

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *SREBF2* С ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТЬЮ

Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{1,2}, Игорь Вячеславович КУЛИКОВ^{1,3},
Сергей Николаевич УСТИНОВ¹, Анастасия Андреевна ИВАНОВА⁴,
Владимир Павлович НОВОСЕЛОВ^{2,5}, Сергей Владимирович САВЧЕНКО²

¹ НИИ терапии СО РАМН

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

² ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

³ Институт цитологии и генетики СО РАН

630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

⁴ ГОУ ВПО Новосибирский государственный университет

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

⁵ ГУЗ Новосибирское областное бюро судебно-медицинской экспертизы

630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 134

Цель работы. Изучить ассоциацию полиморфизма rs2228314 гена *SREBF2* с внезапной сердечной смертью (ВСС) в популяции Западной Сибири. **Материал и методы.** Аутопсийный материал от 234 мужчин, умерших ВСС. Контрольные группы: 1) мальчики-подростки (234 человека), 2) мужчины, подобранные по возрасту (246 человек). **Результаты.** При сравнении выборки мужчин и группы с ВСС по частотам генотипов rs2228314 гена *SREBF2* выявлено статистически значимое различие ($p = 0,003$). Отношение шансов обнаружить носителей генотипа CC в группе с ВСС составило 2,7 (95% доверительный интервал (ДИ) 1,2–6,2; $p = 0,020$) по сравнению с выборкой мужчин. **Заключение.** Полиморфизм rs2228314 гена *SREBF2* ассоциирован с ВСС в популяции Западной Сибири.

Ключевые слова: гены-кандидаты сердечно-сосудистых заболеваний, внезапная сердечная смерть, популяционное исследование, однонуклеотидный полиморфизм rs2228314 гена *SREBF2*.

В спектре сердечно-сосудистых заболеваний наиболее изучены молекулярно-генетические основы атеросклероза, кардиомиопатий, артериальной гипертензии. В последнее время внимание привлекает поиск генетических маркеров заболеваний, ассоциированных с внезапной сердечной смертью (ВСС) [1–3]. Ряд точечных мутаций генов калиевых, натриевых и кальциевых ионных каналов приводят к изменениям электрофизиологических свойств проводящей системы сердца и значительно повышают риск

внезапной смерти [4]. Однако частота таких семейных форм нарушений ритма относительно мала и объясняет только небольшую долю случаев внезапной смерти. Известно, что большая часть таких случаев является по своей природе мультифакториальной [1, 5]. И если средовые факторы риска изучены достаточно хорошо, то поиск генов-кандидатов ВСС продолжает оставаться актуальным. Особенно если принять во внимание тот факт, что молекулярно-генетический подход является единственной реальной

Максимов В.Н. – д.м.н., и.о. зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

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

Иванова А.А. – студентка медицинского факультета, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Новосёлов В.П. – д.м.н., проф., начальник, e-mail: sme@sibsme.ru

Савченко С.В. – д.м.н., проф. кафедры судебной медицины

возможностью систематического изучения молекулярно-биологических механизмов, predisposing к развитию БСС. В возрасте после 40 лет каждый последующий год жизни увеличивает долю случаев БСС, которая приходится на ишемическую болезнь сердца (ИБС). Это заставляет рассматривать гены-кандидаты ИБС в качестве генов-кандидатов БСС и, соответственно, проверять их на наличие ассоциации с БСС. Учитывая вклад нарушений липидного обмена в развитие ИБС [6], в первую очередь логично проверить ассоциацию БСС с генами, продукты которых участвуют в обмене липидов.

Факторы семейства SREBP (sterol regulatory element-binding protein) играют важную роль в регуляции транскрипции генов липидного метаболизма. Они относятся к семейству факторов, экспрессирующихся в большинстве клеток организма и содержащих ДНК-связывающий домен. Факторы SREBP-1 и SREBP-2, принадлежащие этому подсемейству, синтезируются в форме предшественников (pre-SREBP) и находятся в цитоплазме, будучи связанными с мембранами эндоплазматического ретикула. Они активируются под действием стерол-регулируемых протеаз, активность которых, в свою очередь, подавляется при высоком уровне холестерина. Проникая в ядро клетки, SREBP-1 и SREBP-2 связываются со стерол-регулируемым элементом генов – SRE (sterol regulatory element), стимулируя их транскрипцию. Колчановым Н.А. и соавторами в результате анализа сетей регуляции внутриклеточного уровня холестерина в гепатоцитах и липидного метаболизма в адипоцитах было показано, что к числу ключевых регуляторов экспрессии генов липидного метаболизма относятся транскрипционные факторы семейства SREBP и фактор PPAR γ [7]. Активность факторов семейства SREBP контролируется по принципу обратной связи: чем выше концентрация холестерина, тем ниже активность SREBP. В экспериментах на лабораторных животных с нокаутингом генов показано, что SREBP контролирует ответ миоцитов на парасимпатическую стимуляцию [8]. Последняя, как известно, является протективным фактором в отношении развития аритмий и внезапной смерти.

