 103 больных с ИМ (94 мужчины и 9 женщин) в возрасте от 22 до 45 лет (средний возраст $40,03 \pm 5,02$ года). Группу контроля составили 111 человек (103 мужчины и 8 женщин) в возрасте от 25 до 45 лет (средний возраст $40,67 \pm 4,72$ года; квартили 25 %, 50 % и 75 % составили соответственно 39,0; 42,6 и 44,2 года) с исключенной ИБС на основании стандартного опросника Rose. Программа обследования всех участников включала: измерение артериального давления, антропометрию (рост, масса тела, окружность талии), анамнез курения, исследование уровня общего холестерина, семейный анамнез ИБС, 12-канальную электрокардиографию покоя.

Группы статистически не различались по возрасту ($p = 0,351$) и полу ($p = 0,679$), а также по таким общепризнанным факторам риска ИБС, как: артериальная гипертензия ($p = 0,766$), сахарный диабет ($p = 0,395$), гиперхолестеринемия ($p = 0,696$), избыточная масса тела и ожирение ($p = 0,361$), абдоминальный тип ожирения ($p = 0,831$), анамнез курения ($p = 0,400$). Гиперхолестеринемия диагностировалась при уровне общего холестерина $> 5,0$ ммоль/л. При определении избыточной массы тела и ожирения использовали классификацию ВОЗ, основанную на вычислении индекса массы тела (ИМТ) по формуле Quetelet [масса тела (кг)/рост (м)²]. Нормальную массу тела диагностировали при ИМТ 18,5–24,9 кг/м², избыточную — при ИМТ 25,0–29,9 кг/м², ожирение — при ИМТ ≥ 30 кг/м². Абдоминальный тип ожирения определяли при окружности талии > 94 см у мужчин и > 80 см у женщин. Исследуемая группа и группа контроля статистически значимо различались по отягощенной наследственности по ИБС ($p < 0,001$). Характеристика групп представлена в табл. 1.

Молекулярно-генетические исследования

Геномную ДНК выделяли из 10 мл венозной крови фенол-хлороформным методом [22]. Полиморфные варианты *rs10757278* и *rs1333049* тестировали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Использовали праймеры и зонды TaqMan (Applied Biosystems) на приборе AB 7900HT.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программы SPSS 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 Пирсона χ^2 с по-

Таблица 1. Сравнительная характеристика исследуемых групп

Признаки	Больные ИМ	Контроль	p
Возраст, годы	40,03 ± 5,02	40,67 ± 4,72	0,351
Пол, n (%): мужской женский	94 (91,3) 9 (8,7)	103 (92,8) 8 (7,2)	0,679
ИМТ, n (%): 18,5–24,9 кг/м ² 25–29,9 кг/м ² ≥ 30 кг/м ²	24 (24,2) 48 (48,5) 27 (27,3)	30 (27,0) 59 (53,2) 22 (19,8)	0,346
Избыточная масса тела и ожирение, n (%): нет (ИМТ 18,5–24,9 кг/м ²) есть (ИМТ ≥ 25 кг/м ²)	24 (24,2) 75 (75,8)	30 (27,0) 81 (73,0)	0,361
Абдоминальный тип ожирения, n (%)	62 (62,6)	67 (60,4)	0,831
Анамнез курения, n (%): нет есть в прошлом	26 (26,3) 64 (64,6) 9 (9,1)	36 (32,4) 67 (60,4) 8 (7,2)	0,400
Гипертоническая болезнь в анамнезе, n (%)	62 (62,6)	71 (64,0)	0,766
Сахарный диабет в анамнезе, n (%)	7 (7,1)	12 (10,8)	0,395
Гиперхолестеринемия, n (%)	58 (59,6)	68 (61,3)	0,696
Отягощенная наследственность по ИБС, n (%)	56 (61,5)	35 (33,7)	< 0,001

правкой на непрерывность. При частоте встречаемости признака 5 и менее использовали точный критерий Фишера. Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Для оценки риска развития ИМ по конкретному аллелю или генотипу определяли отношение шансов (ОШ) в таблицах сопряженности 2×2 с расчетом доверительных интервалов (ДИ).

