

АССОЦИАТИВНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ САХАРНОГО ДИАБЕТА ВТОРОГО ТИПА С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Павел Сергеевич ОРЛОВ¹, Игорь Вячеславович КУЛИКОВ^{1,2},
Сергей Николаевич УСТИНОВ², Валерий Васильевич ГАФАРОВ²,
Софья Константиновна МАЛЮТИНА², Аида Герасимовна РОМАЩЕНКО¹,
Михаил Иванович ВОЕВОДА^{1,2}, Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{2,3}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

²НИИ терапии СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

³ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Цель исследования: провести ассоциативный анализ с инфарктом миокарда (ИМ) двух однонуклеотидных маркеров СД2Т на популяции г. Новосибирска: rs10811661 гена *CDKN2A/B* (хромосома 9) и rs7903146 гена *TSC7L2* (хромосома 10). Группа больных ИМ и контрольная группа были сформированы на основе популяционной выборки 45–69-летних жителей г. Новосибирска (9400 человек). Всего было отобрано 200 больных ИМ (129 мужчин, 71 женщина), контрольную группу составил 321 человек без ИМ (208 мужчин, 113 женщин). **Результаты.** По характеру ассоциации изученных однонуклеотидных полиморфных (ОНП) маркеров с ИМ популяция Новосибирска сходна с другими европеоидными популяциями. rs7903146 ассоциирован с ИМ у женщин, с уровнем триглицеридов плазмы крови. Ассоциаций rs10811661 с ИМ и факторами риска его развития не выявлено.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, сахарный диабет второго типа, однонуклеотидный полиморфизм, rs7903146, rs10811661.

В настоящее время инфаркт миокарда (ИМ) является одной из основных причин смерти в экономически развитых странах. В федеральной программе «Здоровье» проблеме инфаркта миокарда отведено одно из основных значений, так как уменьшение заболеваемости и смертности от ИМ может существенно повысить качество и продолжительность жизни населения Российской Федерации. В г. Новосибирс-

ке распространенность ИМ достаточно высока, составляет 1,3 случая на 1000 населения [1] и сопоставима с частотой ИМ в других промышленных центрах РФ. В связи с этим остро стоит проблема профилактики ИМ как на популяционном, так и на индивидуальном уровне. Еще одна серьезная болезнь цивилизации – сахарный диабет второго типа (СД2Т), заболеваемость им в России составляет 17 человек на 1000 населе-

Орлов П.С. – аспирант, e-mail: orlovpavel86@gmail.com

Куликов И.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: 248945@mail.ru

Устинов С.Н. – научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: serg_ustinov@rambler.ru

Гафаров В.В. – д.м.н., проф., зав. лабораторией психологических и социологических проблем терапевтических заболеваний, e-mail: valery.gafarov@gmail.com

Малютина С.К. – д.м.н., проф., руководитель группы неинвазивной диагностики, лаборатория этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Ромашенко А.Г. – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных основ генетики животных, e-mail: romasch@bionet.nsc.ru

Воевода М.И. – д.м.н., проф., член-корреспондент РАМН, директор, e-mail: mvoevoda@ya.ru

Максимов В.Н. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

ния [1]. СД2Т и ИБС считаются синтропными болезнями, т. е. имеющими общие звенья патогенеза, что предполагает наличие синтропных генов [2]. Поэтому представляется логичным проведение ассоциативного анализа маркеров СД2Т с ИМ и наоборот.

В настоящее время в мире получили большое распространение полногеномные исследования ассоциаций (GWAS), в результате которых были получены новые маркеры предрасположенности к различным заболеваниям, в том числе к ИМ и СД2Т. Результаты данных исследований нуждаются в подтверждении на нашей популяции из-за различий в частотах аллелей, в структуре неравновесия по сцеплению, в относительном вкладе отдельных факторов риска в совокупный риск. Структура неравновесия по сцеплению для каждой этнической группы своя, а мы не знаем паттерн неравновесия по сцеплению (LD) для исследуемых локусов в нашей популяции. Такие факторы риска, как особенности питания, климато-географические и социально-психологические условия, также отличаются в разных популяциях и т. д. [2]. Учитывая все вышеизложенное, было решено провести ассоциативный анализ с ИМ двух однонуклеотидных маркеров СД2Т на популяции г. Новосибирска: rs10811661 гена *CDKN2A/B* (хромосома 9) [2] и rs7903146 гена *TCF7L2* (хромосома 10), которые ранее в зарубежных исследованиях изучались на наличие ассоциаций с СД2Т [3–6] и ИБС [2, 7–10].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Группа больных инфарктом миокарда и контрольная группа (подобранная по полу и возрасту) были сформированы на основе популяционной выборки 45–69-летних жителей Октябрьского и Кировского районов г. Новосибирска (9400 человек), которая была сформирована НИИ терапии СО РАМН в результате работы по международному проекту HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe). Программа исследования включала измерение артериального давления, антропометрию (рост, вес, объем талии, бедер), социально-демографические характеристики, опрос о курении, потреблении алкоголя (частота и типичная доза), уровне физической и половой активности, оценку липидного профиля (содержание в крови общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеидов высокой плотности), опрос на выявление стенокардии напряжения (опросник Rose), ЭКГ покоя в 12 отведениях. Выборка больных инфарктом миокарда 200 че-

