

## АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМА НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ СТЕНКИ СОННЫХ АРТЕРИЙ

Екатерина Викторовна МАЗДОРОВА

ГУ НИИ терапии СО РАМН

630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

Изменения комплекса «интима-медиа», оцениваемые при ультразвуковом сканировании, являются ранним маркером атеросклероза. Цель данной работы - оценить ассоциации полиморфизма ряда генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) апополипротеина Е (*APOE*, *e2/e3/e4*), матричной металлопротеиназы-3 (*MMP3*, *5A/6A*), эндотелиальной NO-синтазы (*eNOs*, *4a/4b*) с атеросклеротическим поражением стенки сонных артерий. Объектом исследования явилась случайная репрезентативная популяционная выборка (300 мужчин и женщин в возрасте 18-60 лет, жителей Октябрьского р-на г. Новосибирска). Использовались следующие методы исследования: эпидемиологические (оценка факторов риска ССЗ, социально-демографические характеристики, медицинская история), лабораторные (ПЦР-диагностика) и ультразвуковые (дуплексное сканирование сонных артерий). Наличие атеросклероза каротидных артерий (АКА) устанавливали на основании увеличения толщины интимо-медиального комплекса (ТИМК)  $ТИМК \geq 0,9$  мм и/или наличия множественных бляшек сонных артерий. В анализе рассматривали средние показатели ТИМК и дихотомическую переменную АКА. В обследуемой популяционной выборке не обнаружено связи полиморфизма *e2/e3/e4* гена *APOE* с атеросклерозом сонных артерий. Среди курильщиков-мужчин обнаружена ассоциация каротидного атеросклероза с наличием аллеля *e4* гена *APOE*. Сдвиг к увеличению частоты атеросклероза сонных артерий у носителей *5a5a* генотипа *MMP3* статистически недостоверен. Обнаружена тенденция к независимой связи *4aa* генотипа *eNOs* с каротидным атеросклерозом.

**Ключевые слова:** атеросклероз сонных артерий, толщина «интима-медиа», ультразвуковое сканирование, гены-кандидаты, *APOE*, *eNOs*, *MMP3*, полиморфизм, полимеразная цепная реакция.

### Введение

Актуальность проблемы: Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) справедливо называют эпидемией XX века, которая, к сожалению, продолжается и в XXI веке. На ведущем месте по распространенности среди ССЗ находится ишемическая болезнь сердца (ИБС), в основе которой лежит атеросклероз. Сердечно-сосудистые заболевания в течение нескольких десятилетий являются ведущей причиной инвалидности и смертности среди наиболее трудоспособной части населения индустриально развитых стран, в том числе и в России, где от ССЗ ежегодно умирают примерно 1 млн. 200 тыс. человек (около 55% общей смертности). Кроме того, в России смертность от этих заболеваний существенно опережает показатели в странах Западной Европы и Северной Америки. В связи

с этим особенно остро встает проблема профилактики и лечения атеросклероза и его проявлений [1].

Индивидуальная стратегия профилактики ССЗ подразумевает выявление и лечение лиц с повышенным кардиоваскулярным риском или больных с высоким риском фатальных осложнений. Изменения комплекса «интима-медиа», успешно оцениваемые при ультразвуковом сканировании, являются ранним маркером генерализованного атеросклероза, предиктором кардио- и цереброваскулярных катастроф. [2,3,4].

На современном этапе кардиологии активно изучается полиморфизм генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний как один из потенциальных факторов риска развития атеросклеротического процесса. Полученные к настоящему времени результаты по вкладу ряда генов в

Таблица

Распределение аллелей *e2/e3/e4* гена *ApoE*, *5a/6a* *MMP3*, *4a/4b* *eNOs* в зависимости от наличия АКА

Гены	APOE			MMP3		eNOs	
Аллели	e2	e3	e4	5a	6a	4a	4b
АКА (+)	6%	82%	12%	44%	56%	24%	76%
АКА (-)	5%	84%	11%	40%	60%	18%	82%
р	0,529-0,706			0,626		0,385	

развитие атеросклероза противоречивы и требуют дополнительных исследований в различных популяциях.