Ген стерол-регулирующего элемент-связывающего транскрипционного фактора 2 (MIM 600481, *SREBF2*) расположен на длинном плече 22-й хромосомы (22q13). Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) rs2228314 – замена G на C в 1953-й нуклеотидной позиции приводит к замене G (Gly) на A (Ala) в 595-й аминокислотной позиции. Частота редкого генотипа CC

в европеоидных выборках по данным литературы колеблется от 3 до 27 %. А в некоторых африканских выборках этот генотип является преобладающим – 78 %. В Финляндии показали ассоциацию rs2228314 с БСС [9]. В то же время в Китае не нашли ассоциации этого ОНП с ранней ИБС (до 55 лет) [10].

В связи с приведенными данными представляет значительный интерес исследование ассоциации полиморфизма rs2228314 с БСС на русской популяции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Набор аутопсийного материала проводился у мужчин, умерших внезапно в возрасте 25–64 лет (жителей Октябрьского района г. Новосибирска), подвергнутых судебно-медицинскому исследованию. Средний возраст умерших составил $53,6 \pm 7,9$ года. При секционном исследовании производился забор образцов ткани печени или миокарда в количестве 5–10 г. Всего были проанализированы образцы ДНК 234 мужчин, умерших внезапно (без морфологических изменений, характерных для инфаркта миокарда, дилатационной и гипертрофической кардиомиопатий и др.). С учетом ограниченной информации о времени развития фатального события в исследуемую группу включены случаи смерти, развившейся в течение одного часа или при отсутствии свидетелей смерти в течение не более 24 часов и расцененных по данным аутопсии как смерть сердечного генеза.

Для выявления ассоциации анализируемых генотипов с внезапной смертью в качестве контроля были обследованы две популяционные выборки.

1) Мальчики-подростки 14–17 лет, учащиеся общеобразовательных школ (234 человека). Они были отобраны методом случайных чисел из основной выборки, после деления ее по полу. Основная выборка была сформирована в 2003 г. в Октябрьском районе г. Новосибирска в ходе проведения одномоментного популяционного исследования школьников 14–17 лет. Из проживающих в обследуемом районе 7200 детей подросткового возраста к обследованию было намечено 700 учащихся (примерно 10 %), что обеспечивало репрезентативность выборки. Из 20 школ Октябрьского района методом случайных чисел отобрали 10 школ, единицей выборки был класс из параллели. В выбранных классах проводилось сплошное обследование школьников. Всего было обследовано 667 человек, отклик составил 95 %. Проведение скрининга согласовано с местными органами

здравоохранения и образования. Исследование соответствовало этическим стандартам биоэтического комитета НИИ терапии СО РАМН, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправкой 2000 г. и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Родители подростков и сами подростки дали информированное согласие на участие в исследовании.

2) Мужчины, подобранные по возрасту к группе ВСС, – жители того же района г. Новосибирска (246 человек). Мужчины были отобраны из популяционной выборки, сформированной в рамках международного проекта «НАПЕЕ» (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe).

ДНК выделяли из крови и тканей стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Полиморфизм rs2228314 гена *SREBF2* детектировался с помощью ПЦР, праймеры SREBF2d 5'-agtgaccattaacaccttttgatac-3' и SREBF2r 5'-cactggaagactttcttgagca-3'. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 75 мМ Трис-HCl (pH 8,8), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,5 мкг суммарной ДНК, по 0,5 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ MgCl₂ и 0,6 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск). Режим ПЦР: 31 цикл, включающий денатурацию (95 °С, 30 с), отжиг (60 °С, 30 с) и элонгацию (72 °С, 30 с). Размер продукта амплификации составлял 202 пары нуклеотидов (п. н.). Затем к ПЦР продукту добавляли 5 ед. акт. рестриктазы Msp I («СибЭнзим») и инкубировали в течение 16 ч при 37 °С. Детекцию продуктов амплификации и рестрикции проводили методом электрофореза в 4 % полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. При наличии аллеля G детектировались три фрагмента длиной 116, 52 и 34 п. н.; при наличии аллеля C двух фрагментов – 86 и 116 п. н.