ловек (129 мужчин, 71 женщина), контрольная выборка (отсутствие в анамнезе документированного ИМ) – 321 человек (208 мужчин, 113 женщин). При формировании группы больных использовались эпидемиологические критерии ИМ (регистр инфаркта миокарда, программа ВОЗ MONICA [1]) на основе кодирования ЭКГ изменений по Миннесотскому коду (МК), опросника Rose и документированного инфаркта миокарда в анамнезе: определенный инфаркт миокарда (МК 1-1 – 1-2-7), возможный инфаркт миокарда (МК 1-2-8 – 1-3), документированный инфаркт миокарда в анамнезе [1].

ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Полиморфизм генов тестировали с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом фирмы производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems, США) на приборе ABI 7900HT (США). В исследование были взяты следующие ОНП: rs7903146 гена *TCF7L2* (хромосома 10) и rs10811661 гена *CDKN2A/B* (хромосома 9).

При проведении статистического анализа на первом этапе определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых ОНП в группе больных ИМ и контрольной группе. Далее сравнивали уровень таких показателей, как рост, масса тела, индекс массы тела, артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое), частота сердечных сокращений, содержание в крови общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой и высокой плотности, триглицеридов, индекс атерогенности, концентрация глюкозы в крови, у носителей разных генотипов проводили после проверки нормальности распределения этих признаков по тесту Колмогорова–Смирнова. Если признак отвечал критериям нормального распределения, то использовали однофакторный дисперсионный анализ. Достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью t-теста для двух независимых выборок. В случае, если изучаемый признак не удовлетворял критериям нормального распределения, сравнение уровня этого признака у носителей разных генотипов проводилось с помощью теста Крускалла–Уоллиса, достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью теста Манна–Уитни для двух независимых выборок. Ассоциация ОНП с факторами риска проверялась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц сравнение выборок по частотам генотипов и аллелей приме-

няли двусторонний точный критерий Фишера. Относительный риск заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Генотип rs7903146 гена *TCF7L2*, расположенный на хромосоме 10, кодирует транскрипционный фактор, который является составной частью сигнального пути Wnt. Данный сигнальный путь задействован в регуляции механизмов роста, развития и функционирования различных клеток, в том числе и β -клеток поджелудочной железы [12]. Сначала было оценено распределение генотипов по полу (табл. 1, 2). Оценка распределения генотипов у мужчин и женщин не выявила статистически значимых различий, вследствие чего группы были объединены для анализа, при этом проведены оценки связи отдельно для мужчин и для женщин. В ходе расчетов для общей группы и группы мужчин статистически значимых результатов показано не было. Для женщин выявлена ассоциация аллеля Т с риском развития

инфаркта миокарда ОШ = 1,9 (95 % ДИ 1,1–3,3; $p = 0,04$). В тесте Манна–Уитни на контрольной выборке было обнаружено, что генотип СС ассоциирован с повышенным уровнем триглицеридов, эта ассоциация наблюдалась как в общей группе, так и в группах мужчин и женщин по отдельности ($p = 0,05$, $0,03$ и $0,03$ соответственно). В проспективном когортном исследовании (проект ARIC) rs7903146 был ассоциирован с риском развития ИБС, ОШ = 1,42, для аллеля Т [10]. По результатам многих работ ОШ для СД2Т колеблется в пределах от 1,3 до 3,3 для аллеля Т [6, 13, 14]. Также была показана связь этого ОНП с некоторыми факторами риска ИМ (артериальное давление, липиды крови, секреция инсулина) [3, 5, 15]. Наши данные по ассоциации rs7903146 с уровнем триглицеридов совпадают с данными Melzer D. и соавторов, согласно которым носительство аллеля С ассоциировано с повышенными уровнями триглицеридов крови [3].