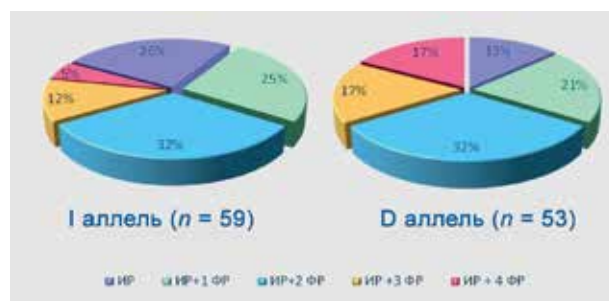
Проверку нормальности распределения значений переменных в группах наблюдения проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. При подтверждении нормального распределения значений переменных в исследуемых группах проверку статистической значимости различий проводили при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Для оценки значимости статистических различий между исследуемыми группами при отсутствии нормального распределения переменных проводили сравнение групп по непараметрическому ранговому критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

При анализе распределения частот генотипов исследуемых ОНП было определено, что и *rs1333049*, и *rs10757278* ассоциировались с ИМ. Аллелями риска ИМ являлись аллель С (генотипы CC + CG) *rs1333049* и аллель G (генотипы AG + GG) *rs10757278*. Носителей аллеля С *rs1333049* в группе ИМ было 81,9 %, в контрольной группе – 64,2 % ($p = 0,005$). Частота аллеля G *rs10757278* в группе больных с ИМ также была достоверно выше (79,6 %) в сравнении с контрольной группой (64,8 %, $p = 0,021$).

Мы выявили, что у носителей аллеля риска С *rs1333049* риск в сравнении с пациентами, имеющими генотип GG, был в 2,5 раза выше (ОШ = 2,53; 95 % ДИ 1,31–4,89). Вдвое больший риск имели и носители аллеля G *rs10757278* в сравнении с гомозиготным AA вариантом генотипа (ОШ = 2,11; 95 % ДИ 1,11–4,01).

Теоретически при наличии у одного человека аллелей риска одновременно в двух ОНП можно предполагать более высокий риск развития заболевания. Однако для этого должен соблюдаться целый ряд условий. Одно из таких условий – независимая передача потомству или отсутствие сцепления. В нашем случае *rs1333049* и *rs10757278* расположены достаточно близко – 1025 н.п. ОШ развития ИМ при наличии обоих аллелей риска – С *rs1333049* и G *rs10757278* – составило 2,50 (95 % ДИ 1,27–4,83) и практически не отличалось от такового при наличии только аллеля С *rs1333049* (рисунок).



ОШ развития ИМ

Таблица 2. Стратификация степени риска в исследуемых группах

Группа	Больные с ИМ	Контроль
Суммарный кардиоваскулярный риск смерти (калькулятор SCORE), n (%):		
низкий (< 1 %)	29 (28,2)	38 (34,2)
умеренный (1–5 %)	19 (18,4)	52 (46,8)
высокий (5–10 %)	12 (11,7)	9 (8,1)
очень высокий (≥ 10 %)	43 (41,7)	12 (10,8)
Риск фатальных и нефатальных событий, n (%):		
низкий и умеренный	29 (28,1)	38 (34,2)
высокий и очень высокий	74 (71,9)	73 (65,8)

Вероятно, эти ОНП в нашей популяции входят в один блок сцепления, и соответственно достаточно генотипирования одного ОНП. Блоки сцепления в разных популяциях могут различаться. Это и является одной из главных причин расхождений результатов ассоциативных исследований в разных популяциях. Что касается изучаемых ОНП *rs1333049* и *rs10757278*, то почти полное их сцепление отмечено и в других работах последних лет [21, 23].

