

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.15372/ATER20190402

АССОЦИАЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ rs61999948, rs7172856
С ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТЬЮА.А. Иванова¹, В.Н. Максимов¹, С.К. Малютина¹, В.П. Новоселов², И.А. Родина²,
О.В. Хамович², М.И. Воевода¹¹НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФГБУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1²ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы»
630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 134

Целью исследования является верификация ассоциации с внезапной сердечной смертью (ВСС) однонуклеотидных полиморфизмов rs7172856 и rs61999948, выявленных в качестве возможных новых молекулярно-генетических маркеров ВСС по результатам полногеномного аллелотипирования с использованием пулированной ДНК. **Материал и методы.** Дизайн исследования – «случай – контроль». Группа ВСС сформирована с использованием критериев ВСС Европейского общества кардиологов из банка ДНК внезапно умерших жителей Октябрьского района г. Новосибирска ($n = 437$, средний возраст $53,1 \pm 9,0$ года, доля мужчин $73,5\%$, женщин – $26,5\%$). Контрольная группа ($n = 405$, средний возраст $53,2 \pm 9,2$ года, мужчины – $70,0\%$, женщины – $30,0\%$) подобрана по полу и возрасту к группе ВСС из банка ДНК участников проектов MONICA и HAPIEE. ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда в группе ВСС и венозной крови в контрольной группе. Генотипирование выполнено методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. **Результаты.** Не обнаружено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей rs7172856 между группами ВСС и контроля ($p > 0,05$), в том числе при разделении групп по полу и возрасту. Доля носителей генотипа ТТ rs61999948 мужского пола в группе ВСС ($6,3\%$) статистически значимо меньше, чем в группе контроля ($12,6\%$) (отношение шансов (ОШ) = $0,47$, 95% -й доверительный интервал (95% ДИ) $0,26-0,85$, $p = 0,011$). Полученная значимость сохраняется в группе лиц младше 50 лет ($p = 0,007$) и в группе мужчин младше 50 лет ($p = 0,002$). Для лиц младше 50 лет доля носителей генотипа СС rs61999948 статистически значимо больше в группе ВСС ($59,0\%$), чем в контрольной группе ($42,5\%$) (ОШ = $1,94$, 95% ДИ $1,21-3,12$, $p = 0,006$). Выявленная ассоциация генотипа СС с ВСС сохраняется и в группе мужчин младше 50 лет ($p = 0,001$). **Заключение.** По результатам проведенного исследования не подтверждена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs7172856 с ВСС. Для мужчин младше 50 лет генотип ТТ одно-

Иванова Анастасия Андреевна – канд. мед. наук, с.н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Малютина Софья Константиновна – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Новоселов Владимир Павлович – д-р мед. наук, проф., начальник, e-mail: nokbsme@nso.ru

Родина Ирина Александровна – канд. мед. наук, врач-судебно-медицинский эксперт, e-mail: ziza76@bk.ru

Хамович Олеся Викторовна – канд. мед. наук, врач-судебно-медицинский эксперт, e-mail: hamovicholesya@mail.ru

Воевода Михаил Иванович – д-р мед. наук, проф., академик РАН, г.н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: mvovoda@yandex.ru

нуклеотидного полиморфизма rs61999948 ассоциирован с протективным эффектом в отношении ВСС, генотип CC rs61999948 – с повышенным риском ВСС.

Ключевые слова: внезапная сердечная смерть, однонуклеотидный полиморфизм, rs7172856, rs61999948, полногеномное аллелотипирование.