На первом этапе статистического анализа определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых ОНП в группе с ВСС и контрольных группах, потом оценивали соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга в контрольных группах (по критерию χ^2). Сравнение выборок по частотам генотипов и аллелей выполняли с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц применяли точный двусторонний критерий Фишера. От-

носительный риск заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов. На втором этапе в контрольных группах проводили сравнение уровня таких показателей, как рост, масса тела, индекс массы тела, артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое), частота сердечных сокращений, содержание в крови общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности, триглицеридов, индекс атерогенности, концентрация глюкозы в крови, у носителей разных генотипов (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 проводили с помощью теста Крускала–Уоллиса, достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью теста Манна–Уитни для двух независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе мужчин и в группе подростков частоты генотипов полиморфизма rs2228314 гена *SREBF2* находятся в равновесии Харди–Вайнберга (табл. 1). При сравнении популяционной выборки мужчин и группы с ВСС по частотам генотипов rs2228314 гена *SREBF2* между ними выявлено статистически значимое различие ($p = 0,003$). Отношение шансов обнаружить носителя генотипа CC в группе с ВСС в 2,7 раза выше (95 % ДИ 1,2–6,2; $p = 0,020$), чем в популяционной выборке мужчин аналогично-

Таблица 1

Частоты генотипов полиморфизма rs2228314 гена *SREBF2* в исследуемых группах

Генотип	ВСС		Контроль		Подростки	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
GG	150	64,1	140	56,9	131	56,0
CG	64	27,4	98	39,8	85	36,3
CC	20	8,5	8	3,3	18	7,7
Аллель	%		%		%	
G	78		77		74	
C	22		23		26	

Таблица 2

Частоты генотипов полиморфизма rs2228314 гена SREBF2 в выборке с ВСС в разных возрастных группах, %

Генотип	До 45 лет	45–49 лет	50–54 лет	55–59 лет	60 лет и старше
GG	73,0	74,4	56,4	56,8	64,6
CG	18,9	18,6	32,7	34,1	29,2
CC	8,1	7,0	10,9	9,1	6,2

го возраста. При сравнении частот генотипов в группе подростков с контрольной группой мужчин, в последней обнаружено значимое снижение доли носителей генотипа CC – отношение шансов 2,5 (95 % ДИ 1,1–5,8; $p = 0,042$). Кроме того, показано достоверное увеличение частоты носительства гетерозиготного генотипа CG у подростков по сравнению с лицами группы ВСС, отношение шансов 1,5 (95 % ДИ 1,1–2,2; $p = 0,047$). В контрольной группе частота носительства генотипа CG выше, чем в группе с ВСС, отношение шансов 1,8 (95 % ДИ 1,2–2,6; $p = 0,005$).

При разделении выборки ВСС по возрастным группам получены следующие результаты (табл. 2).

У лиц, умерших ВСС в возрасте до 50 лет, наблюдается не только значимое повышение встречаемости гомозиготного генотипа CC, но и особенно выраженное снижение частоты гетерозиготного генотипа CG. Максимальные частоты носительства генотипа CC обнаружены в возрастном интервале 50–59 лет. В этом же возрастном интервале выше доля носителей гетерозиготного генотипа CG, чем у лиц более младшего и более старшего возраста в группе ВСС. Возможно, что эти возрастные отличия в частоте носительства разных генотипов отчасти отражают вклад этих генотипов в развитие феномена ВСС.

Исходя из полученных результатов, в качестве гипотезы, требующей дополнительной проверки, можно предположить, что гетерозиготный генотип CG является условно протективным в отношении ВСС (не отличается у подростков и мужчин в группе контроля и существенно снижен в группе мужчин с ВСС до 50 лет), гомозиготный генотип CC ассоциирован с повышенным риском ВСС (доля носителей увеличена среди умерших ВСС по сравнению с мужчинами из группы контроля; доля носителей снижена в группе контроля по сравнению с подростками – нельзя исключить выбывание с возрастом носителей генотипа CC

из популяции из-за повышенной селективной смертности, в том числе и по причине ВСС).

Сравнили в группе подростков у носителей разных генотипов средние уровни следующих показателей: рост, масса тела, индекс массы тела, артериальное давление (систолическое, диастолическое, пульсовое), частота сердечных сокращений, содержание в крови общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности, триглицеридов, индекс атерогенности, концентрация глюкозы в крови. rs2228314 оказался ассоциирован с индексом массы тела ($p = 0,023$, в тесте Крускала–Уоллиса) и пульсовым артериальным давлением ($p = 0,005$, в тесте Крускала–Уоллиса).