Учитывая различие между группами ИМ и контроля по отягощенному семейному анамнезу ИБС, мы проанализировали взаимосвязь ОНП локуса 9p21.3 с отягощенной наследственностью. По нашим данным, предикторная роль ОНП хромосомы 9p21.3 не зависела от наличия семейного анамнеза. Более того, риск развития ИМ у пациентов без отягощенного семейного анамнеза по ИБС был существенно выше, чем в целом в группе. Так, ОШ развития ИМ у носителей аллеля риска *C rs1333049* составило 4,25 (95 % ДИ 1,39–12,99), у носителей аллеля риска *G rs10757278* несколько меньше – 3,04 (95 % ДИ 1,09–8,52).

У всех участников был оценен риск фатальных и нефатальных событий в течение ближайшего десятилетия по шкале SCORE. Для этого суммарный кардиоваскулярный риск, рассчитанный по шкале SCORE для стран с высоким риском ССЗ, увеличивали в 3 раза для мужчин и в 4 раза для женщин. У пациентов моложе 40 лет использовалась шкала относительного риска [5]. Соотношение данных между группами ИМ и контроля представлено в табл. 2.

Таблица 3. Переменные в уравнении

Критерий (переменная)	В	Стандартная ошибка	Статистика Вальда (χ^2)	Значение p	Exp(B)	95 % ДИ для Exp(B)	
						нижний	верхний
Высокий риск	0,354	0,316	1,257	0,262	1,424	0,09	0,49
Аллель <i>C rs1333049</i>	0,952	0,338	7,948	0,005	2,592	1,21	4,81
Константа	–2,373	0,840	7,971	0,005	0,093		

Таким образом, очевидно, что если бы оценка риска проводилась до сосудистой катастрофы (ИМ), то практически половина больных с ИМ (46,6 %) имели бы низкий и умеренный риск смерти и 28,1 % больных имели бы низкий и умеренный риск как фатальных, так и нефатальных сердечно-сосудистых событий по шкале SCORE.

Для оценки возможности использования предсказательной роли данных генетических маркеров риска был использован метод множественного логистического регрессионного анализа. У исследуемых пациентов в качестве возможных предикторов оценивали относительный риск фатальных и нефатальных событий по шкале SCORE и наличие аллеля *C rs1333049*. Данные предикторы не являются коллинеарными и взаимосвязанными.

Методом пошагового исключения прогностических факторов с определением минимального набора предикторов получена логистическая регрессионная модель:

$$\text{Вероятность инфаркта (y)} = \frac{1}{1 + e^{-(1,73 + 0,93x_i)}},$$

где x_i – наличие аллеля *C rs1333049* ($b_4 = 0,93$) при константе $-1,73$.

На первом шаге создания модели доля корректных предсказаний при наличии у пациента аллеля *C rs1333049* для отсутствия ИМ составила 35,8 %, а для его наличия – 81,9 %. Общая доля корректных предсказаний – 70,0 %. При этом коэффициент аппроксимации (квадрат Нейджелкерка) $R^2 = 0,053$ свидетельствует о том, что включение наличия в геноме человека аллеля *C rs1333049* позволило бы перевести в группу высокого риска дополнительно 5,3 % пациентов.

Принудительное включение в логистическую регрессионную модель наличия высокого риска фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых событий показало несостоятельность этого критерия в прогнозировании развития ИМ в сравнении с генетическим предиктором *rs1333049* (табл. 3).

Заключение

Впервые в России изучена ассоциативная связь ОНП *rs1333049* и *rs10757278* локуса хромосомы 9p21.3 с развитием ИМ у пациентов молодого возраста.

Аллели риска *C rs1333049* и *G rs10757278* являются предикторами ИМ вне зависимости от наличия традиционных средовых факторов риска и отягощенной наследственности. Вероятно, эти ОНП в нашей популяции входят в один блок сцепления, поскольку суммирование генотипов риска *rs1333049* и *rs10757278* не имеет преимуществ в плане предсказательного значения перед одним из них — *rs1333049*.

