

Л.В. Григорьева, А.Н. Романова, Е.С. Кылбанова,
Н.В. Махарова, Л.В. Тарабукина

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ С ИНФАРКТМ МИОКАРДА

Цель исследования. Определение частот генотипов и аллелей, а также анализ ассоциаций полиморфизмов *eNOS VNTR*, *AT1R 1166FA/C*, *ACE I/D*, *ApoE Arg158Cys*, *Cys112Arg*, *ApoB XbaI* и *EcoRI* в определении риска развития инфаркта миокарда в популяции якутов.

Материалы и методы. Методом полимеразной цепной реакции и ПДРФ исследованы частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов-кандидатов ССЗ в популяции якутов; проведен анализ ассоциаций с риском развития инфаркта миокарда у мужчин якутской национальности.

Результаты. В популяции якутов по результатам исследования выявлены ассоциации с риском развития инфаркта миокарда по следующим полиморфным локусам генов-кандидатов ССЗ ($P < 0.05$): *AT1R 1166A/C*, *ApoB XbaI*, *eNOS VNTR*. Прослеживаются различия на уровне выраженной тенденции ($0.05 < P < 0.1$) между группами контроля и больных по следующим полиморфным локусам *ApoE Arg158Cys*, *Cys112Arg*, *ACE I/D*.

Заключение. Выявлены ассоциации с инфарктом миокарда в якутской популяции полиморфизмов *AT1R 1166A/C*, *ApoB XbaI*. Аллель *eNOS*А* полиморфизма *eNOS VNTR* является маркером повышенного риска инфаркта миокарда.

Ключевые слова. Полиморфизм, анализ ассоциаций, гены-кандидаты, инфаркт миокарда.

Purpose. Determination of genotype and allele rates, analysis of associations of polymorphisms *eNOS VNTR*, *AT1R 1166FA/C*, *ACE I/D*, *ApoE Arg158Cys*, *Cys112Arg*, *ApoB XbaI* and *EcoRI* for determining risk of myocardial infarction process in yakut population.

Methods. Allele and genotype rates of polymorphisms of cardiovascular disease (CVD) gene-candidates in yakut population were studied by a method of polymer chain reaction and RFLP; analysis of associations with risk of myocardial infarction process in men of yakut nationality was conducted.

Results. In the yakut population we detected associations with risk of myocardial infarction process in such polymorphisms of CVD gene candidates ($P < 0.05$) as: *AT1R 1166FA/C*, *ApoB XbaI* and *EcoRI*, *eNOS VNTR*. Distinctions between polymorphisms of *ApoE Arg158Cys*, *Cys112Arg*, *ACE I/D* of control group and patients were observed at a level of tendency.

Conclusion. Associations of polymorphisms *AT1R 1166FA/C*, *ApoB XbaI* with myocardial infarction were detected in the yakut population. Allele *eNOS*А* of polymorphism *eNOS VNTR* is noted as a marker of MI high risk.

Key words. Polymorphism, analysis of associations, gene-candidates, myocardial infarction.

Введение

В последнее десятилетие активно проводится поиск генов-кандидатов многофакторных заболеваний в популяциях разных народов мира, и результаты таких исследований можно рассматривать как ориентиры для проведения аналогичных исследований в популяции якутов. В связи с особенностями генетической структуры якутского этноса структура наследственной предрасположенности к

многофакторным заболеваниям, в частности к сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ), может быть достаточно своеобразной. На основании данных, полученных при изучении ССЗ с простыми формами наследования, а также исходя из современных представлений о патофизиологических механизмах атеросклероза, можно выделить группы генов, нарушения структуры и функционирования которых могут вносить вклад в развитие инфаркта миокарда. В настоящее время описано более 250 генов-кандидатов ССЗ, к ним относятся гены аполипопротеинов, ферментов и рецепторов липидного обмена, синтаз окиси азота, белков сосудистой стенки, факторов пролиферации клеток, компонентов системы свертывания крови, белков ренин-ангиотензинальдостероновой системы, ферментов антиоксидантной

защиты, и многие другие.

Целью настоящего исследования является определение частот генотипов и аллелей, а также анализ ассоциаций полиморфизмов *eNOS VNTR*, *AT1R 1166FA/C*, *ACE I/D*, *ApoE Arg158Cys*, *Cys112Arg*, *ApoB XbaI* и *EcoRI* в определении риска развития инфаркта миокарда в популяции якутов.