Выявление общих механизмов развития и общих генов-кандидатов ССЗ (генных полиморфизмов) теоретически создаёт предпосылки к разработке программ ранней индивидуальной специфической профилактики болезней сердечно-сосудистой системы, основанной на идентификации «неблагоприятных» генных полиморфизмов у каждого человека.

Анализ молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с повышенным риском заболевания, даёт возможность рекомендовать их носителям меры профилактики задолго до появления первых симптомов заболевания и таким образом если не предотвратить его развитие, то хотя бы существенно отодвинуть срок его начала или уменьшить тяжесть клинических проявлений. Поэтому изучение ассоциации генетических полиморфизмов со структурными изменениями артериальной стенки, как маркера атеросклеротического поражения, является актуальным.

Цель исследования: Оценить ассоциации полиморфизма ряда генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний с атеросклеротическим поражением стенки сонных артерий.

#### Материалы и методы исследования

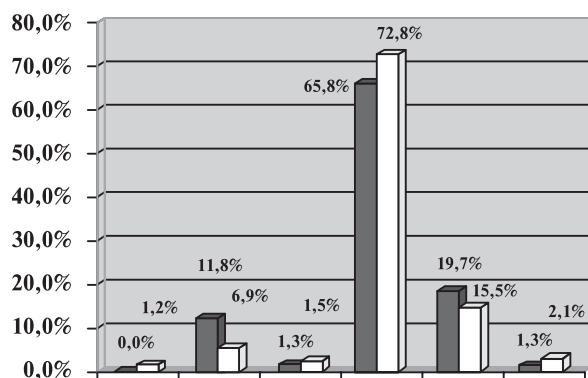
В качестве объекта исследования была использована случайная репрезентативная популяционная выборка (300 мужчин и женщин в возрасте 18-60 лет, жителей Октябрьского района города Новосибирска). Выбранный район, с общей численностью населения около 150 000 человек, типичен для Новосибирска и других промышленных центров Сибири и России по национальному и возрастному составу, занятости населения. Миграция населения в районе относительно невысока и соответствует среднегородской. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ГУ НИИ

терапии СО РАМН (председатель комитета — д.м.н., проф. Симонова Г.И.) [грант FP6, EU Network of Excellence]. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное согласие на участие. Использовались следующие методы исследования: стандартные эпидемиологические (оценка факторов риска ССЗ, социально-демографические характеристики, медицинская история), лабораторные (ПЦР-диагностика) и ультразвуковые (дуплексное сканирование сонных артерий с использованием ультразвукового сканера SIM 7000 CFM (Esaote Biomedica, Italy), 7,5/10,0 МГц).

Наличие атеросклероза каротидных артерий (АКА) устанавливали на основании увеличения толщины интимо-медиального комплекса (ТИМК) ТИМК $\geq$ 0,9мм и/или наличия множественных бляшек сонных артерий. В анализе рассматривали средние показатели ТИМК и дихотомическую переменную АКА.

Экстракция ДНК из крови проводилась методом фенол-хлороформной экстракции [5]. Генотипирование выполнялось в объединенной лаборатории молекулярной генетики ИЦИГ РАН и НИИ терапии СО РАМН. Полиморфизм генов тестировали с помощью опубликованных методик, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР).