Практическим приложением геномной информации может быть ее интеграция в имеющиеся шкалы оценки риска и разработка клинико-генетических

рискометров. Данное направление является одним из наиболее перспективных в определении индивидуального риска развития заболевания. В результате сопоставления с используемым в России калькулятором риска SCORE носительство аллеля риска *C rs1333049* обладало большим предсказательным значением, чем наличие высокого и очень высокого риска в сравнении с низким и умеренным риском. Для уточнения роли генетических предикторов в развитии мультифакториальных заболеваний необходимы дополнительные и более масштабные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Оганов Р.Г., Концевая А.В., Калинина А.М. Экономический ущерб от сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации. Кардиоваскул тер и профил 2011;10(4):4–9.
- Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Демографические тенденции в Российской Федерации: вклад болезней системы кровообращения. Кардиоваскул тер и профил 2012;11(1):5–10.
- Федеральная служба государственной статистики http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/demography.
- Зволинская Е.Ю., Александров А.А. Оценка риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у лиц молодого возраста. Кардиология 2010;50(8):37–47.
- Кардиоваскулярная профилактика. Российские рекомендации ВНОК. Кардиоваскул тер и профил 2011;6(Прил 2):7–64.
- Осипов А.Г., Силкина С.Б., Правдина Е.А. и др. Факторы риска и относительный коронарный риск у лиц молодого возраста. Кардиоваскул тер и профил 2012;1(S1):41–2.
- Гафаров В.В., Громова Е.А., Гафарова А.В. и др. Инфаркт миокарда и стресс на работе и в семье: 10-летний риск возникновения в открытой популяции мужчин 25–64 лет (эпидемиологическое исследование в рамках программы ВОЗ «MONICA-PSYCHOSOCIAL»). Кардиология 2011;51(3):10–6.
- Голофеевский В.Ю., Сотников А.В., Яковлев В.В., Литвиненко В.А. Особенности течения инфаркта миокарда в молодом и среднем возрасте. Клин мед 2009;87(2):21–4.
- Сафарова М.С., Ежов М.В., Лупанов В.П. и др. Инфаркт миокарда у молодого мужчины без классических факторов риска атеросклероза. Кардиоваскул тер и профил 2010;9(5):86–90.
- Schunkert H., König I.R., Kathiresan S. et al. Large-scale association analyses identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. Nat Genet 2011;43(4):333–8.
- Максимов В.Н., Куликов И.В., Орлов П.С. и др. Проверка взаимосвязи между девятью однонуклеотидными полиморфизмами и инфарктом миокарда на сибирской популяции. Вестн РАМН 2012;5(5):24–9.
- Franceschini N., Carty C., Buzkova P. et al. Association of genetic variants and incident coronary heart disease in multiethnic cohorts: the PAGE study. Circ Cardiovasc Genet 2011;4(6):661–72.
- 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;72(8):1213–7.
- Koch W., Türk S., Erl A. et al. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population. Atherosclerosis 2011;217(1):220–6.
- Maitra A., Dash D., John S. et al. A common variant in chromosome 9p21 associated with coronary artery disease in Asian Indians. J Genet 2010;88(1):113–8.
- Shen G.Q., Rao S., Martinelli N. et al. Association between four SNP's on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. J Hum Gen 2008;53(2):144–50.
- Chen Z., Qian Q., Ma G. et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of early-onset coronary artery disease. Mol Biol Rep 2009;36(5):889–93.
- Ellis K.L., Pilbrow A.P., Frampton C.M. 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.
- McPherson R. Chromosome 9p21 and coronary artery disease. N Engl J Med 2010;362(18):1736–7.
- Scheffold T., Kullmann S., Hüge A. et al. Six sequence variants on chromosome 9p21.3 are associated with a positive family history of myocardial infarction: a multicenter registry. BMC Cardiovasc Disord 2011;11(1):9.
- Adriano 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):426–34.
- Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. В кн.: Анализ генома. Под ред. К. Дейвиса (пер. с англ.). М.: Мир, 1990. С. 58–94.
- Virani S.S., Brautbar A., Lee V.V. et al. Chromosome 9p21 single nucleotide polymorphisms are not associated with recurrent myocardial infarction in patients with established coronary artery disease. Circ J 2012;76(4):950–6.