Материалы и методы

В исследование включены мужчины якутской национальности (254 человек). Материал собран в период с 2003 по 2006 гг. Группа больных состояла из лиц в возрасте от 30 до 62 лет (средний возраст на момент обследования $50,8 \pm 0,62$ лет) с диагнозом ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз (102 человека). Материал собран в кардиологическом

ГРИГОРЬЕВА Лена Валерьевна – н.с. ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я); РОМАНОВА Анна Николаевна – м.н.с. ЯНЦ РАМН; КЫЛБАНОВА Елена Семеновна – к.м.н., зав. Отделом ЯНЦ РАМН; МАХАРОВА Наталья Владимировна – к.м.н., зав. лаб. ЯНЦ РАМН; ТАРАБУКИНА Любовь Васильевна – к.м.н., зав. отделением РБ №1-НЦМ.

Таблица 1

Тип полиморфизма, последовательность праймеров и номенклатура аллелей анализируемых ДНК-маркеров

Ген	Полиморфизм	Праймеры (рестриктаза)	Аллели/специфичности (размер фрагментов ДНК, п.о.)	Ссылка
<i>APOE</i>	<i>Arg158Cys; Cys112Arg</i>	5'-AGATGCGGGCACGGCTGTTCAAGGA-3' 5'-CCCTCGCGAGCCCCGGCCTGGTACAC-3' (HhaI)	<i>APOE*2</i> (91, 83), <i>APOE*3</i> (91, 48) <i>APOE*4</i> (91, 72)	[2]
<i>ApoB</i>	<i>XbaI</i>	5'-GGAGACTATTTCAGAAGCTAA-3' 5'-GAAGAGCCTGAAGACTGACT-3' (XbaI)	<i>ApoB*X-</i> (710) <i>ApoB*X+</i> (433, 277)	[4]
<i>ACE</i>	<i>EcoRI</i>	5'-CTGAGAGAAGTGTCTTCGAAG-3' 5'-CTCGAAAGGAAGTGAATCAC-3' (EcoRI)	<i>ApoB*E-</i> (480) <i>ApoB*E+</i> (253, 227)	[4]
	<i>I/D</i>	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	<i>ACE*I</i> (490) <i>ACE*D</i> (192)	[3]
<i>ATIR</i>	<i>1166A/C</i>	F 5'-CCTGCACCATGTTTTGAGGTTGAGTGAC-3' R 5'-AAAATAACAGGACAAAAGCAGGCAGGGAG-3' (BstDEI)	<i>ATIR*A</i> (352) <i>ATIR*C</i> (238 и 114)	[1]
<i>eNOS</i>	<i>VNTR</i>	5'-AGGCCCTATGGTAGTCCTTT-3' 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'	<i>eNOS*A</i> (4 повтора, 393 п.о.) <i>eNOS*B</i> (5 повторов, 427 п.о.) <i>eNOS*C</i> (3 повтора, 366 п.о.)	[6]

и кардиохирургическом отделении Республиканской больницы №1-Национальном центре медицины Республики Саха (Якутия), а также в ходе экспедиционных выездов в сельские районы. Критериями диагностики перенесенного крупноочагового инфаркта миокарда являлись медицинский анамнез, а также электро- и эхокардиографические признаки (наличие патологического зубца Q на электрокардиограмме, обнаружение зоны нарушения локальной сократимости миокарда по данным эхокардиографии).

В контрольную группу вошли практически здоровые лица в возрасте от 19 до 72 лет (средний возраст на момент обследования 48,1±0,8 лет), неродственные между собой и с группой больных (152 человека). Для исключения признаков ИБС в контрольной группе проведен опрос с помощью анкеты Роуза, а также электрокардиография.

Всеми обследуемыми дано письменное согласие на проведение молекулярно-генетических и других исследований в рамках данной работы.

Кровь на ДНК взята из локтевой вены. ДНК выделена стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере методом полимеразной цепной реакции с использованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров. Последующую рестрикцию эндонуклеазами проводили методом ПДРФ (полиморфизм длин рестриционных фрагментов) в зависимости от амплифицируемого локуса. Разделение фрагментов ДНК проводили при помощи элек-

трофореза в полиакриламидном или агарозном гелях. Перечень амплифицированных локусов, последовательности праймеров, размеры амплифицированных фрагментов представлен в табл. 1.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакетов программного обеспечения MS Excel 98 (Microsoft), "Statistica for Windows 5.0" (StatSoft). Соответствие наблюдаемых распределений частот генотипов теоретически ожидаемым по уравнению Харди-Вайнберга оценивали с использованием критерия χ^2 . При парном сравнении по частотам генотипов и аллелей группы больных с контрольной использовали точный критерий Фишера. Относительный риск оценивали по показателю соотношения шансов (odds ratio – OR) по формуле:

$$OR = (a \cdot d) / (b \cdot c),$$

где a – число лиц с наличием маркера, b – с отсутствием маркера среди больных; c и d – соответственно с наличием и отсутствием маркера среди здоровых; в том случае, когда один из показателей равен 0, принималась поправка на непрерывность – 0.5[5].