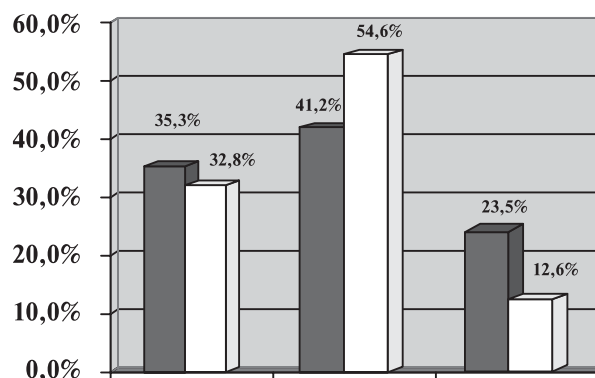
Из числа известных генов-кандидатов ССЗ были исследованы полиморфизмы следующих генов: аполипопротеина Е (*APOE*; *e2/e3/e4*), эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*; *интрон 4b/a*) и матричной металлопротеиназы-3 (*MMP3*; *6A/5A*). В настоящий анализ включены предварительные данные согласно выполненному генотипированию примерно в половине выборки. Полиморфизм гена *APOE* (*e2/e3/e4*) тестировался на основе ПЦР по методике генотипирования, основанной на подходе Hixson et al., 1990 [6]. Генотипирование *5A/6A* полиморфизма в промоторе гена *MMP3* проводилось с помощью метода, описанного Dunleavey



p=0,523

	e2e2	e2e3	e2e4	e3e3	e3e4	e4e4
■ AKA (+)	0,0%	11,8%	1,3%	65,8%	19,7%	1,3%
□ AKA (-)	1,2%	6,9%	1,5%	72,8%	15,5%	2,1%

Рис. 1. Частота генотипов гена аполипопротеина E (APOE, полиморфизм e2/e3/e4) в зависимости от наличия атеросклероза сонных артерий (популяционная выборка мужчин и женщин 18-60 лет г. Новосибирска)



p=0,405

	6A6A	5A6A	5A5A
■ AKA (+)	35,3%	41,2%	23,5%
□ AKA (-)	32,8%	54,6%	12,6%

Рис. 2. Частота генотипов гена металлопротеиназы 3 (MMP3, полиморфизм 5A/6A) в зависимости от наличия атеросклероза каротидных артерий (популяционная выборка мужчин и женщин 18-60 лет г. Новосибирска)

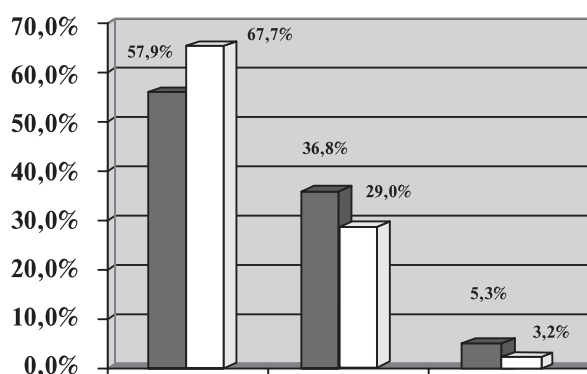
et al., 2000 [7], а полиморфизм b/a в 4 интроне гена eNOs оценивался на основе ПЦР по методике генотипирования, предложенной Wang XL et al., 1997г. [8].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «SPSS (v.-11.5)». На первом этапе определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых генов-кандидатов в общей популяции Новосибирска. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием критерия хи-квадрат. Анализировалась ассоциация полиморфизмов изучаемых генов-кандидатов с наличием каротидного атеросклероза в мужской и женской популяции Новосибирска (по данным одномоментного исследования) с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат по Пирсону. Относительный риск заболевания по конкретному аллелю или генотипу оценивали на основании отношения шансов (OR – odds ratio).

### Результаты

Распределение аллелей изучаемых генов в выборке, подвергнутой ультразвуковому исследованию, соответствовало их частоте в популяции. В изучаемом возрастном диапазоне частоты генотипов не отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга, за исключением частот генотипов гена APOE (p=0,02).

В отношении полиморфизма e2/e3/e4 гена APOE в группе с АКА распределение аллелей



p=0,680

	4bb	4ab	4aa
■ AKA (+)	57,9%	36,8%	5,3%
□ AKA (-)	67,7%	29,0%	3,2%

Рис. 3. Частота генотипов гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOs, полиморфизм 4b/a) в зависимости от наличия каротидного атеросклероза (популяционная выборка мужчин и женщин 18-60 лет г. Новосибирска)