Генотип rs10811661 гена *CDKN2A/B*, расположенный на хромосоме 9, кодирует ингибитор циклин-зависимой киназы 4 типа 2A/B, учас-

Таблица 1

Частоты генотипов

ОНП	Генотип	Контрольная группа		Инфаркт миокарда		ОШ	<i>p</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
Общая выборка							
rs7903146 гена <i>TCF7L2</i>	CC	190	60,9	101	58,4	0,9	0,63
	CT	116	37,2	64	37	1	1
	TT	6	1,9	8	4,6	2,7	0,1
rs10811661 гена <i>CDKN2A/B</i>	CC	8	2,5	6	3,1	1,2	0,78
	CT	79	24,5	48	24,6	1	1
	TT	236	73,1	141	72,1	1	0,92
Выборка мужчин							
rs7903146 гена <i>TCF7L2</i>	CC	115	57,2	71	62,3	1,2	0,41
	CT	83	41,3	38	33,3	0,7	0,19
	TT	3	1,5	5	4,4	3	0,14
rs10811661 гена <i>CDKN2A/B</i>	CC	4	1,9	4	3,2	1,7	0,48
	CT	48	23,1	29	23,2	1	1
	TT	156	75	92	73,6	1,1	0,8
Выборка женщин							
rs7903146 гена <i>TCF7L2</i>	CC	75	67,6	30	50,8	0,5	0,06
	CT	33	29,7	26	44,1	1,9	0,07
	TT	3	2,7	3	5,1	1,9	0,4
rs10811661 гена <i>CDKN2A/B</i>	CC	4	3,5	2	2,9	0,8	1
	CT	31	27	19	27,1	1	1
	TT	80	76,2	49	70	1	1

Таблица 2

Частоты аллелей							
ОНП	Аллель	Контрольная группа		Инфаркт миокарда		ОШ	p
		n	%	n	%		
Общая выборка							
rs7903146 гена <i>TCF7L2</i>	C	496	79,5	266	76,9	0,9	0,37
	T	128	20,5	80	23,1	1,2	0,37
rs10811661 гена <i>CDKN2A/B</i>	C	95	14,7	60	15,4	1,1	0,79
	T	551	85,1	330	84,6	0,9	0,79
Выборка мужчин							
rs7903146 гена <i>TCF7L2</i>	C	313	79,5	266	76,9	0,9	0,79
	T	89	20,5	80	23,1	1,1	0,79
rs10811661 гена <i>CDKN2A/B</i>	C	56	14,7	60	15,4	1,2	0,48
	T	360	85,1	330	84,6	0,9	0,48
Выборка женщин							
rs7903146 гена <i>TCF7L2</i>	C	183	82,3	86	72,9	0,5	0,04
	T	39	17,7	32	27,1	1,9	0,04
rs10811661 гена <i>CDKN2A/B</i>	C	39	17	23	16,4	1	1
	T	191	83	117	83,6	1	1

твующий в регуляции клеточного цикла, пролиферации и дифференциации клеток. Оценка распределения генотипов у мужчин и женщин не выявила статистически значимых различий, в результате группы были объединены (см. табл. 1, 2). По результатам нашего исследования не выявлено никаких статистически значимых связей данного ОНП как с инфарктом миокарда, так и с факторами риска его развития. На сегодняшний день этот ОНП по результатам большого количества работ связан с сахарным диабетом 2-типа, в различных исследованиях отношение шансов колеблется в пределах 1,2–1,49 для носителей аллеля T [4, 5, 15]. Относительно заболеваний сердечно-сосудистой системы данные противоречивы на китайской популяции в большом когортном исследовании (3164 человека) была показана связь rs10811661 с ИБС ($p = 0,002$) для носителей аллеля T [9], в то же время в более ранних исследованиях, выполненных в формате «случай-контроль» на больших выборках в Исландии и Италии, связь данного ОНП с ИМ не была обнаружена [7, 8].

Таким образом, по характеру ассоциации изученных ОНП с ИМ популяция Новосибирска сходна с другими европеоидными популяциями. rs7903146 ассоциирован с ИМ у женщин с уровнем триглицеридов плазмы крови. Ассоциаций rs10811661 с ИМ и факторами риска его развития не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MONICA Monograph and Multimedia Sourcebook. World's largest study of heart disease, stroke, risk factors, and population trends 1979–2002. Ed. H. Tunstall-Pedoe (with 64 other contributors for the WHO MONICA Project). Geneva, 2003. 237 p.
2. Пузырев В.П., Степанов В.А., Макеева О.А. Синтропные гены болезней сердечно-сосудистого континуума // Мед. генетика. 2009. (3). 31–38.
3. Puzayev V.P., Stepanov V.A., Makeeva O.A. Syntrope genes of diseases of cardio-vascular continuum // Med. genetika. 2009. (3). 31–38.
4. Melzer D., Murray A., Hurst A.J. et al. Effects of the diabetes linked *TCF7L2* polymorphism in a representative older population // BMC Med. 2006. 4. 34.
5. Kang E.S., Kim M.S., Kim C.H. et al. Association of common type 2 diabetes risk gene variants and posttransplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients in Korea // Transplantation. 2009. 88. 693–698.
6. Han X., Luo Y., Ren Q. et al. Implication of genetic variants near *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *FTO*, *TCF2*, *KCNQ1*, and *WFS1* in type 2 diabetes in a Chinese population // BMC Med. Genet. 2010. 11. 81.
7. Palmer N.D., Hester J.M., An S.S. et al. Resequencing and analysis of variation in the *TCF7L2* gene in African Americans suggests that SNP

rs7903146 is the causal diabetes susceptibility variant // *Diabetes*. 2011. 60. 662–668.