Результаты исследования

Возраст развития первого инфаркта миокарда составил в среднем 48,2±0,62 года. Клиническая характеристика больных представлена в табл. 2. У 101 больного (99%), на момент обследования имела стенокардия напряжения различных функциональных классов (ФК). По количеству возникновения инфаркта преобладали больные с одним инфарктом миокарда

(78,4%). С двумя ИМ – 18,4%, с тремя ИМ – 3% больных. По локализации инфаркта преобладал ИМ передней стенки (63,7%), затем нижней стенки – 18,6%, задней стенки – 17,6%, боковой стенки – 4,9%. Артериальное давление измерялось на фоне проводимого лечения, вследствие чего показатели АД не соответствовали степени артериальной гипертензии. Степень артериальной гипертензии выставлена по имеющемуся медицинскому анамнезу. Признаки гипертрофии левого желудочка выявлены у 40,2% больных. Регулярно курили на момент обследования 53,9% больных. За курящих считали больных, выкуривающих 1 и более сигарет в день. Злоупотребляющими алкоголем считали лиц, выпивающих регулярно более 1 у.е. в неделю (1 у.е. = 1 бутылка пива, 200 г вина, 50 г водки). В нашем исследовании на момент опроса злоупотребляли алкоголем 29,4% больных. Отягощенная наследственность по ИБС, ИМ, АГ и ОНМК у 71,6% отмечалась по близким родственникам больных (родители, сибсы).

Распределение частот генотипов и аллелей в контрольной группе и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда у мужчин якутской национальности представлено в табл. 3. Эмпирическое распределение частот генотипов соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0.040$, $P > 0.05$). В группе контроля наблюдается отклонение от ожидаемого распределения генотипов по локусу *ApoB EcoRI* ($P < 0.05$), количество носителей гетерозиготного генотипа *ApoB*R1/*R2* меньше 5%,

Таблица 2

Клиническая характеристика больных

Показатель	N	%	M±m
ИМТ <25 кг/м ²	14	13,7	23,1±0,46
ИМТ 25-30 кг/м ²	61	59,8	27,1±0,15
ИМТ >30 кг/м ²	27	26,5	33,1±0,53
СН I ФК	7	6,9	-
СН II ФК	49	48,0	-
СН III ФК	46	45,1	-
АД сист., мм.рт.ст. на момент обследования	-	-	135,4±2,0
АД диаст., мм.рт.ст. на момент обследования	-	-	87,9±1,3
АГ I степени	13	12,7	-
АГ II степени	38	37,3	-
АГ III степени	30	29,4	-
АГ IV степени	1	0,9	-
АГ не обнаружено	20	19,7	-
Сахарный диабет II типа	10	9,8	-
Курение, да	55	53,9	-
Курение, нет	45	44,1	-
Курение, ранее	2	2	-
Злоупотребление алкоголем	30	29,4	-
Не употребляют алкоголь	39	38,2	-
Ранее злоупотребляли алкоголем	33	32,4	-
Отягощенная наследственность по ИБС, ИМ, АГ, ОНМК	73	71,6	-
ОНМК в анамнезе	6	5,9	-

Примечание. N – количество, M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка средней арифметической.

в связи с чем на больных генотипирование не проводилось. Полученные частоты генотипов и аллелей соответствуют описанным в литературе для популяций народов монголоидной группы.

В популяции якутов по результатам исследования выявлены ассоциации с риском развития инфаркта миокарда по следующим полиморфным локусам генов-кандидатов ССЗ (P<0.05): *AT1R* 1166A/C, *ApoB* XbaI, *eNOS* VNTR (табл. 3).

Маркером повышенного риска инфаркта миокарда в популяции якутов по полиморфизму *AT1R* 1166A/C является носительство ге-

нотипа *AT1R**A/*C (P=0.021, OR=2.45, CI_{OR}=1.15-5.22) и аллеля *AT1R**C (P=0.021, OR=2.21, CI_{OR}=1.11-4.4). Носители генотипа *AT1R**A/*A имеют пониженный риск развития инфаркта миокарда (P=0.023, OR=0.42, CI_{OR}=0.2-0.88).