не отличилось от группы с неизменной артериальной стенкой (e2/e3/e4=0,06/0,82/0,12 против 0,05/0,84/0,11 в контроле, p=0,529-0,706; n=412), табл. 1. Частоты генотипов APOE представлены на рис. 1. Толщина интимо-медиадного комплекса незначительно возрастала у носителей генотипов e2e3 (0,66 мм) и e4e4 (0,69 мм) против e3e3 (0,63 мм) без статистически значимых различий (p=0,501 для

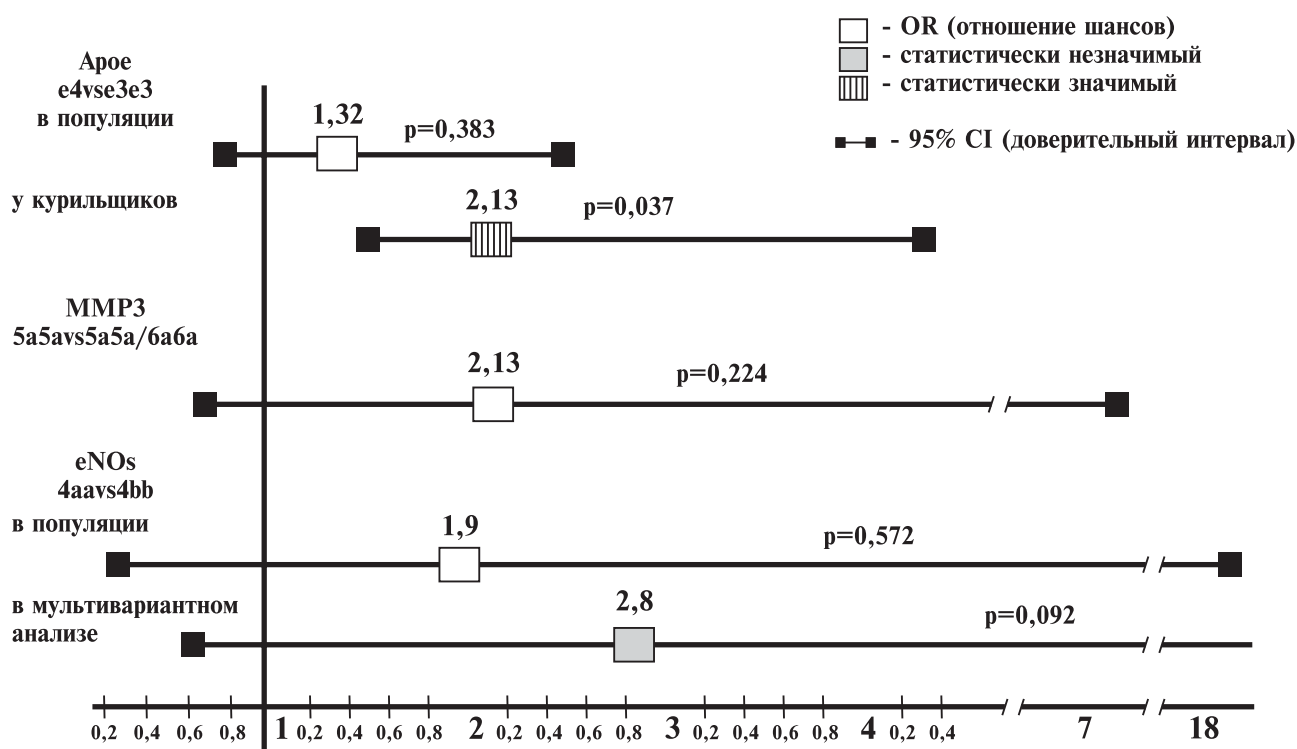


Рис. 4. Отношение шансов наличия каротидного атеросклероза в зависимости от полиморфизма генов APOE, MMP3, eNOS

стандартизованных по полу и возрасту оценок).

В то же время для проанализированной ранее выборки мужчин 35-54 лет обнаружено увеличение случаев АКА в два раза у носителей аллеля *e2* – модель *e2e2/e2e3* против *e3e3* (OR=2,13, 95%CI 0,96-4,76;  $p=0,060$ ) [4]. Увеличение частоты встречаемости АКА у носителей аллеля *e4* не достигало уровня статистической значимости (OR=1,56, 95%CI 0,81-3,00;  $p=0,183$ ). Учитывая известные литературные данные о наличии контекст-зависимости изучаемых ассоциаций, авторами был проведен анализ в подгруппах в зависимости от курения. Среди курящих мужчин и бывших курильщиков обнаружена ассоциация АКА с наличием аллеля *e4* (0,16 против 0,10 в контроле,  $p=0,037$ ). У курильщиков – носителей генотипов *e3e4/e4e4* по сравнению с *e3e3* вероятность развития АКА увеличивалась в 2 раза ( $p=0,037$ ), рис. 4. С учетом этих результатов, в настоящем исследовании планируется оценка модулирующего эффекта курения на связь полиморфизма гена APOE с каротидным атеросклерозом у мужчин и женщин в объединенной выборке.

В отношении полиморфизма 5A/6A гена MMP3 частота аллелей в зависимости от наличия АКА не различалась (0,44/0,56 и 0,40/0,60;

$p=0,626$ ), табл. 1. Некоторое преобладание частоты гомозигот 5A5A в группе с АКА (рис. 2) было при данном объеме исследования статистически незначимым. Отношение шансов развития АКА у носителей генотипов 5A5A против 5A6A/6A6A (23,5%/76,5% против 12,6%/87,4%) составил OR=2,13 (95%CI 0,62-7,41,  $p=0,224$ ), не достигая уровня статистической значимости, рис. 4.

Частота аллелей полиморфизма *a/b* в 4 интроне гена *eNOS* (табл. 1) и соотношение генотипов *bb/ab/aa* (рис. 3) в группе с АКА не отличались от группы с неизменной артериальной стенкой ( $4b/4a = 0,76/0,24$  против  $0,82/0,18$  в контроле,  $p=0,385$ ;  $n=161$ ). Отношение шансов развития АКА у носителей генотипов *4aa* против *4bb* (8,3%/91,7% против 4,5%/95,5%) составило 1,91 (95%CI 0,20-18,66,  $p=0,572$ ) и было недостоверным, однако в мультивариантном регрессионном анализе это различие усилилось, и для носителей *4aa* генотипа риск АКА составил 2,8 ( $p=0,092$ ), рис. 4.

#### Обсуждение

Полученные в предварительном анализе данные по связи аллеля *e2* гена APOE с каротидным атеросклерозом соответствуют результатам крупномасштабного ARIC Study [9] на



выборках без ССЗ. Механизмы обнаруженной связи обсуждаются, включая потенциальный эффект *e2*-изоформы на замедление клиренса триглицерид-насыщенных липопротеидов. Выявленное модулирующее влияние курения близко результатам когортного исследования Northwick Park Heart Study [10]. Это взаимодействие может быть связано с повышенным уровнем окисления липопротеинов низкой плотности (ЛНП) у курящих при снижении антиоксидантной защиты и меньшем размере частиц ЛНП у носителей аллеля *e4* по сравнению с *e2* или *e3*, а также с низкой концентрацией *APOE*, способствующей миграции гладкомышечных клеток артериальной стенки.

Отрицательные результаты по оценке связи полиморфизма *5A/6A* гена *MMP3* с каротидным атеросклерозом (при незначимом сдвиге к увеличению частоты АКА у носителей *5A5A* генотипа) отличаются от литературных данных, где в большинстве работ получены ассоциации ТИМК и каротидного стеноза с аллелем *6A* [11]. Это различие может быть связано с различиями в объеме исследованных выборок; с другой стороны, предварительные результаты в пользу *5A* аллеля могут отражать предполагаемую в недавнем мета-анализе связь этого варианта с нестабильностью бляшки вследствие повышенного протеолиза [12].

Обнаруженная в проекте тенденция к независимой связи *4aa* генотипа гена *eNOS* с каротидным атеросклерозом является относительно новым результатом. В недавнем обзоре [13] по данным мета-анализа 31 исследования отношение шансов развития ИБС у носителей генотипа *4a/b* составил 1,12; данные по связи с мозговым инсультом противоречивы. По отношению к васкулярным фенотипам интронные полиморфизмы *eNOS* мало изучены. Однако, имеющиеся в мировой литературе данные позволяют предполагать модулирующий эффект гаплотипов *eNOS* на генерацию NO [14] и эпистатические эффекты *eNOS* полиморфизма, например, в комбинации с аллелем *e4* гена *APOE* в отношении каротидного атеросклероза. [15].

### Заключение

Таким образом, в ходе выполнения настоящей работы пилотно проанализированы ассоциации полиморфизма некоторых генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний с атеросклеротическим поражением стенки сонных артерий. Полученные на данном этапе результаты подтверждают значение генетической компоненты в предрасположенности к развитию

каротидного атеросклероза и позволяют корректировать спектр генов-кандидатов для дальнейшего анализа.

В настоящее время известен ряд полиморфизмов генов, определенные аллельные варианты и генотипы которых обнаруживают связь с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В их число входят гены, связанные с нарушениями липидного обмена, артериальной гипертензией, неблагоприятными сдвигами в системе гемостаза и изменениями функционирования различных типов клеток на биохимическом и физиологическом уровнях. Учитывая сложность патогенеза распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы, очевидно, что перечень известных генов-кандидатов, вносящих вклад в их возникновение, является далеко не полным, и к нему постоянно добавляются новые геномные локусы. Кроме этого, в случае сердечно-сосудистых заболеваний, как и при любой другой мультифакториальной патологии, диапазон выраженности генотипа в фенотипе может быть очень широким. Решение этих задач является особо важным для населения России, учитывая многообразие этнического состава, сложность этногенеза различных популяций, крайне высокий уровень распространения сердечно-сосудистых заболеваний и обусловленной ими смертности.

Полученные результаты создают предпосылки для продолжения данного исследования в плане увеличения объема выборки. Расширение объема исследуемой выборки позволит более детально и достоверно оценить вклад генетических факторов в развитие АКА в разных возрастных группах. Также увеличение выборки позволит провести более детальный анализ ассоциаций не только аллельных вариантов отдельных генов, но и их комбинаций из всего спектра взятых в анализ генов и полиморфизмов, и в дальнейшем разработать программы по профилактике ССЗ на основе формирования групп повышенного риска.

Автор выражает благодарность сотрудникам ГУ НИИ терапии СО РАМН: зав. лаб. — чл.-корр. РАМН Воеводе М.И., д.м.н., проф. Малютиной С.К., к.м.н. Шахтштейнер Е.В., к.м.н. Куликову И.В., а также сотрудникам Института цитологии и генетики СО РАН: зав. лабораторией молекулярных основ генетики животных, к.б.н. Ромащенко А.Г., м.н.с. Семаеву С.Е.

Работа поддержана грантом FP6, EU Net-work of Excellence.

## Литература

1. Оганов Р.Г. Факторы риска и профилактика сердечно-сосудистых заболеваний // Медицина. 2003. (2)/<http://www.solvaypharma.ru/articles/article.aspx?id=2063>, 23.06.2008 г.
2. Oganov R.G. Risk factors and prophylaxis of cardiovascular diseases // Medicina. 2003. (2) / <http://www.solvaypharma.ru/articles/article.aspx?id=2063>, 23.06.2008.
3. Bots M.L., Dijk J.M., Oren A., Grobbee D.E. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence // J of Hypertens. 2002. 20:2317-25.
4. O'Leary D.H., Polak J.F., Kronmal R.A., et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group // N. Engl. J. Med. 1999. 340:14-22.
5. Рябиков А.Н., Воевода М.И., Ромащенко А.Г. и др. Исследование новых биомаркеров атеросклеротических изменений сосудистой стенки: факторы воспаления, гомоцистеин, генетические детерминанты // «Перспективы Российской кардиологии»: материалы Российского национального конгресса кардиологов. Москва, 2005: 280-281.
6. Ryabikov A.N., Voevoda M.I., Romachenko A.G. et al. Investigation of new biomarkers of atherosclerotic changes of vascular wall: inflammation factors, homocystine, genetic determinants // «Perspectives of Russian cardiology»: Proceedings of of Russian national congress of cardiologists. Moscow, 2005:280-281.
7. Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. // Анализ генома. Под ред. К. Дейвиса, пер. с англ. М: Мир, 1990. 58-94.
8. Smith K., Kalko S., Kantor Ch. Pulse-electrophoresis methods of working with big molecules of DNA.// Genome analysis. Edited by. Deivis K., translated from Engl. M: Mir. 1990. 58-94.
9. Hixson J.E., Vernier D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I // J. Lipid Res. 1990. 31:545-548.
10. Dunleavy L., Beyzade S., Ye S. Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism // Atherosclerosis. 2000. 151: 587-589.
11. Wang X.L., Mahaney M.C., Sim A.S., Wang J., Blangero J., Almasy L., Badenhop R.B., Wilcken D.E. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997. 17:3147-3153.
12. De Andrade M., Thandi I., Brown S., et al. Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis // Am J Hum Genet. 1995. 56:1379-1390.
13. Humphries S., Talmud J., Hawe E., et al. Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study // Lancet 2001. 358: 115-19.
14. Manolio T.A., Boerwinkle E., O'Donnell C. et al. Genetics of Ultrasonographic Carotid Atherosclerosis // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004. 24: 1567-77.
15. Abilliera S., Began S., Markus H.S. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis // J Med Genet. 2006. 43: 897-901.
16. Casas J.P., Cavalleri G.L., Bautista L.E., et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: A HuGE Review // Amer J Epidemiol. 2006. 164: 921-935.
17. Metzger I.L., Sertorio J.T., Tanus-Santos J.E. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase haplotypes // Free Radic Biol Med. 2007. 43(6): 987-992.
18. Asakimori Y., Yorioka N., Tanaka J., et al. Effect of polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and apolipoprotein E genes on carotid atherosclerosis in hemodialysis patients // Am J Kidney Dis. 2003. 41:822-832.

## THE ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISM CANDIDATE GENES OF CARDIOVASCULAR DISEASES WITH ATHEROSCLEROTIC LESION OF CAROTID WALL

Ekaterina Viktorovna MAZDOROVA

SI RI of Internal Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences  
175/1, B. Bogatkova str., Novosibirsk, 630089

The thickening of carotid intima-media, estimated by ultrasound is early marker of atherosclerosis. The aim of this study was to examine the association between polymorphisms several candidate genes of cardiovascular diseases (CVD) - apolipoprotein E (APOE, e2/e3/e4), matrix metalloproteinase-3 (MMP3, 5A/6A), endothelial nitric oxide synthase (eNOS, 4a/4b) and atherosclerotic lesion of carotid wall. The random representative population sample (300 men and women aged 18-60 years old, inhabitants of Otyabrskij district of Novosibirsk) was studied. The following methods of examination were used: epidemiological methods (measurement of CVD risk factors, social and demographic characteristics, medical history), laboratory methods (PCR-based analyses) and ultrasonic examination (duplex scanning of carotid arteries). The presence of carotid atherosclerosis disease (CAAD) was established on the basis of increase in carotid artery intima-media wall thickness (IMT)  $IMT \geq 0,9 \text{ mm}$  and/or presence of multiple

carotid plaques. For analysis we considered the average IMT value and CAAD dichotomized variable. In studied population sample we did not reveal the association of e2/e3/e4 polymorphism APOE gene with carotid atherosclerosis. Among smokers-men the association of carotid atherosclerosis with e4 allele APOE gene was found. The shift to increasing of CAAD frequency in carriers MMP35a5a genotype was statistically borderline. There was tendency for independent relationship between eNOs 4aa genotype and carotid wall lesion.

**Key words:** atherosclerosis of carotid arteries, intima-media thickness, ultrasound, candidate genes, APOE, eNOs, MMP3, polymorphism, polymerase-chain reaction.

---

*Mazdorova E.V. — post-graduate student, e-mail: mazdorova@mail.ru*