В группе мужчин носителей генотипа GG уровень триглицеридов оказался достоверно выше, чем у носителей двух других генотипов ($p = 0,024$ в тесте Манна–Уитни).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полиморфизм rs2228314 гена SREBF2 ассоциирован с внезапной сердечной смертью в популяции Западной Сибири.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность академику Юрию Петровичу Никитину и профессору Софье Константиновне Малютинной за предоставленную возможность сформировать контрольную группу мужчин на материале когорты НАРПЕЕ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-исследовательского проекта «Изучение молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к внезапной сердечной смерти» (проект № 10-04-01448-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазур Н.А. Внезапная сердечная смерть // Рус. мед. журн. 1995. 1. (6). 7–9.
Mazur N.A. Sudden cardiac death // Rus. med. zhurn. 1995. 1. (6). 7–9.
2. Snapir A., Heinonen P., Tuomainen T.P. et al. An insertion/deletion polymorphism in the alpha2B-adrenergic receptor gene is a novel genetic risk factor for acute coronary events // J. Am. Coll. Cardiol. 2001. 37. (6). 1516–1522.
3. Mikkelsen J., Perola M., Laippala P. et al. Glycoprotein IIIa Pl(A1/A2) polymorphism and sudden cardiac death // J. Am. Coll. Cardiol. 2000. 36. (4). 1317–1323.
4. Brugada R. Role of molecular biology in identifying individuals at risk for sudden cardiac death // Am. J. Cardiol. 86. 28K–33K. (год?)

5. Schwartz P.J., La Rovere M.T., Vanoli E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death // *Circulation*. 1992. 85. (Suppl. 1). 177–191.
6. MONICA Monograph and Multimedia Sourcebook. World's largest study of heart disease, stroke, risk factors, and population trends 1979–2002. Edited by Hugh Tunstall-Pedoe (with 64 other contributors for the WHO MONICA Project). Geneva, 2003. 237 p.
7. Колчанов Н.А., Воевода М.И., Кузнецова Т.Н. и др. Генные сети липидного метаболизма // *Бюл. СО РАМН*. 2006. (2). 29–42.
- Kolchanov N.A., Voevoda M.I., Kuznetsova T.N. et al. Gene networks of lipid metabolism // *Byul. SO RAMN*. 2006. (2). 29–42.
8. Park H.J., Georgescu S.P., Du C., Madias C., Aronovitz M.J., Welzig C.M., Wang B., Begley U., Zhang Y., Blaustein R.O., Patten R.D., Karas R.H., Van Tol H.H., Osborne T.F., Shimano H., Liao R., Link M.S., Galper J.B. Parasympathetic response in chick myocytes and mouse heart is controlled by SREBP // *J. Clin. Invest.* 2008. Jan. 118. (1). 259–71.
9. Fan Y.M., Karhunen P.J., Levula M. et al. Expression of sterol regulatory element-binding transcription factor (SREBF) 2 and SREBF cleavage-activating protein (SCAP) in human atheroma and the association of their allelic variants with sudden cardiac death // *Thromb. J.* 2008. 6. 17.
10. Chen Z., Ding Z., Ma G. et al. Sterol regulatory element-binding transcription factor (SREBF)-2, SREBF cleavage-activating protein (SCAP), and premature coronary artery disease in a Chinese population // *Mol. Biol. Rep.* 2011. 38. 2895–2901.
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 K., Kalko S., Cantor Ch. Ripple-electrophoresis and methods of working with large DNA molecules // *Genome Analysis*. M.: Mir, 1990. 58–94.

ASSOCIATION GENE POLYMORPHISM *SREBF2* WITH SUDDEN CARDIAC DEATH

Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV^{1,2}, Igor Vyacheslavovich KULIKOV^{1,3},
Sergey Nikolaevich USTINOV¹, Anastasiya Andryeevna IVANOVA⁴,
Vladimir Pavlovich NOVOSELOV^{2,5}, Sergey Vladimirovich SAVCHENKO²

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

²*Novosibirsk State Medical University, 630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

³*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090, Novosibirsk, Akademik Lavrent'ev av., 10*

⁴*Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2*

⁵*Novosibirsk Regional Bureau of Forensic Medicine, 630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 134*

Object: The association of polymorphism rs2228314 of *SREBF2* gene with sudden cardiac death (SCD) has been investigated in the population of Western Siberia. **Materials and methods:** Autopsy material from 234 men died in case of the SCD. Control groups: 1) 234 teenagers 14–17 years old, 2) men matched for age (246). **Results:** The statistically significant difference ($p = 0.003$) has been found by comparison of the population group (adults) and the group with SCD in genotype frequencies of rs2228314 gene *SREBF2*. Odds ratio of the genotype CC in the group with SCD is 2.7 **Conclusion:** Polymorphism of rs2228314 gene *SREBF2* is associated with sudden cardiac death in the population of Western Siberia.

Key words: candidate genes for cardiovascular disease, sudden cardiac death, population-based study, single nucleotide polymorphism of rs2228314 *SREBF2* gene.

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

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

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

Ivanova A.A. – student of medical faculty, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Novoselov V.P. – doctor of medical sciences, professor, head, e-mail: sme@sibsme.ru

Savchenko S.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for forensic medicine