7. Gori F., Specchia C., Pietri S. et al. Common genetic variants on chromosome 9p21 are associated with myocardial infarction and type 2 diabetes in an Italian population // *BMC Med. Genet.* 2010. 11. 60.

8. Helgadottir A., Thorleifsson G., Magnusson K.P. et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm // *Nat. Genet.* 2008. 40. 217–224.

9. Cheng X., Shi L., Nie S. et al. The same chromosome 9p21.3 locus is associated with type 2 diabetes and coronary artery disease in a Chinese Han population // *Diabetes*. 2011. 60. 680–684.

10. Kucharska-Newton A.M., Monda K.L., Bielecki S.J. et al. Role of BMI in the association of the TCF7L2 rs7903146 variant with coronary heart disease: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study // *J. Obes.* 2010. 2010. pii: 651903.

11. 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.

Smith C., Klc S., Cantor C. Pulse field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules // *Genome analysis* / Ed. K. Davies, translated from English. M.: Mir, 1990. 58–94.

12. Jin T., Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus // *Mol. Endocrinol.* 2008. 22. (11). 2383–2392.

13. Cruz M., Valladares-Salgado A., Garcia-Mena J. et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City // *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2010. 26. (4). 261–270.

14. Wang J., Kuusisto J., Vanttinen M. et al. Variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene predict conversion to type 2 diabetes in the Finnish Diabetes Prevention Study and are associated with impaired glucose regulation and impaired insulin secretion // *Diabetologia*. 2007. 50. (6). 1192–1200.

15. Delgado-Lista J., Perez-Martinez P., Garcia-Rios A. et al. Pleiotropic effects of TCF7L2 gene variants and its modulation in the metabolic syndrome: from the LIPGENE study // *Atherosclerosis*. 2011. 214. (1). 110–116.

ASSOCIATION ANALYSIS OF SOME SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM MARKERS OF THE SECOND TYPE OF DIABETES WITH MYOCARDIAL INFARCTION

Pavel Sergeevich ORLOV¹, Igor Vyacheslavovich KULIKOV^{1,2}, Sergey Nikolaevich USTINOV², Valery Vasilievich GAFAROV², Sophia Konstantinovna MALYUTINA², Aida Gerasimovna ROMASHCHENKO¹, Mikhail Ivanovich VOEVODA^{1,2}, Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV^{2,3}

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrent'ev av., 10*

²*Institute of Internal medicine SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

³*Novosibirsk State Medical University of Minzdravsotsrazvitie
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

Aim: To conduct the association analysis between myocardial infarction (MI) and two single-nucleotide markers SD2T in population of Novosibirsk: rs10811661 gene *CDKN2A/B* (chromosome 9) and rs7903146 of the gene *TCF7L2* (chromosome 10). The group of MI patients and control group were formed on the ground of population sampling of 45–69 years old residents of Novosibirsk (9400 people). 200 patients with MI (129 men, 71 women) have been selected totally, the control group consists of 321 people (208 men, 113 women) without MI. Results: The nature of the association studied SNPs with MI in the population of Novosibirsk is similar to other Caucasoid populations. rs7903146 was associated with MI in women with triglyceride levels of blood plasma. Rs10811661 associations with myocardial infarction and its risk factors have not been found.

Key words: myocardial infarction, diabetes mellitus of the second type, single nucleotide polymorphism, rs7903146, rs10811661.

Orlov P.S. – postgraduate student, e-mail: orlovpavel86@gmail.com

Kulikov I.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: 248945@mail.ru

Ustinov S.N. – researcher of the laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: serg_ustinov@rambler.ru

Gafarov V.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory for psychological and sociological problems of therapeutic diseases, e-mail: valery.gafarov@gmail.com

Malyutina S.K. – doctor of medical sciences, professor, head of the non-invasive diagnostics group of the laboratory for etiopathogenesis and clinic picture of internal medicine, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Romashchenko A.G. – candidate of biological sciences, head of the laboratory of molecular basis of animal genetics, e-mail: romasch@bionet.nsc.ru

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director, e-mail: mvoevoda@ya.ru

Maksimov V.N. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory for molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru