

Кукава Нино Гуриеловна

Ассоциация полиморфизмов в белок-кодирующих генах и уровня экспрессии микроРНК с развитием инфаркта миокарда и долгосрочный прогноз после инфаркта миокарда по данным проведенного генетического анализа

14.01.05 – Кардиология

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва, 2017 год

Работа выполнена в отделе неотложной кардиологии НИИ Клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения РФ и в Институте экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения РФ.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук
Доктор биологических наук, профессор

Шахнович Роман Михайлович
Фаворова Ольга Олеговна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор кафедры терапии, кардиологии и функциональной диагностики с курсом нефрологии ФГБУ ДПО "Центральная государственная медицинская академия" УД Президента РФ

Затейщиков Дмитрий Александрович

Доктор биологических наук, профессор главный научный сотрудник лаборатории химической физики биоаналитических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Носиков Валерий Вячеславович

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «__» февраля 2017 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению учёной степени кандидата медицинских наук в НИИ Клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения РФ по адресу: 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская д.15А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «МНИЦ кардиологии» МЗ РФ (121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15а) и на сайте <http://cardioweb.ru/>.

Автореферат разослан «____» «_____» 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н.

Сергиенко Игорь Владимирович

Список сокращений

АГ- артериальная гипертензия
АКШ – аорто-коронарное шунтирование
АСБ – атеросклеротическая бляшка
АпоЕ – аполипопротеин Е
ГГЦ – гипергомоцистеинемия
ДИ – доверительный интервал
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИИ – ишемический инсульт
ИМ – инфаркт миокарда
ИМбпST – ИМ без подъема сегмента ST
ИМпST – ИМ с подъемом сегмента ST
КФК – креатинфосфокиназа
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
МикроРНК – микроРибонуклеиновая кислота
НС – нестабильная стенокардия
ОКС – острый коронарный синдром
ОНП– однонуклеотидный полиморфизм
ОР – относительный риск
ОХЛ – общий холестерин
ОШ – отношение шансов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР- ПДФ- анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР
ПЦР – SSP- ПЦР с использованием набора аллелеспецифических праймеров
п.н. – пары нуклеотидов
СГ – семейная гиперхолестеринемия
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТГ – триглицериды
ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство
ЭКГ – электрокардиограмма (графия)
ЭК – эндотелиальные клетки
ЭХОКГ – эхокардиография
СРР– С-реактивный белок
АпоЕ – аполипопротеина Е
eNOS – эндотелиальной NO-синтаза
GWAS – полногеномный поиск ассоциаций
LPL – липопротеинлипаза
MTHFR – метилен-тетрагидрофолат-редуктаза
NO – оксид азота
PCSK9 – пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9
vWF – фактора фон Виллебранда

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

ИМ представляет собой мультифакториальное заболевание, в развитии которого принимают участие как многочисленные внешние (приобретенные) факторы, так и генетические факторы. ИМ имеет полигенную генетическую природу, ему присущ не-Менделевский характер наследования, что является следствием взаимодействия ряда генов. Генетическая предрасположенность к ИБС хорошо изучена с помощью полногеномных ассоциативных исследований (GWASs), тогда как для ИМ как отдельной нозологии проведено относительно немного полногеномных исследований (Dai X. et al, 2016, Roberts R. 2014). Наблюдается плохая воспроизводимость ассоциаций немногочисленных связанных с ИМ локусов, выявленных в отдельных работах, что может быть связано с этническими различиями между выборками. Хотя GWASs направлены на поиск генетических вариантов, которые позволили бы оценивать риск ИМ, пока они не привели к существенному прогрессу в изучении риска развития этого заболевания (Dehghan A. et al, 2016), а идентифицированные локусы объясняют только незначительную долю случаев ИМ.

Традиционный подход «ген-кандидат» сохраняет свою значимость. Число выбранных генов-кандидатов в таких исследованиях невелико; как правило, изучаются гены, белковые продукты которых имеют прямое отношение к звеньям патогенеза заболевания (свертывающая система, метаболизм липидов и др.). Важно отметить, что задача выявления генов, аллельный полиморфизм которых определяет предрасположенность к развитию ИМ, должна решаться отдельно для каждого этноса, поскольку значимость влияния отдельных генов на предрасположенность может варьировать в разных этнических группах вследствие различия у них частот аллелей одного полиморфизма.

В последние годы широко изучается значение генетических факторов при стратификации риска после ИМ, поскольку стабильность и неизменность генетических факторов является потенциальным преимуществом по сравнению с лабильным уровнем биомаркеров.

Наряду с генетическими исследованиями, активно проводится изучение эпигенетических процессов, в частности, роли микроРНК в регуляции функции сердечно-сосудистой системы (Saheli Samanta et al, 2016). Открытые в конце XX века микроРНК представляют особую регуляторную систему, которая контролирует экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Доказана их важная роль в становлении и поддержании гомеостаза биологических систем в норме, а также в формировании патологических изменений в случае болезни. К настоящему времени описаны около 5 тысяч микроРНК у животных и растений, из них более 1000 – у человека. Можно считать установленным, что они контролируют не менее трети человеческого генома. Показано, что нарушение правильного функционирования определенных микроРНК может приводить к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, атеросклероза, ишемической болезни сердца, фиброза сердца, постинфарктного ремоделирования миокарда, хронической сердечной недостаточности и нарушениям ритма сердца. Тканеспецифичность и высокая скорость изменения экспрессии микроРНК в сочетании с возможностью выхода этих молекул из клеток в кровоток в стабильной форме делает их перспективными в качестве

новых диагностических и прогностических маркеров ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе для ИМ (Rokas Navickas et al, 2016).

Изучение генетической и эпигенетической природы ИМ продолжается во всем мире в направлении выявления как новых генетических полиморфизмов, ассоциированных с заболеванием, так и новых микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при ИМ, а также путем валидации полученных результатов в других популяциях. Работа проведена для индивидов русской этнической принадлежности; она направлена на выявление новых генетических маркеров и анализ экспрессии ряда микроРНК с целью изучения их влияния на развитие ИМ и прогноз после ИМ.

Степень разработанности темы

На протяжении десятилетий в мире проведены многочисленные исследования, посвященные поиску ассоциации различных полиморфных вариантов генов-кандидатов с развитием ИМ для различных этносов. В русской популяции широко исследованы гены *ACE* (Малыгина Н.А. 2002, Беркович О.А. 2001, Шахнович Р.М. 2010 и др), *AGT* и *AGTRI* (Чистяков Д.А 2000), *PAI* (Затейщиков 2008, Селезнева Н.Д. 2008.), *FGB* (Закирова В.Б. 2008), *MTHFR* (Бондарь И.А. 2007), *eNOS* (Березикова Е.Н. 2010), *ApoE* (Мустафина О.Е. 2002), *CRP* (Сухинина 2012), *ApoB* (Воевода М.И. 2007), *LPL* (Сайгитов Р.Т. 2008) и *TNF* (Малыгина Н.А. 2011 и др), роль белковых продуктов которых в атерогенезе и патогенезе ИБС и ИМ давно известна. Для многих генов результаты противоречивы, что не дает возможности сделать однозначный вывод об их месте в общей картине генетической предрасположенности к ССЗ у русских. Расширение панели исследуемых генов, а также валидация результатов, полученных для исследованных ранее генов, с применением новых подходов, таких как комплексный анализ с поиском сочетаний аллелей и генотипов полиморфных участков различных генов и анализ кумулятивного эффекта этих сочетаний, - наиболее перспективные направления. Для нашего исследования мы выбрали гены, которые имеют отношение к механизмам атерогенеза и атеротромбоза.

Цель исследования

Комплексный анализ ассоциации носительства аллелей и генотипов полиморфных участков генов-кандидатов и их сочетаний, а также уровня экспрессии микроРНК, с риском возникновения ИМ; долгосрочный прогноз неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных после перенесенного ИМ по результатам генотипирования.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ у больных с ИМ и в контрольной группе здоровых лиц распределения вариантов полиморфных участков генов системы липидного обмена (*PCSK9*, *LPL*, *ApoE*), метаболизма оксида азота (*eNOS*) и гомоцистеина (*MTHFR*).
2. С помощью метода логистической регрессии оценить эффективность выявленных генетических маркеров поодиночке и в сочетании для предсказания индивидуального генетического риска развития ИМ.
3. Провести мультилокусный анализ совместного влияния носительства аллелей и генотипов исследованных полиморфных участков генов на риск развития ИМ.

4. Провести анализ влияния полиморфизмов изучаемых генов на предрасположенность к ИМ в зависимости от возраста, пола и варианта ИМ (с подъемом или без подъема ST).

5. Оценить значимость каждого из выявленных генетических маркеров и их сочетания (композитного генетического маркера риска ИМ) для прогноза неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных, перенесших ИМ, по данным долгосрочного наблюдения.

6. Провести сравнительный анализ уровней экспрессии 84 микроРНК, потенциально вовлеченных в развитие воспаления, в плазме крови больных с ИМ и в контрольной группе.

Научная новизна

Продемонстрирована ассоциация полиморфных участков 1420G>A гена *PCSK9*, 495T>G гена *LPL*, эpsilon-полиморфизма гена *ApoE*, 677C>T гена *MTHFR* и 786T>C гена *eNOS* с риском развития ИМ. Выявлена связь носительства генотипа *MTHFR**677T/T с развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после перенесенного ИМ по данным долгосрочного наблюдения.

При сравнении уровней экспрессии 84 микроРНК, потенциально вовлеченных в воспаление, показана дифференциальная экспрессия микроРНК-21-5p и микроРНК-15b-5p в плазме крови больных ИМ.

Теоретическая и практическая значимость

С целью стратификации риска развития ИМ может быть использовано геномное типирование полиморфных участков 1420G>A гена *PCSK9*, 495T>G гена *LPL*, эpsilon-полиморфизма гена *ApoE*, 677C>T гена *MTHFR* и 786T>C гена *eNOS*. Полученные результаты позволят выявлять групп высокого риска развития ИМ.

На основании генетического типирования обнаружен новый генетический маркер неблагоприятных исходов у больных с ИМ: полиморфный участок 677C>T гена *MTHFR*.

Апробация и внедрение в практику полученных результатов

Результаты работы внедрены в научную и практическую работу ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ. Материалы диссертации доложены на межотделенческой конференции НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ по апробации кандидатских диссертаций 20.07.2017г., Протокол №48. Диссертация рекомендована к защите.

Публикации

По материалам исследований опубликовано 5 научных работ, из них 3 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, выводов и практических рекомендаций, списка цитированной литературы, который содержит 285 источников. В работе приведены 18 таблиц и 8 рисунков.

Личный вклад автора

Автором лично проведен отбор больных согласно критериям включения/исключения, создана база данных, проведены статистическая обработка материала, включая эпидемиологические и клинические данные, анализ и научная интерпретация полученных результатов. Написала и опубликовала печатные работы в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, в которых отражены полученные результаты.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в отделе неотложной кардиологии Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ и в лаборатории функциональной геномики сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ.

Протокол исследования представлен на рисунке 1.

Рисунок 1. Протокол исследования



В исследование, проводимое методом «случай-контроль», включены этнические русские (по самоидентификации). Всего включено 405 больных с ИМ (57.5 ± 12.8 лет). Контрольная группа состояла из 198 лиц без ССЗ в анамнезе сопоставимого возраста. От всех лиц получено информированное согласие на участие в исследовании.

Во всех случаях диагноз ИМ был поставлен на основании 3-го Универсального определения инфаркта миокарда, 2013 г (3-е Универсальное определение инфаркта миокарда. Российский кардиологический журнал, 2013; 2(100), приложение 1.).

В контрольную группу включали лиц, у которых диагноз ИБС был исключен на основании амбулаторного или стационарного обследования, включавшего осмотр кардиолога, регистрацию ЭКГ в покое и на фоне физической нагрузки. В некоторых случаях проводилась диагностическая инвазивная или неинвазивная коронароангиография, на которой были выявлены интактные коронарные артерии. У

ближайших родственников лиц контрольной группы в возрасте моложе 55 лет у мужчин и 65 лет у женщин не было ИМ, стенокардии, инсульта, стенозирующего поражения периферических или сонных артерий.

Критерии исключения из исследования

Тяжелые заболевания, самостоятельно влияющие на прогноз: анемия, тяжелый сахарный диабет, тиреотоксикоз, почечная недостаточность (креатинин > 200 мкмоль/л), печеночная недостаточность (АЛТ > 200 ЕД/л), онкологические заболевания. Острые инфекционные и воспалительные заболевания, требующие постоянного приема НПВС, блокаторов ЦОГ-2, глюкокортикоидов (ревматоидный артрит и другие заболевания соединительной ткани, хронические болевые синдромы, тяжелое течение бронхиальной астмы). Тяжелые хирургические операции в течение двух месяцев перед ИМ или перед включением (для контрольной группы); проведение чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) или аорто-коронарного шунтирования (АКШ) в течение шести месяцев перед ИМ.

Лечение больных с ИМ

Большинству больных с ИМпСТ проведена реперфузионная терапия. Тромболитическая терапия (ТЛТ) проводилась пациентам либо в стационаре, либо на этапе скорой медицинской помощи. В качестве тромболитического препарата использовали стрептокиназу, проурокиназу или альтеплазу. Эндovasкулярную реваскуляризацию выполняли как самостоятельный метод реперфузионного лечения (первичное ЧКВ) или после проведенной тромболитической терапии. В дальнейшем при отсутствии противопоказаний больные получали стандартную медикаментозную терапию, включающую аспирин, клопидогрел или тикагрелор, бета-блокаторы, статины, ингибиторы АПФ или блокаторы рецептора АТ₂, а также мочегонные и другие препараты по показаниям. В случае выявления по данным первичной ангиографии тяжелых стенозов в коронарных артериях (кроме инфаркт-связанной) и/или признаков ишемии пациентам была рекомендована инвазивная реваскуляризация - ЧКВ или хирургическое лечение.

Больным с ИМбпСТ назначали стандартную лекарственную терапию, аналогичную больным с ИМпСТ. Помимо консервативного лечения, части пациентов этой группы проводилось экстренное или плановое ЧКВ, в зависимости от клинической ситуации. Больным с ИМпСТ и ИМбпСТ устанавливали как стенты с лекарственным покрытием, так и голометаллические стенты.

Исходные характеристики групп

Сравнительная характеристика группы больных с ИМ и контрольной группы представлена в таблице 1. Эти группы оказались сопоставимы по основным демографическим и клиническим параметрам; значимые различия наблюдались только по числу курящих, процент которых был значимо выше у больных ИМ ($p = 0.03$). Средний возраст больных составил 57.5 ± 12.8 лет. В группе ИМ было 67% мужчин (270) и 33% женщин (135). Среди больных ИМ у 327 человек диагностирован ИМпСТ, у 78 человек – ИМбпСТ. У 45,6% (185) больных был выявлен ИМ передней локализации. Сопутствующая АГ была выявлена у 67% больных, сахарный диабет – у 13%, гиперхолестеринемия – у 75% больных, курение - 52%. У 14% (59) больных в анамнезе перенесенный ИМ. 1 больной (0,2%) перенес ранее операцию коронарного шунтирования, 9 (2%) больным ранее проводилось ЧКВ.

Контрольная группа состояла из 198 лиц, русских, без ССЗ в анамнезе, ср. в. 59.8 ± 13.3 лет. Из них 112 мужчин (ср. в. 57.1 ± 11.9 лет) и 86 женщин (ср. в. 63.2 ± 14.2 лет). Сахарным диабетом страдали 9% (19) больных, у 62% (129) была АГ, 34% (72) участников курят.

Таблица 1. Сравнительная характеристика больных с ИМ и контрольной группы.

Показатель	Больные ИМ (N=405)	Контрольная группа (N=198)	p
Средний возраст, лет	57.5 ± 12.8	59.8 ± 13.3	нд
Мужчины, %	67	55	нд
Артериальная гипертензия, %	67	62	нд
Сахарный диабет, %	13	9	нд
Курение, %	52	34	0.03
Общий холестерин, ммоль/л	6.17 ± 1.47	5.8 ± 0.4	нд
Триглицериды, ммоль/л	2.42 ± 2.21	1.9 ± 0.2	нд

Через 7-10 лет после перенесенного ИМ осуществляли телефонный контакт с больными или членами их семей для определения состояния каждого больного и выявления конечных точек. В таблице 2 представлена клиническая характеристика больных у которых был оценен прогноз (на момент включения в исследование). В качестве конечных точек рассматривались: сердечно-сосудистая смерть, повторный ИМ, ишемический инсульт, госпитализация в связи с нестабильной стенокардией, проведение незапланированной реваскуляризации: АКШ или ЧКВ.

Таблица 2. Характеристика больных с ИМ у которых был оценен прогноз.

Общее количество больных/мужчины	133/104
Средний возраст, лет	53.7 ± 9.3
Артериальная гипертензия, %	66
Сахарный диабет, %	13
Курение, %	66
Общий холестерин, ммоль/л	6.23 ± 1.47
ФВ < 40% (%)	27
Многососудистое поражение коронарных артерий (%)	45

Методы исследования

Генетический анализ

Выделение геномной ДНК из периферической крови

Для получения ДНК необходимой чистоты и достаточного молекулярного веса применяли метод выделения ДНК из крови с использованием экстракции смесью фенол-хлороформ с помощью модифицированного метода Sambrook и соавт. (Sambrook J. et al, 1989)

Геномное типирование

Геномное типирование проводили методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали метод анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов продуктов ПЦР (метод ПЦР-ПДФ), где олигонуклеотидная замена входит в

состав сайта узнавания специфической рестриктазы, и генотипы определяют по наличию или отсутствию фрагментов рестрикции; и метод ПЦР с использованием аллелеспецифических праймеров (метод ПЦР-SSP), где генотипы определяют по наличию или отсутствию продукта амплификации в случае праймера, специфического для определенного аллеля. В каждый эксперимент в качестве отрицательного контроля включали пробу без ДНК-матрицы. ПЦР проводили в амплификаторе MC16 (АО "ДНК Технология", Россия) или Genius (Techne, Великобритания).

Анализ экспрессии микроРНК в плазме крови больных ИМ и здоровых контролей

Анализ экспрессии микроРНК проводили у трех больных русской этнической принадлежности мужского пола в возрасте от 41 до 61 года с ИМ и у трех согласованных по возрасту и этнической принадлежности мужчин без ССЗ и других тяжелых сопутствующих заболеваний в анамнезе (контрольная группа). Образцы крови для анализа экспрессии микроРНК собирали в утреннее время, от 8 до 10 часов утра; у больных ИМ первый забор крови производили не позднее чем через 12 часов от начала заболевания. Плазму, освобожденную от тромбоцитов, получали путем ее дополнительного двойного центрифугирования при 2500g.

Определяли уровни экспрессии в плазме крови 84 микроРНК, используя набор miScriptmiRNAPCRArrayMIHS-105Z. Оценку уровней экспрессии проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с последующим расчетом относительной экспрессии микроРНК у больных ИМ и здоровых контролей с использованием дельта-дельта C_t ($\Delta\Delta C_t$) метода. Для нормализации экспрессии микроРНК использовали среднее значение C_t малых ядерных РНК SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A и малой ядерной РНК RNU6-6P.

Статистический анализ

Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга проводили с использованием программы Haploview 4.0 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Поиск ассоциаций носительства аллелей и генотипов отдельных ОНП и их сочетаний с развитием ИМ проводили с помощью программного обеспечения APSampler. Значимость найденных ассоциаций оценивали с помощью точного критерия Фишера (p) и по значениям отношения шансов (ОШ) и его 95% доверительного интервала (ДИ). Значимыми считали различия сравниваемых частот при значении $p < 0.05$, при условии, что значения 95% ДИ для ОШ не пересекали 1. При анализе ассоциации с ИМ триаллельного эпсилон-полиморфизма гена *ApoE* использовали поправку Бонферрони. Для построения предиктивных моделей использовали метод логистической регрессии с пошаговым включением переменных (пакет stats v.3.3.1 for R). Прогностическую эффективность оценивали по площади под кривой (AUC) при ROC (receiveroperatingcharacteristic) анализе с использованием пакета pROCv.1.8 forR; парные сравнения проводили по методу DeLong. Для оценки чувствительности и специфичности предиктивных моделей рассчитывали пороговый уровень вероятности по методу Youden W.J.

Для сравнения концентраций общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ) в различных группах больных ИМ использовали непараметрический тест Манна-Уитни с

использованием программного обеспечения GraphPadInstat. Значимым считали различие сравниваемых частот при значении $p < 0.05$.

Ассоциацию носительства генетических вариантов с различными наборами неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после перенесенного ИМ исследовали, используя оценки Каплана-Мейера и регрессию Кокса для расчета относительного риска (ОР). Цензурированными считали те случаи, когда индивид выбывал из исследования по причинам, отличным от конечных точек, описанных выше.

Для проверки гипотезы об ассоциации носительства вариантов исследованных генов с неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями при построении регрессионных моделей использовали для оценки отличий значения ОР от единицы критерий Вальда. Значимыми считали оценки, полученные при $p \leq 0.05$, при условии, что значения 95% доверительных интервалов (ДИ) как для среднего значения частоты выживания, так и для ОР не пересекали 1. ОР и его ДИ в однофакторном анализе рассчитывали в модели логистической регрессии с поправкой на возраст.

Анализ дифференциальной экспрессии микроРНК проводили при помощи статистического пакета edgeR version 3.14.0 (Robinson MD et al, 2010). Оценку дифференциальной экспрессии получали при помощи обобщенных линейных моделей (GLM) (McCarthy DJ et al, 2012). Значение p корректировали, оценивая вероятность найти ложный результат среди отобранных (False Discovery Rate, FDR) (Benjamini Y, Hochberg Y, 1995). Оценки считали статистически значимыми при $FDR < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение частот аллелей и генотипов полиморфных участков отдельных генов: 1420G>A гена *PCSK9*, 495T>G гена *LPL*, эпсилон-полиморфизма гена *ApoE*, 677C>T гена *MTHFR* и 786T>C гена *eNOS* у больных ИМ и в группе контроля

Проведено сравнение частот аллелей и генотипов полиморфных участков 1420G>A гена *PCSK9* (rs562556), 495T>G гена *LPL* (rs320), эпсилон-полиморфизма гена *ApoE* (rs7412, rs429358), 677C>T гена *MTHFR* (rs1801133) и 786T>C гена *eNOS* (rs2070744) у больных ИМ и в группе контроля. Отклонений в распределении наблюдаемых частот аллелей и генотипов полиморфных участков генов *eNOS* и *MTHFR* от равновесия Харди-Вайнберга не наблюдали ни для больных ИМ, ни для индивидов контрольной группы. Для генов *LPL*, *ApoE*, *PCSK9* равновесие Харди-Вайнберга соблюдалось только у индивидов контрольной группы.

Частоты аллелей и генотипов полиморфного участка 1420G>A гена *PCSK9* у больных с ИМ и в группе контроля приведены в таблице 3. Наблюдалось значимое различие в частоте носительства аллеля *PCSK9**1420G (сумма генотипов G/G и A/G); в контрольной группе носительство этого аллеля было выше, чем у больных ИМ ($p=0.013$, ОШ=0.69, 95%ДИ: 0.47-1.00). Генотип *PCSK9* *1420A/G также обнаруживался чаще в контрольной группе ($p=0.010$, ОШ=0.62, 95%ДИ: 0.42-0.91). В группе больных ИМ генотип *PCSK9* *1420A/A встречался значимо чаще, чем в контроле ($p=0.013$, ОШ=1.45, 95%ДИ: 1.00-2.10), что говорит о позитивной ассоциации данного генотипа с развитием ИМ.

Таблица 3. Распределение аллелей и генотипов полиморфного участка 1420G>A гена PCSK9 (rs562556) у больных ИМ и в контрольной группе

Аллели/генотипы	Больные (N=405) n(%)	Контроль (N=198) n(%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ) для значимых различий
Частота аллелей				
A	692 (85)	326 (82)	НЗ	
G	118 (15)	70(18)	НЗ	
Частота носительства аллелей				
A	389(96)	193(97)	НЗ	
G	102(25)	65(33)	0.013	0.69 (0.47-1.00)
Частота генотипов				
A/A	303(75)	133(67)	0.013	1.45 (1.00-2.10)
A/G	86(21)	60(30)	0.010	0.62 (0.42-0.91)
G/G	16(4)	5(3)	НЗ	

НЗ –не значимо (здесь и далее)

Частоты аллелей и генотипов полиморфного участка 495T>G гена *LPL* у больных с ИМ и в группе контроля приведены в таблице 4. Наблюдалось значимое различие в частоте носительства аллеля *LPL*495T* (сумма генотипов Т/Т и G/Т), которая в контрольной группе была выше ($p=0.032$, ОШ=0.51, 95% ДИ: 0.25-0.99). Соответственно, в группе больных ИМ генотип *LPL*495G/G* встречался значимо чаще, чем в контроле ($p=0.032$, ОШ=1.96, 95%ДИ: 1.00-3.91).

Таблица 4. Распределение аллелей и генотипов полиморфного участка 495T>G гена *LPL(rs320)* у больных ИМ и в контрольной группе

Аллели/генотипы	Больные N=405 n (%)	Контроль N=198 n(%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ) для значимых различий
Частота аллелей				
G	234(29)	96 (24)	НЗ	
T	576(71)	300 (76)	НЗ	
Частота носительства аллелей				
G	192(47)	85 (43)	НЗ	
T	363(90)	187 (94)	0.032	0.51 (0.25-0.99)
Частота генотипов				
G/G	42(10)	11(6)	0.032	1.96 (1.00-3.91)
G/T	150(37)	74 (37)	НЗ	
T/T	213(53)	113 (57)	НЗ	

Частоты аллелей и генотипов эpsilon-полиморфизма гена *ApoE* у больных ИМ и в контрольной группе приведены в таблице 5. Выявлено, что частота генотипа $\epsilon 3/\epsilon 3$ значимо выше в группе больных ИМ ($p=0.034$, ОШ=1.52, 95%ДИ: 1.05-2.2), а частота встречаемости аллеля $\epsilon 4$ (сумма генотипов $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ и $\epsilon 4/\epsilon 4$) и генотипа $\epsilon 3/\epsilon 4$ значимо выше в контрольной группе ($p=0.0026$, ОШ=0.46, 95%ДИ: 0.28-0.75 и $p=0.00065$, ОШ=0.40, 95%ДИ: 0.24-0.66, соответственно).

Таблица 5. Распределение аллелей и генотипов эpsilon-полиморфизма гена ApoE (rs7412, rs429358) у больных ИМ и в контрольной группе

Аллели/генотипы	Больные N=405 n (%)	Контроль N=198 n (%)	p_{corr}^*	ОШ (95% ДИ) для значимых различий
Частота аллелей				
ε2	68 (8,5)	32 (8)	НЗ	
ε3	698(86)	326 (82)	НЗ	
ε4	44 (5,5)	38 (10)	НЗ	
Частота носительства аллелей				
ε2	63 (16)	30 (15)	НЗ	
ε3	393 (98)	194 (98)	НЗ	
ε4	40 (10)	38 (19)	0.0026	0.46 (0.28-0.75)
Частота генотипов				
ε2/ε2	5 (1)	2 (1)	НЗ	
ε2/ε3	55 (14)	26 (13)	НЗ	
ε2/ε4	3 (1)	2 (1)	НЗ	
ε3/ε3	305 (75)	132 (67)	0.034	1.52 (1.05-2.20)
ε3/ε4	33 (8)	36 (18)	0.00065	0.40 (0.24-0.66)
ε4/ε4	4 (1)	0 (0)	НЗ	

* приведены значения p с поправкой Бонферрони (p_{corr})

Частоты аллелей и генотипов полиморфного участка $-786T>C$ гена *eNOS* у больных с ИМ и в группе контроля приведены в таблице 6. Выявлено, что частота аллеля *eNOS** $-786C$ значимо выше, а аллеля *eNOS** $-786T$ – ниже у больных ИМ по сравнению с группой контроля ($p=0.006$, ОШ=1.40, 95%ДИ: 1.08-1.80 и ОШ=0.72, 95%ДИ: 0.55-0.92, соответственно). Частота носительства аллеля *eNOS** $-786C$ (сумма генотипов C/C и C/T) также значимо выше у больных ИМ ($p=0.0034$, ОШ=1.65, 95%ДИ: 1.16-2.30). Полученные данные позволяют считать аллель *eNOS** $-786C$ аллелем риска развития ИМ. Соответственно, наблюдалось значимое различие в частоте генотипа *eNOS** $-786T/T$, которая была выше в контрольной группе ($p=0.0034$, ОШ=0.61, 95%ДИ: 0.43-0.86).

Таблица 6. Распределение аллелей и генотипов полиморфного участка $-786T>C$ гена *eNOS* (rs2070744) у больных ИМ и в контрольной группе

Аллели/генотипы	Больные N=405 n (%)	Контроль N=198 n (%)	p	ОШ (95% ДИ) для значимых различий
Частота аллелей				
C	315(39)	124(31)	0.006	1.40 (1.08-1.80)
T	495(61)	272(69)	0.006	0.72 (0.55-0.92)
Частота носительства аллелей				
C	253(62)	100 (50)	0.0034	1.63 (1.16-2.30)
T	343(85)	174 (88)	НЗ	
Частота генотипов				
C/C	62(15)	24 (12)	НЗ	
C/T	191(47)	76 (38)	НЗ	
T/T	152(38)	98 (50)	0.0034	0.61 (0.43-0.86)

Достоверных различий в частотах аллелей, а также в частотах носительства аллелей и генотипов полиморфного участка 677C>T гена *MTHFR* при сравнении групп больных ИМ и здоровых индивидов обнаружено не было.

Оценка индивидуального генетического риска развития ИМ в зависимости от носительства вариантов генов *PCSK9*, *ApoE*, *LPL* и *eNOS*.

Для оценки прогностической значимости обнаруженных генетических факторов риска с помощью метода логистической регрессии была рассчитана вероятность возникновения ИМ для каждого индивида в зависимости от носительства вариантов генов *PCSK9*, *ApoE*, *LPL* и *eNOS*. Оценивали вклад аллелей/генотипов риска этих генов поодиночке и при совместном носительстве с помощью ROC-анализа, исходя из эффективности классификации индивидов на больных и здоровых. Оказалось, что рассматриваемые генетические факторы поодиночке являются плохими классификаторами риска возникновения ИМ ($AUC < 0.60$). Однако при совместном учете данных о носительстве аллелей/генотипов *PCSK9*, *ApoE*, *LPL* и *eNOS* достигается удовлетворительная прогностическая значимость ($AUC = 0.604$, 95% ДИ: 0.55-0.65). В таблице 7 представлены значения AUC для каждого из обнаруженных генетических факторов риска и для композитного генетического маркера, а также значения их 95%-ных ДИ.

Таблица 7. Индивидуальная вероятность возникновения ИМ в зависимости от носительства вариантов генов *PCSK9*, *LPL*, *ApoE* и *eNOS*.

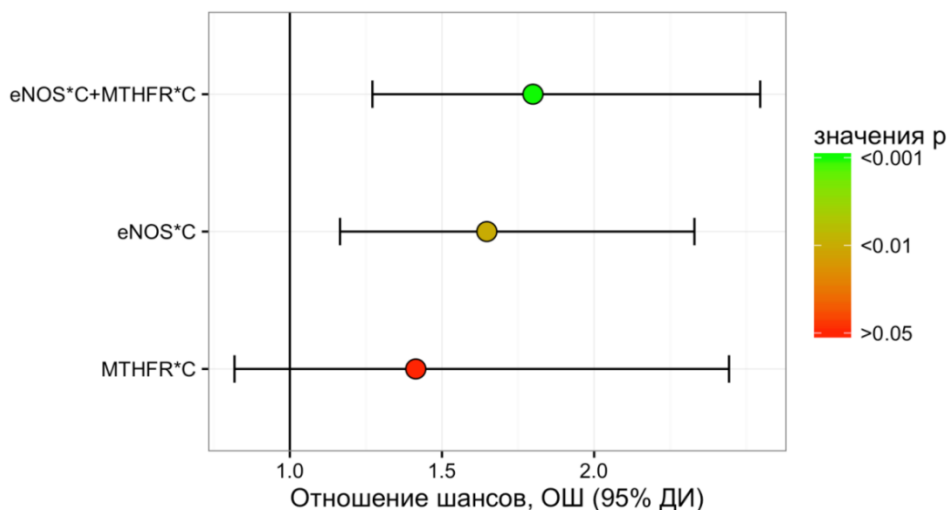
Ген, rs	Генотипы или аллели риска	AUC	95% ДИ
<i>PCSK9</i> rs562556	A/A	0.53	0.49 - 0.58
<i>LPL</i> rs320	G/G	0.52	0.50 - 0.55
эпсилон-полиморфизм гена <i>APOE</i> , rs7412,rs429358	ε3/ε3	0.54	0.47 - 0.60
<i>eNOS</i> rs2070744	C	0.56	0.52 - 0.60
<i>PCSK9</i> + <i>LPL</i> + <i>APOE</i> + <i>eNOS</i>	A/A+ G/G+ ε3/ε3+C	0.604	0.55 - 0.65

Мультилокусный анализ совместного влияния носительства аллелей и генотипов исследованных полиморфных участков генов на риск развития ИМ.

С помощью программного обеспечения APSampler, использующего динамический метод Монте-Карло, мы провели мультилокусный анализ, направленный на выявление совместного вклада в предрасположенность к ИМ сочетаний аллелей и генотипов исследуемых генов. При проведении мультилокусного анализа обнаружено, что носительство аллеля С полиморфного участка 677C>T гена *MTHFR* в сочетании с носительством аллеля С полиморфного участка 786T>C гена *eNOS* высокозначимо ассоциировано с риском ИМ ($p = 0.0006$; ОШ = 1.80), причем уровень значимости для обнаруженного биаллельного сочетания и значение его ОШ выше, чем для одного аллеля *eNOS**С ($p = 0.0034$; ОШ = 1.63). При анализе ассоциации другого компонента сочетания – аллеля *MTHFR**С– с ИМ ДИ пересекает 1, а $p > 0.05$ (рис. 2). Таким образом,

мультилокусный анализ позволил выявить в составе сочетания ассоциацию с ИМ rs1801133 в гене *MTHFR*, который поодиночке значимо не ассоциирован с ИМ.

рис. 2. Мультилокусный анализ, позволивший выявить ассоциацию с ИМ rs1801133 в гене *MTHFR*, который поодиночке значимо не ассоциирован с ИМ, в составе сочетания с rs2070744 гена *eNOS*. Представлены значения ОШ, ДИ и уровни значимости (качественно, градацией цвета кружка, соответствующего значению ОШ) для позитивно ассоциированного с ИМ биаллельного сочетания (*MTHFR**C + *eNOS**C) и его компонентов.



Распределение частот аллелей и носительства аллелей и генотипов исследуемых полиморфных участков у больных ИМпСТ и ИМбпСТ в сравнении с контрольной группой.

Проведено сравнение частот выявленных аллелей и генотипов риска развития ИМ (*eNOS**C, *PCSK9**A/A, *LPL**G/G, *ApoE**ε3/ε3 у больных ИМбпСТ и ИМпСТ и в контрольной группе (таблица 8). Носительство аллеля *eNOS**-786C сохраняло свою значимость как аллеля риска в обеих подгруппах ИМ, а ассоциация генотипа *PCSK9**A/A переставала быть значимой при разбиении группы больных ИМ на подгруппы. Носительство генотипа *ApoE**ε3/ε3 было значимо ассоциировано с ИМпСТ, но не с ИМбпСТ, причем уменьшение выборки по сравнению с общей группой больных ИМ не изменяло величины ОШ. Впрочем, нельзя исключить, что это различие в значимости ассоциации с генотипом *APOE**ε3/ε3 может быть следствием большего числа пациентов с ИМпСТ (337 человек), чем с ИМбпСТ (68 человек). Напротив, генотип *LPL**G/G достоверно чаще встречался у больных с ИМбпСТ, чем в контрольной группе, но его носительство у больных с ИМпСТ достоверно не отличалось от контрольной группы. Носительство этого генотипа в подгруппе больных ИМбпСТ характеризовалось более высоким значением ОШ, чем в общей группе больных ИМ (2.6 в сравнении с 1.96) и близкими значениями *p*, несмотря на много меньшие размеры выборки. Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что генотип *LPL**G/G может рассматриваться как маркер предрасположенности к ИМбпСТ. Предположительно, генотип *ApoE**ε3/ε3 является фактором риска ИМпСТ.

Таблица 8. Аллели / генотипы риска ИМ, выявленные в общей группе больных (405 человек), и при их разделении на подгруппы в зависимости от типа ИМ: с подъемом ST (337 человек) и без подъема ST (68 человек) при сравнении со здоровыми индивидами (198 человек)

Ген ID ОНП	Больные ИМ с подъемом ST (337 чел) vs контроли (198 чел)			Больные ИМ без подъема ST (68 чел) vs контроли (198 чел)			Все больные ИМ (405 чел) vs контроли (198 чел)		
	Частота (ИМ/контроль)	Величина <i>p</i>	ОШ (95% ДИ) для значимых сравнений	Частота (ИМ/контроль)	Величина <i>p</i>	ОШ (95% ДИ) для значимых сравнений	Частота (ИМ/контроль)	Величина <i>p</i>	ОШ (95% ДИ) для значимых сравнений
<i>eNOS</i> rs2070744*С	0.62/0.50	6.4 x 10 ⁻³	1.59(1.12-2.28)	0.65/0.50	2.9 x 10 ⁻²	1.79(1.01-3.18)	0.62/0.50	3.4 x 10 ⁻³	1.63(1.16-2.30)
<i>ApoE</i> (rs7412, rs429358)*ε3/ε3	0.76/0.67	2.1 x 10 ⁻²	1.53(1.03-2.25)	0.78/0.67	НЗ		0.75/0.67	3.4 x 10 ⁻²	1.52 (1.05-2.2)
<i>PCSK9</i> rs562556*A/A	0.74/0.67	НЗ		0.78/0.67	НЗ		0.75/0.67	1.3 x 10 ⁻²	1.45 (1.00-2.10)
<i>LPL</i> rs320*G/G	0.10/0.06	НЗ		0.13/0.06	4.0 x 10 ⁻²	2.6 (1.02-6.56)	0.10/0.06	3.2 x 10 ⁻²	1.96(1.00-3.91)

Распределение частот аллелей и носительства аллелей и генотипов исследуемых полиморфных участков у больных ИМ и контрольной группы в зависимости от пола.

Проведено сравнение частот аллелей и генотипов полиморфных участков 1420G>A гена *PCSK9*, 495T>G гена *LPL*, эпсилон-полиморфизма гена *ApoE*, 786T>C гена *eNOS* и 677C>T гена *MTHFR* и при разделении групп больных ИМ и лиц контрольной группы по полу (таблица 9).

У мужчин наблюдалось значимое различие в частоте встречаемости генотипа *PCSK9* *1420A/G, который чаще встречался в контрольной группе ($p=0.03$, ОШ=0.59, 95% ДИ:0.36-0.95). Между подгруппами женщин, больных ИМ и в контрольной группе, значимых различий в частоте встречаемости, носительстве аллелей и генотипов выявлено не было.

При сравнении частот аллелей и генотипов полиморфного участка 495T>G гена *LPL* у больных ИМ мужчин генотип *LPL**495G/G встречался значимо чаще по сравнению с мужчинами из группы контроля ($p=0.024$, ОШ=2.72, 95%ДИ:1.03-7.20), а частота носительства аллеля *LPL**495T была выше в группе контроля. Между подгруппами женщин – больных ИМ и здоровых – значимых различий в частоте встречаемости, носительстве аллелей и генотипов значимых различий выявлено не было.

При сравнении частот аллелей и генотипов эпсилон-полиморфизма гена *ApoE* у мужчин и женщин в группах ИМ и контрольной группе выявлено, что частота встречаемости аллеля $\epsilon 4$ достоверно выше у мужчин с ИМ ($p=0.006$, ОШ=0.54, 95%ДИ: 0.29-0.98). Генотип $\epsilon 3/\epsilon 4$ значимо выше в группе контроля как у мужчин, так и женщин ($p=0.018$, ОШ=0.42, 95%ДИ: 0.22-0.82; $p=0.02$, ОШ=0.35, 95%ДИ: 0.15-0.81).

Частота аллеля С гена *eNOS* была значимо выше в подгруппе мужчин с ИМ ($p=0.024$, ОШ=1.43, 95%ДИ:1.01-2.00), а частота встречаемости аллеля Т достоверно выше у мужчин в контрольной группе ($p=0.024$, ОШ=0.70, 95%ДИ:0.50-0.98). Между подгруппами женщин больных ИМ и в контроле выявлены значимые различия в носительстве генотипов. Генотип *eNOS**786C/T встречался значимо чаще у женщин с ИМ ($p=0.02$, ОШ=1.85, 95%ДИ:1.07-3.20), а генотип *eNOS* *786T/T чаще обнаруживали у женщин контрольной группы ($p=0.021$, ОШ=0.55, 95%ДИ:0.32-0.94). Частота носительства аллеля *eNOS* *786C была выше у женщин с ИМ по сравнению с группой контроля ($p=0.021$, ОШ=1.80, 95%ДИ:1.05-3.09).

Частота аллеля *MTHFR**677C была значимо выше в подгруппе мужчин, больных ИМ ($p=0.025$, ОШ=1.42, 95%ДИ:1.02-1.98), а частота встречаемости аллеля Т достоверно выше у мужчин в контрольной группе ($p=0.025$, ОШ=0.70, 95%ДИ:0.50-0.98). Между подгруппами женщин больных ИМ и в контроле значимых различий в частоте встречаемости, носительстве аллелей и вариантах генотипов полиморфного участка 677C>T гена *MTHFR* значимых различий выявлено не было.

Таблица 9. Распределение аллелей и генотипов полиморфных участков 1420G>A гена PCSK9 (rs562556), 495T>G гена LPL(rs320), эpsilon-полиморфизма гена ApoE, 786T>C гена eNOS (rs2070744) и 677C>T гена MTHFR (rs1801133) у лиц, перенесших ИМ, в сравнении с контрольной группой в зависимости от пола (приведены только аллели и генотипы, частота которых достоверно различалась)

Ген Аллели/ генотипы	мужчины				женщины			
	ИМ N=270 n (%)	Контроль N=106 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)	ИМ N=77 n (%)	Контроль N=62 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
Генотипы, число (%) носителей								
PCSK9 A/G	59 (22)	34 (32)	0.03	0.59 (0.36-0.98)	26 (19)	25 (27)	НЗ	
	ИМ N=270 n (%)	Контроль N=110 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)	ИМ N=135 n (%)	Контроль N=88 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
Аллели, число (%) носителей								
LPL T	239 (88)	105 (95)	0.024	0.37 (0.14-0.97)	125 (93)	84 (95)	НЗ	
Генотипы, число (%) носителей								
LPL G/G	31 (12)	5 (4,5)	0.024	2.75 (1.03-7.70)	10 (7)	6 (7)	НЗ	
	ИМ N=270 n (%)	Контроль N=106 n (%)	<i>p</i> *	ОШ (95% ДИ)	ИМ N=135 n (%)	Контроль N=92 n (%)	<i>p</i> *	ОШ (95% ДИ)
Аллели, число (%) носителей								
ApoE ε4	29 (11)	21 (20)	0.006	0.54 (0.29-0.98)	11 (8)	17 (18)	НЗ	
Генотипы, число (%) носителей								
ApoE ε3/ε4	23 (9)	19 (18)	0.018	0.42 (0.22-0.82)	10 (7)	17 (19)	0.02	0.35 (0.15-0.81)
	ИМ N=270 n (%)	Контроль N=102 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)	ИМ N=135 n (%)	Контроль N=91 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
Аллели, число (%) носителей								
eNOS C	216 (40)	65 (32)	0.024	1.43 (1.01-2.00)	97 (36)	57 (31)	НЗ	
eNOS T	324 (60)	139 (68)	0.024	0.70 (0.50-0.98)	173 (64)	125 (69)	НЗ	
Аллели, число (%) носителей								
eNOS C	171 (63)	54 (53)	НЗ		82 (61)	42 (46)	0.021	1.80 (1.05-3.09)
Генотипы, число (%) носителей								
eNOS C/T	127 (47)	43 (42)	НЗ		66 (49)	31 (34)	0.02	1.85 (1.07-3.20)

<i>eNOS</i> Т/Т	99 (37)	48 (47)	НЗ		53 (39)	49 (54)	0.021	0.55 (0.32- 0.94)
	ИМ N=270 n (%)	Контроль N=107 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)	ИМ N=135 n (%)	Контроль N=91 n (%)	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
Аллели, число (%)								
<i>MTHFR</i> С	380 (70)	134 (63)	0.025	1.42 (1.02- 1.98)	191 (71)	132 (73)	НЗ	
<i>MTHFR</i> Т	160 (30)	80 (37)	0.025	0.70 (0.50- 0.98)	79 (29)	50 (27)	НЗ	

* приведены значения *p* с поправкой Бонферрони (*pcorr*)

Распределение частот аллелей и носительства аллелей и генотипов исследуемых полиморфных участков у больных ИМ и контрольной группы в зависимости от возраста первого ИМ.

Больные с ИМ и индивиды контрольной группы были разделены по возрасту, в котором произошел первый ИМ: старше и моложе 60 лет. Сравнение больных ≤ 60 лет проводили с общей группой контроля (I группа), а для больных >60 лет с индивидами контрольной группы старше 60 лет (II группа). Выявлено, что частота носительства аллеля *eNOS**-786С достоверно выше в I группе сравнения ($p=6.0 \times 10^{-4}$, ОШ 1.94, 95%ДИ: 1.31-2.85), а для больных >60 лет по сравнению с контрольной группой >60 лет достоверных отличий в частоте носительства аллелей и генотипов не выявлено. Таким образом, частота носительства аллеля *eNOS**-786С может выступать маркером предрасположенности к раннему ИМ. Соответственно, наблюдалось значимое различие в частоте встречаемости генотипа *eNOS**-786Т/Т в I группе ($p=6.0 \times 10^{-4}$, ОШ=0.52, 95%ДИ: 0.35-0.76), которая была выше в контрольной группе по сравнению с больными ИМ (таблица 10). При сравнении частот аллелей и генотипов полиморфных участков 1420G>А гена *PCSK9*, 495T>G гена *LPL*, эpsilon-полиморфизма гена *ApoE* и 677C>T гена *MTHFR* у больных ИМ ≤ 60 лет, >60 лет и в группах контроля достоверных различий не было выявлено.

Сравнение показателей липидного спектра крови у больных ИМ - носителей и неносителей генотипов риска по полиморфным участкам генов, относящихся к системе липидного обмена – *PCSK9*, *ApoE* и *LPL*.

Проведен анализ ассоциации генотипов риска, выявленных в нашем исследовании для генов *PCSK9*, *LPL* и *ApoE*, с показателями липидного профиля крови - уровнями общего холестерина и триглицеридов крови (ОХЛ и ТГ) в группе больных с ИМ. Уровень ОХЛ и ТГ достоверно не отличался у больных ИМ - носителей генотипов риска по сравнению с неносителями (таблица 11).

Таблица 11. Уровни общего холестерина и триглицеридов крови у носителей генотипов риска полиморфных участков *PCSK9*, *ApoE* и *LPL* в группе больных ИМ.

Гены	Генотипы	Уровень ОХЛ, ммоль/л	величина ρ *	Уровень ТГ, ммоль/л	величина ρ *
<i>PCSK9</i>	A/A	6.8±1.48	0.13	2.37±2.17	0.39
	A/G+G/G	6.39±1.44		2.59±2.32	
<i>ApoE</i>	$\epsilon 3/\epsilon 3$	6.19±1.45	0.43	2.46±2.32	0.91
	$\epsilon 2/\epsilon 2+\epsilon 2/\epsilon 3+\epsilon 2/\epsilon 4+$ $\epsilon 3/\epsilon 4+\epsilon 4/\epsilon 4$	6.39±1.53		2.33±1.84	
<i>LPL</i>	G/G	6.42±1.58	0.12	2.54±2.33	0.53
	G/T+T/T	6.13±1.45		2.41±2.19	

* величина ρ при сравнении групп согласно непараметрическому тесту Манна-Уитни.

Таблица 10. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного участка $-786T>C$ гена *eNOS* у больных ИМ ≤ 60 лет при сравнении с общей группой контроля, у больных >60 лет и в группе контроля >60 лет

Носительство аллеля или генотипа	Больные с ИМ ≤ 60 лет (238 чел) vs контроля (198 чел)			Больные с ИМ >60 лет (165 чел) vs группа контроля >60 лет (87 чел)			Все больные ИМ (405 чел) vs контроля (198 чел)		
	Частота (ИМ/контроль)	Величина p	ОШ (95% ДИ) для значимых сравнений	Частота (ИМ/контроль)	Величина p	ОШ (95% ДИ) для значимых сравнений	Частота (ИМ/контроль)	Величина p	ОШ (95% ДИ) для значимых сравнений
-786^*C	0.66/0.50	6.0×10^{-4}	1.94(1.31-2.85)	0.56/0.42	НЗ		0.62/0.50	3.4×10^{-3}	1.63(1.16-2.30)
$-786^*T/T$	0.34/0.50	6.0×10^{-4}	0.52 (0.35-0.76)	0.44/0.58	НЗ		0.38/0.50	3.4×10^{-3}	0.61 (0.43-0.86)

Влияние носительства аллелей и генотипов риска генов *PCSK9*, *ApoE*, *LPL*, *eNOS* и *MTHFR* на прогноз по данным долгосрочного наблюдения.

Исследовали ассоциацию носительства генетических вариантов 1420G>A в гене *PCSK9* (rs562556), 1595C>G в гене *LPL* (rs328), rs429358 эпсилон-полиморфизма в гене *ApoE*(rs7412, rs429358), $-786T>C$ в гене *eNOS* (rs2070744) и 677C>T в гене *MTHFR* (rs1801133) с неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями после впервые перенесенного в репрезентивной выборке этнических русских. Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга показал, что равновесие соблюдается для всех исследованных в работе полиморфных участков.

Наблюдение за 133 больными с ИМ продолжалось до 10 лет после наступления ИМ. Первая конечная точка включала в себя сердечно-сосудистую смерть и повторный ИМ (КТ1). Комбинированная конечная точка включала в себя сердечно-сосудистую смерть, повторный ИМ, повторную госпитализацию в связи с НС, незапланированную реваскуляризацию (ЧКВ или АКШ), ишемический инсульт (ИИ) (КТ2).