По полиморфизму *ApoB*XbaI по сравнению с контрольной группой в группе больных инфарктом миокарда достоверно чаще встречаются генотипы *ApoB**X+/*X+ (P=0.021, OR=4.02, CI_{OR}=1.22-13.19), *ApoB**X+/*X- (P=0.031, OR=2.02, CI_{OR}=1.12-3.65), и аллель *ApoB**X+ (P=0.0001, OR=2.56, CI_{OR}=1.59-2.65). Аллель *ApoB**X- является маркером пониженного риска инфаркта миокарда (P=0.0001, OR=0.39, CI_{OR}=0.24-0.63).

По VNTR полиморфизму *eNOS* имеется ассоциация с инфарктом миокарда аллеля *eNOS**A (P=0.022, OR=2.35, CI_{OR}=1.11-4.99). Напротив, аллель *eNOS**B является маркером пониженного риска инфаркта миокарда (P=0.035, OR=0.46, CI_{OR}=0.22-0.96).

Прослеживаются различия на уровне выраженной тенденции (0.05<P<0.1) между группами контроля и больных по следующим полиморфным локусам генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний с инфарктом миокарда: *ApoE* Arg158Cys, Cys112Arg, *ACE* I/D (табл. 3).

Таблица 3

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов *eNOS*, *ACE*, *ApoB*, *AT1R*, *ApoE* и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда в популяции якутов

Ген	Генотипы, аллели	Контрольная группа		Больные инфарктом миокарда		P	OR	CI _{OR}
		N	p _i ±s _p (%) CI	N	p _i ±s _p (%) CI			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>eNOS</i> VNTR	<i>eNOS</i> 4*B/*B	139	91.45±2.27 85.82 - 95.37	85	83.33±3.69 74.66 - 89.98	0.072	-	-
	<i>eNOS</i> 4*B/*A	12	7.89±2.19 4.15 - 13.38	16	15.69±3.6 9.24 - 24.22	0.065	-	-
	<i>eNOS</i> 4*B/*C	1	0.66±0.66 0.02 - 3.61	0	-	1.000	-	-
	<i>eNOS</i> 4*A/*A	0	-	1	0.98±0.98 0.02 - 5.34	0.401	-	-
	<i>eNOS</i> *A	12	3.95±1.12 2.06 - 6.79	18	8.82±1.99 5.31 - 13.59	0.022	2.35	1.11-4.99
	<i>eNOS</i> *B	291	95.72±1.16 92.8 - 97.7	186	91.18±1.99 86.41 - 94.69	0.035	0.46	0.22-0.96
	<i>eNOS</i> *C	1	0.33±0.33 0.01 - 1.82	0	-	0.412	-	-
<i>ACE</i> I/D	<i>ACE</i> *I/*I	51	33.55±3.83 26.11 - 41.65	33	32.35±4.63 23.42 - 42.34	0.892	-	-
	<i>ACE</i> *I/*D	62	40.79±3.99 32.9 - 49.05	53	51.96±4.95 41.84 - 61.96	0.094	-	-
	<i>ACE</i> *D/*D	39	25.66±3.54 18.93 - 33.36	16	15.69±3.6 9.24 - 24.22	0.063	-	-
	<i>ACE</i> *I	164	53.95±2.86 48.16 - 59.65	119	58.33±3.45 51.24 - 65.18	-	-	-
	<i>ACE</i> *D	140	46.05±2.86 40.35 - 51.84	85	41.67±3.45 34.82 - 48.76	-	-	-

Окончание табл.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>ApoB EcoRI</i>	<i>ApoB</i> *R2/*R2	99	96.12±1.9 90.35 - 98.93	-	-	-	-	-
	<i>ApoB</i> *R1/*R2	4	3.88±1.9 1.07 - 9.65	-	-	-	-	-
	<i>ApoB</i> *R1/*R1	0	-	-	-	-	-	-
	<i>ApoB</i> *R2	202	98.06±0.96 95.1 - 99.47	-	-	-	-	-
	<i>ApoB</i> *R1	4	1.94±0.96 0.53 - 4.9	-	-	-	-	-
<i>ApoB XbaI</i>	<i>ApoB</i> *X-/*X-	121	79.61±3.27 72.32 - 85.7	61	59.8±4.85 49.63 - 69.39	0.001	0.38	0.22-0.66
	<i>ApoB</i> *X+/*X-	27	17.76±3.1 12.04 - 24.78	31	30.39±4.55 21.67 - 40.29	0.031	2.02	1.12-3.65
	<i>ApoB</i> *X+/*X+	4	2.63±1.3 0.72 - 6.6	10	9.8±2.94 4.8 - 17.29	0.021	4.02	1.22-13.19
	<i>ApoB</i> *X-	269	88.49±1.83 84.35 - 91.85	153	75±3.03 68.47 - 80.78	0.0001	0.39	0.24-0.63
	<i>ApoB</i> *X+	35	35±11.51 1.83 - 8.15	51	25±3.03 19.22 - 31.53	0.0001	2.56	1.59-4.11
<i>AT1R 1166A/C</i>	<i>AT1R</i> *A/*A	138	90.79±2.35 85.03 - 94.87	82	80.39±3.93 71.35 - 87.59	0.023	0.42	0.2-0.88
	<i>AT1R</i> *A/*C	13	8.55±2.27 4.63 - 14.18	19	18.63±3.86 11.6 - 27.55	0.021	2.45	1.15-5.22
	<i>AT1R</i> *C/*C	1	0.66±0.66 0.02 - 3.61	1	0.98±0.98 0.02 - 5.34	1.000	-	-
	<i>AT1R</i> *A	289	95.07±1.24 91.99 - 97.21	183	89.71±2.13 84.7 - 93.51	0.021	0.45	0.23-0.9
	<i>AT1R</i> *C	15	4.93±1.24 2.79 - 8.01	21	10.29±2.13 6.49 - 15.3	0.021	2.21	1.11-4.4
<i>ApoE Arg158Cys, Cys112Arg</i>	<i>ApoE</i> *2/*2	1	0.66±0.66 0.02 - 3.61	2	1.96±1.37 0.24 - 6.9	0.566	-	-
	<i>ApoE</i> *2/*3	14	9.21±2.35 5.13 - 14.97	14	13.73±3.41 7.71 - 21.96	0.308	-	-
	<i>ApoE</i> *3/*3	116	76.32±3.45 68.75 - 82.83	65	63.73±4.76 53.61 - 73.02	0.034	0.55	0.32-0.95
	<i>ApoE</i> *3/*4	20	13.16±2.74 8.23 - 19.59	20	19.61±3.93 12.41 - 28.65	0.218	-	-
	<i>ApoE</i> *4/*4	1	0.66±0.66 0.02 - 3.61	0	-	1.000	-	-
	<i>ApoE</i> *2/*4	0	-	1	0.98±0.98 0.02 - 5.34	0.401	-	-
	<i>ApoE</i> *2	16	5.26±1.28 3.04 - 8.41	19	9.31±2.03 5.7 - 14.16	0.077	1.85	0.93-3.69
	<i>ApoE</i> *3	266	87.5±1.9 83.25 - 91	164	80.39±2.78 74.27 - 85.61	0.029	0.59	0.36-0.96
	<i>ApoE</i> *4	22	7.24±1.49 4.59 - 10.75	21	10.29±2.13 6.49 - 15.3	0.224	-	-

Примечание. N – объем выборки, p_i – частота генотипа (аллеля); s_p – ошибка p_i ; P – вероятность; OR – (odds ratio) – показатель соотношения шансов; CI – (confidence interval) – 95% доверительный интервал.

Заключение. Таким образом, обобщая полученные данные, можно говорить о четкой ассоциации с инфарктом миокарда в якутской популяции полиморфизмов *AT1R 1166A/C*, *ApoB XbaI*. Аллель *eNOS**A полиморфизма *eNOS VNTR* является маркером повышенного риска инфаркта миокарда.

Литература

1. Чистяков Д.А., Чугунова Л.А., Шамхалова М.Ш. и др. Полиморфизм гена сосудистого рецептора ангиотензина II и

микроангиопатии при инсулинзависимом сахарном диабете // Генетика. – 1999. – Т. 35, №9. – С. 1289-1293.

2. Hixson J.E., Vernier D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI* // J. Lipid Res. – 1990. – V. 31. – P. 545–548.

3. Lee Y.-J., Tsai J.C.R. ACE Gene Insertion/Deletion Polymorphism Associated With 1998 World Health Organization Definition of Metabolic Syndrome in Chinese Type 2 Diabetic Patients // Diabetes Care. – 2002. – V. 25. – P. 1002–1008.

4. Ludwig E., McCarthy B., Field W. High-resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene // Am. J. Hum. Genet. – 1989. – V. 45. – P. 458-464.

5. Schlesselman J. Case-control studies. Design, conduct, analysis // New York; Oxford: Oxford Univ. Press. – 1982. – P. 58-96.

6. Wang X.L., Sim A.S., Badenhof R.F. et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with the polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene // Nat Med. – 1996. – V. 2. – P.41-45.