За время наблюдения 31 (23%) больной скончался от сердечно-сосудистых причин. У 16 больных (12%) за время наблюдения развился нефатальный ИМ. Повторная незапланированная реваскуляризация проводилась у 13 больных (10%). 9 (7%) больных были повторно госпитализированы в связи с развитием нестабильной стенокардии. У 4 (3%) больных развился ИИ. У 60 больных, что составляет 45%, наблюдалось неосложненное течение.

По данным анализа времени до наступления КТ1, частота выживания на момент окончания исследования составила 18% у носителей генотипа *MTHFR**T/T и 72% у носителей аллеля *MTHFR**C (т.е. неносителей T/T).

Кривая выживаемости по Каплан-Мейеру для КТ1 представлена на рис.3. При анализе пропорциональных рисков Кокса показано, что у носителей rs1801133*Т/Т смерть вследствие сердечно-сосудистых причин или повторный ИМ происходят в 2.76 раз чаще, чем у носителей этого генотипа: $p_w = 0.02$; ОР = 2.76 (1.20-6.33).

При включении в число неблагоприятных событий НС, проведения реваскуляризации и ИИ (КТ2) частота выживания составляет на момент окончания исследования 8% и 59% для носителей и носителей генотипа *MTHFR* Т/Т соответственно. При этом ОР снижается до 2.68 ($p_w = 0.003$). Кривая выживаемости по Каплан-Мейеру для КТ 2 показана на рис.4. В таблице 12 представлены значения оценок Каплана-Мейера и ОР Кокса для генетического варианта *MTHFR**677 для КТ1 и КТ2.

Таким образом, носительство генотипа *MTHFR**677Т/Т связано с развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после перенесенного ИМ.

Таблица 12. Ассоциация носительства генотипа Т/Т гена *MTHFR**677С>Т (rs1801133) с неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями у этнических русских (по данным долгосрочных наблюдений до 10 лет(всего 133 человека).

Носительство аллеля/генотипа	Ср. частота выживания (95% ДИ)	Медиана (лет)	P_w	ОР (95% ДИ)
Смерть вследствие сердечно-сосудистых причин или повторный ИМ (КТ1)				
Т/Т	0.18 (0.01 - 0.51)	7	0.02	2.76 (1.20 - 6.33)
С	0.72 (0.62 - 0.79)	-		
Смерть вследствие сердечно-сосудистых причин, повторный ИМ, госпитализация в связи с НС, реваскуляризация или ИИ (КТ2)				
Т/Т	0.08 (0.01 - 0.31)	6	0.003	2.68 (1.39 - 5.18)
С	0.59 (0.49 - 0.67)	9		

Рисунок 3. Влияние носительства генотипа *MTHFR* *677Т/Т на прогноз у больных ИМ. Конечная точка 1 - смерть вследствие сердечно-сосудистых причин или повторный ИМ.

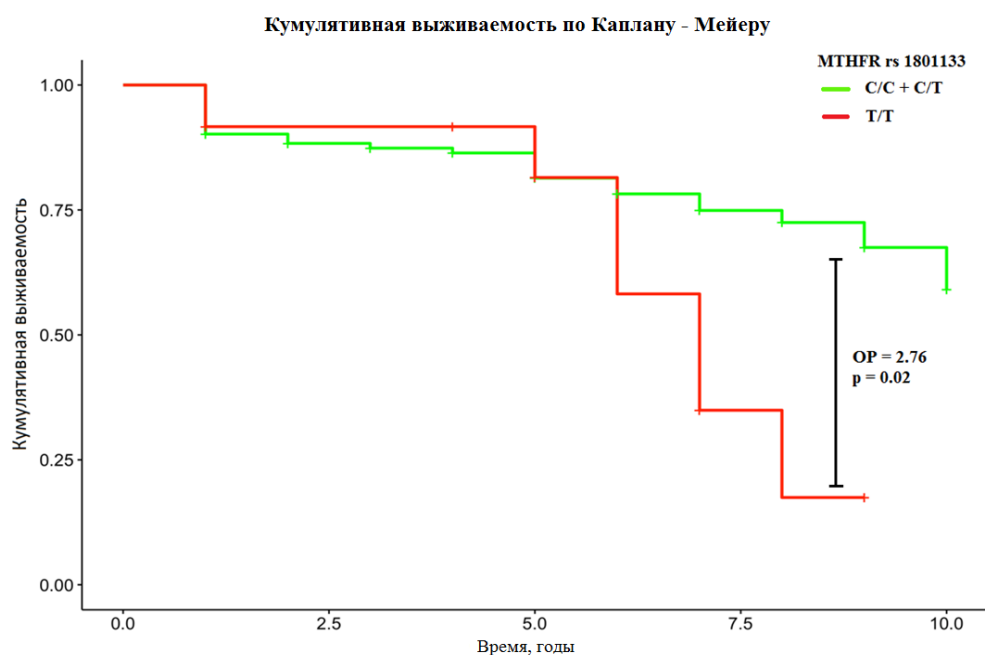
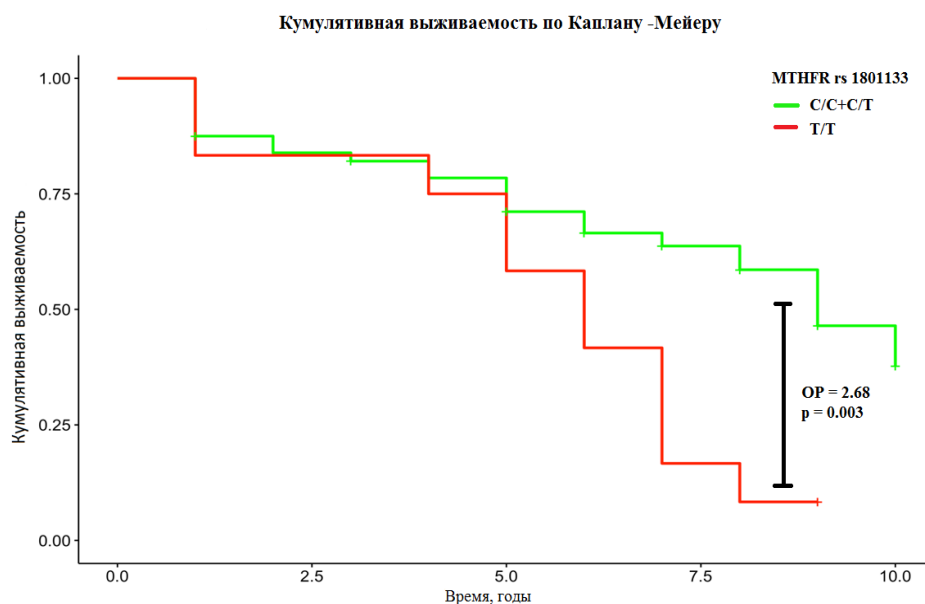


Рисунок 4. Влияние носительства генотипа *MTHFR* *677T/T на прогноз у больных ИМ. Конечная точка 2 - сердечно-сосудистая смерть, повторный ИМ, повторная госпитализация в связи с НС, незапланированная реваскуляризация, ишемический инсульт.



Значимого влияния носительства генотипов *PCSK9* *1420A/A, $\epsilon 3/\epsilon 3$ эпсилон-полиморфизма гена *ApoE*, *LPL* *495G/G и аллеля С полиморфного участка 786T>С гена *eNOS* на развитие неблагоприятных исходов у больных с ИМ выявлено не было ($p > 0.05$).

Экспрессия микроРНК у больных ИМ по сравнению с группой контроля

Сравнение уровней экспрессии микроРНК в плазме больных ИМ и индивидов из контрольной группы проводили с использованием коммерческого набора фирмы Qiagen. Он создан для анализа экспрессии 84 микроРНК, которые по данным литературы дифференциально экспрессируются при воспалительном процессе. Полученные результаты представлены на рис. 5 в форме графика рассеяния для массива данных (так называемый Volcano Plot) при попарных сравнениях. У больных ИМ выявлено 28 различных микроРНК, характеризующихся пониженной экспрессией в сравнении с контрольной группой (левая часть рисунка, зеленые точки) и 23 микроРНК, характеризующихся повышенной экспрессией (правая часть рисунка, красные точки). Однако лишь для двух микроРНК - микроРНК-21-5p и микроРНК-15b-5p - различия в экспрессии в плазме крови больных ИМ и индивидов из контрольной группы достигали уровня статистической значимости ($p=0.03$ и $p=0.01$, соответственно). При этом экспрессия микроРНК-21-5p больных ИМ по сравнению с контрольной группой была понижена в 3.8 раза, а экспрессия микроРНК-15b-5p – повышена в 3.7 раз.

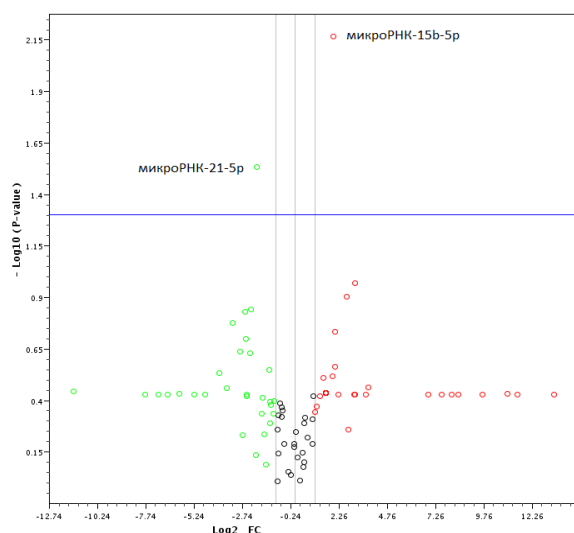


Рисунок 5. Сравнение уровней экспрессии 84 микроРНК у трех больных ИМ при поступлении в стационар (не более 12 часов от начала заболевания) и у трех здоровых контролей. РНК, содержащую фракцию микроРНК, выделяли из плазмы крови с использованием набора miScript miRNA PCR Array MIHS-105Z. По оси абсцисс показана кратность изменения уровня экспрессии микроРНК (каждая точка соответствует отдельной микроРНК) у больных ИМ против контрольной группы (Fold Change, FC) в логарифмической шкале (\log_2FC). По оси ординат дано значение величины p (данные представлены как отрицательный десятичный логарифм от значения p). МикроРНК с повышенной экспрессией в первой из сравниваемых групп ($\log_2FC > 1$) обозначены красными точками, с пониженной ($\log_2FC < -1$) – зелеными точками. МикроРНК, не удовлетворяющие этим критериям, обозначены черными точками.

Заключение

Проведенный анализ ассоциации полиморфных участков пяти генов-кандидатов (*PCSK9*, *LPL*, *ApoE*, *MTHFR* и *eNOS*) показал их значимую ассоциацию у индивидов русской этнической принадлежности с ИМ по отдельности или в составе сочетаний. Показана также значимость полиморфизма гена *MTHFR* для долгосрочного прогноза постинфарктных неблагоприятных сердечнососудистых событий. Эти данные могут быть в дальнейшем использованы для создания панелей генетических прогностических маркеров.

При стратификации сравниваемых групп больных ИМ на подгруппы в зависимости от пола, возраста перенесенного ИМ и варианта ИМ (с подъемом или без подъема ST) наблюдаются специфические для подгрупп ассоциации ОНП с ИМ. Это означает, что противоречивость результатов разных исследований, направленных на выявление генетических маркеров ИМ, может объясняться не только этническими различиями и разными размерами выборок, но и разным возрастным и половым составом сравниваемых групп, а также включением разных вариантов ИМ. Необходимы более масштабные исследования на однородных выборках, чтобы окончательно установить роль отдельных ОНП в развитии ИМ.

В нашей работе впервые в России показана дифференциальная экспрессия микроРНК-21-5p и микроРНК-15b-5p в плазме крови больных ИМ. Эти микроРНК представляют собой потенциальные маркеры ИМ. Однако, полученные данные требуют валидации на больших группах больных ИМ и контролей.

Выводы:

1. Носительство каждого из генотипов *PCSK9* *1420A/A, *LPL**495G/G, *ApoE**ε3/ε3 и аллеля *eNOS**786C увеличивает риск развития ИМ у этнических русских ($p < 0.05$, ОШ в диапазоне от 1.45 до 1.96).

2. Композитная модель индивидуального генетического риска, полученная с помощью метода логистической регрессии и включающая ассоциированные с ИМ варианты генов *PCSK9*, *ApoE*, *LPL* и *eNOS*, обладает большей предсказательной эффективностью, чем компоненты этой модели поодиночке (AUC=0.604, 95% ДИ: 0.55–0.65).

3. При проведении мультилокусного анализа выявлено, что носительство аллеля *MTHFR**677C в составе сочетания с аллелем *eNOS**786C ассоциировано с риском ИМ ($p = 0.0006$; ОШ = 1.80).

4. Носительство генотипа *eNOS**786C/T ассоциировано с ИМ только у женщин, а носительство аллеля *MTHFR**677C только у мужчин.

5. Позитивная ассоциация с носительством аллеля *eNOS**786C выявлена только для больных, перенесших ИМ в возрасте моложе или равном 60 лет.

6. Генотип *LPL**495G/G ассоциирован с ИМ без подъема ST, а генотип *ApoE** ε3/ε3 – с ИМ с подъемом ST.

7. По данным долгосрочного наблюдения носительство генотипа *MTHFR**677T/T связано с развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после перенесенного ИМ.

8. При сравнении уровней экспрессии 84 микроРНК, потенциально вовлеченных в воспаление, в плазме больных ИМ и индивидов контрольной группы наблюдали понижение экспрессии микроРНК-21-5p в 3.8 раза и повышение экспрессии микроРНК-15b-5p в 3.7 раза ($p=0.03$ и $p=0.01$, соответственно).

Практические рекомендации

С целью стратификации риска развития ИМ наряду с принятыми клиническими, лабораторными, инструментальными показателями может быть использовано геномное типирование полиморфных участков 1420G>A гена *PCSK9*, 495T>G гена *LPL*, эпсилон-полиморфизма гена *ApoE* и 786T>C гена *eNOS*. Генотипы *PCSK9* *1420A/A (ОШ=1.45), *LPL**495G/G (ОШ=1.96), ε3/ε3 эпсилон-полиморфизма гена *ApoE* (ОШ=1.52) и аллель *eNOS**786C (ОШ=1.63) ассоциированы с повышенным риском развития ИМ.

У больных, перенесших ИМ, с целью стратификации риска последующих неблагоприятных сердечно-сосудистых событий рекомендовано геномное типирование полиморфного участка 677C>T гена *MTHFR*. У носителей генотипа *MTHFR**677T/T риск развития сердечно-сосудистых событий выше, чем у неносителей этого генотипа (ОР = 2.68).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Rosa M. Barsova, Dmitrijs Lvovs, Boris V. Titov, Natalia A. Matveeva, Roman M. Shakhnovich, Tatiana S. Sukhinina, **Nino G. Kukava**, Mikhail Ya. Ruda, Irina M. Karamova, Timur R. Nasibullin, Olga E. Mustafina, German J. Osmak, Ekaterina Yu. Tsareva, Olga G. Kulakova, Alexander V. Favorov, Olga O. Favorova. Variants of the Coagulation and Inflammation Genes Are Replicably Associated with Myocardial Infarction and Epistatically Interact in Russians. PLoS One December 10, 2015.
2. Осьмак Г.Ж., Матвеева Н.А., Титов Б.В., Насибуллин Т.Р., Мустафина О.Е., Шахнович Р.М., **Кукава Н.Г.**, Руда М.Я., Фаворова О.О. Совместное влияние генетических факторов, возраста и курения на риск развития инфаркта миокарда. Кардиология 2016, №12.
3. Matveeva N.A., Titov B.V., Lvovs D., Osmak G.J., Shakhnovich R.M., **Kukava N.G.**, Nasibullin T.R., Mustafina O.E., Favorov A.V., Ruda M.Ya, Favorova O.O. New genetic biomarkers of myocardial infarction in russians. New Horizons in Translational Medicine 03.2016 Abstract and poster presentation dx.doi.org/10.1016/j.nhtm.2016.09.001
4. Boris V. Titov, German J. Osmak, Natalia A. Matveeva, **Nino G. Kukava**, Roman M. Shakhnovich, Alexander V. Favorov, Mikhail Ya. Ruda, Olga O. Favorova. Genetic risk factors for MI more clearly manifest for early age of first onset. Molecular Biology Reports (2017) 44:315–321 doi: 10.1007/s11033-017-4112-5.
5. **Н.Г. Кукава**, Б.В. Титов, Г.Ж. Осьмак, Н.А. Матвеева, О.Г. Кулакова, А.В. Фаворов, Р.М. Шахнович, М.Я.Руда, О.О.Фаворова. Мультилокусный анализ генетической предрасположенности к инфаркту миокарда у русских: репликационное исследование. ACTA NATURAE (2017) Том 9 № 4