Внезапная сердечная смерть (ВСС) продолжает оставаться одной из важнейших нерешенных кардиологических проблем во всем мире. Россия занимает одну из лидирующих позиций по смертности населения от сердечно-сосудистой патологии. Считается, что причиной гибели половины умерших из-за сердечно-сосудистых заболеваний является прогрессирование хронической сердечной недостаточности, а второй половины – ВСС [1]. Большая часть умерших ВСС – лица молодого и среднего возраста. В ряде случаев ВСС наступает у людей без выявленной ранее кардиальной патологии, тогда как существующие рекомендации по профилактике внезапного летального исхода ориентированы исключительно на лиц с диагностированной ранее кардиальной патологией [1, 2]. Выживаемость после эпизода внезапной остановки сердца остается низкой. По данным исследований в Австралии и Новой Зеландии, выживаемость непосредственно после эпизода ВСС составляет 21–36 % при условии своевременно начатой реанимации, 9–17 % – по истечении 30 дней с момента эпизода внезапной остановки сердца [3]. Причиной ВСС может служить как приобретенное, так и наследственное заболевание сердца. Для уменьшения количества эпизодов ВСС стратификация риска и профилактические мероприятия являются ключевыми [4]. В мире активно изучается вклад в развитие ВСС различных генетических факторов с целью модернизации существующих методов профилактики наступления летального исхода и диагностики причины его развития.

Целью данного исследования является проверка ассоциации с ВСС однонуклеотидных полиморфизмов rs7172856 и rs61999948 из списка возможных новых молекулярно-генетических маркеров ВСС, полученного по результатам полногеномного анализа пулированных выборок ДНК когорт человека. Полногеномное аллелотипирование проведено с использованием пулированной ДНК по схеме «случай – контроль» на платформе Illumina Omni1S, имеющей 1,2 млн маркеров на планшете [2].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования – «случай-контроль». Группа ВСС ($n = 437$, средний возраст $53,1 \pm 9,0$ года, доля мужчин $73,5$ %, женщин –

$26,5$ %) сформирована из архивного анонимного банка ДНК (1999–2014 гг.) внезапно умерших жителей Октябрьского района г. Новосибирска с использованием критериев ВСС Европейского общества кардиологов [3]. Основные патолого-анатомические диагнозы лиц, включенных в группу ВСС, – острая коронарная недостаточность и острая недостаточность кровообращения. Из группы исключены лица с патолого-анатомическими диагнозами «инфаркт миокарда», «дилатационная/гипертрофическая кардиомиопатия», а также находившиеся в состоянии алкогольного/наркотического опьянения. Контрольная группа ($n = 405$, средний возраст $53,2 \pm 9,2$ года, мужчины – $70,0$ %, женщины – $30,0$ %) подобрана по полу и возрасту к группе ВСС из банков ДНК живых на момент проведения исследований жителей того же района города, участников международных исследований MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular disease) и HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe). ДНК, хранящаяся в банках, выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда в банке ДНК лиц, умерших внезапной смертью, и из венозной крови в банке ДНК участников проектов MONICA и HAPIEE.

Генотипирование групп по однонуклеотидным полиморфизмам rs7172856, rs61999948 выполнено методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов по авторским протоколам в полиакриламидном геле.

Для генотипирования по rs7172856 использовали праймеры: 5'-AAGAGGTGGGCTGTGATGG-3' (F) и 5'-GACTCATTTGGAGACAGGGC-3' (R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: Трис-НСl (рН 9,0) 75 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 мМ, Tween-20 0,01 %, 3,0 мМ MgCl_2 , по 0,8 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск). Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 33 цикла, включающих денатурацию 95 °С 30 с, отжиг праймеров 62 °С 30 с и элонгацию 72 °С 30 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы HaeIII («СибЭнзим», Новосибирск). Размер продукта амплификации 116 п.н. После проведения ре-

стрикции при генотипе АА детектировался продукт 116 п.н., при генотипе GG – продукты 98 и 18 п.н., при гетерозиготном генотипе GA – все перечисленные продукты (116, 98 и 18 п.н.).

Для генотипирования по rs61999948 использовали праймеры: 5'-AGTTTTTTGTTTAATGGGAGGC-3' (F) и 5'-GGGGGTA AAAATCACAAAC-TTT-3' (R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: Трис-НСl (рН 9,0) 75 мМ, (NH₄)₂SO₄ 20 мМ, Tween-20 0,01 %, 2,5 мМ MgCl₂, по 0,8 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск). Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 35 циклов, включающих денатурацию 95 °С 30 с, отжиг праймеров 54 °С 30 с и элонгацию 72 °С 30 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы HaeIII («СибЭнзим», Новосибирск). Размер продукта амплификации 202 п.н. После проведения рестрикции при генотипе ТТ детектировался продукт 202 п.н., при СС генотипе – продукты 181 и 21 п.н., при гетерозиготном генотипе СТ – все перечисленные продукты (202, 181 и 21 п.н.).

В ходе статистической обработки результатов генотипирования с использованием критерия χ^2 оценено соответствие частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга в контрольной группе. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей выполнено с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 . В случае четырехпольных таблиц применен точный двусторонний критерий Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. Относительный риск ВСС по конкретному аллелю или генотипу вычислен как отношение шансов (ОШ) с использованием точного двустороннего критерия Фишера и критерия χ^2 . В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

В контрольной группе на предмет ассоциации с выбранными однонуклеотидными полиморфиз-

мами рассмотрены антропометрические, биохимические параметры, а в группе ВСС – данные морфологического исследования. Нормальность распределения параметров исследована с использованием теста Колмогорова–Смирнова. При нормальном распределении дальнейшие расчеты проведены с использованием дисперсионного анализа (ANOVA), в остальных случаях – с помощью теста Крускала–Уоллиса. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ терапии и профилактической медицины.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наблюдаемые частоты генотипов однонуклеотидных полиморфизмов rs7172856 и rs61999948 в контрольной группе соответствуют ожидаемым согласно равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 1,4$ и $2,9$ соответственно). Статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей rs7172856 между группой ВСС и контрольной группой не обнаружено ($p > 0,05$) (табл. 1), в том числе при разделении групп по полу и возрасту.

Доля носителей генотипа ТТ однонуклеотидного полиморфизма rs61999948 мужского пола в группе ВСС (6,3 %) статистически значимо меньше, чем в группе контроля (12,6 %) (ОШ = 0,47, 95%-й доверительный интервал (95 % ДИ) 0,26–0,85, $p = 0,011$) (табл. 2). Полученная значимость сохраняется в группе лиц младше 50 лет ($p = 0,007$), в группе мужчин младше 50 лет ($p = 0,002$). Для лиц младше 50 лет доля носителей генотипа СС rs61999948 статистически значимо больше в группе ВСС (59,0 %), чем в контрольной (42,5 %) (ОШ = 1,94, 95 % ДИ 1,21–3,12, $p = 0,006$) (табл. 3). Выявленная ассоциация генотипа СС с ВСС сохраняется и в группе мужчин младше 50 лет ($p = 0,001$).

Таблица 1

Частоты генотипов и аллелей однонуклеотидных полиморфизмов rs7172856 и rs61999948 в группе ВСС и в контрольной группе

Однонуклеотидный полиморфизм	Генотип/ аллель	Группа ВСС		Контрольная группа		p
		n	%	n	%	
rs7172856	AA	0	0	0	0	0,655
	GA	44	10,1	45	11,1	
	GG	393	89,9	360	88,9	
rs61999948	ТТ	35	8,8	52	12,5	0,182
	СТ	157	39,3	165	39,7	
	СС	208	52,0	199	47,8	

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей однонуклеотидного полиморфизма rs61999948 в группе мужчин

Генотип/аллель	Группа ВСС		Контрольная группа		p
	n	%	n	%	
ТТ	17	6,3	38	12,6	0,011
СТ	106	39,3	121	40,2	0,864
СС	147	54,4	142	47,2	0,094

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей однонуклеотидного полиморфизма rs61999948 в группе лиц младше 50 лет

Генотип/аллель	Группа ВСС		Контрольная группа		p
	n	%	n	%	
ТТ	10	7,2	26	18,4	0,007
СТ	47	33,8	55	39,0	0,387
СС	82	59,0	60	42,6	0,006

В группе ВСС выявлена статистически значимая ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs61999948 с атеросклерозом по данным судебно-медицинского исследования: у лиц без признаков атеросклеротического поражения коронарных сосудов и аорты доля носителей генотипа ТТ (13,5 %) значимо больше, чем у людей с их наличием (5,7 %) (ОШ = 2,57, 95 % ДИ 1,25–5,27, $p = 0,011$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Однонуклеотидные полиморфизмы rs7172856 и rs61999948, локализованные на 15-й хромосоме, исследованы как возможные новые молекулярно-генетические маркеры ВСС по результатам проведенного полногеномного аллелотипирования на пулированной ДНК. По данным литературы ранее полиморфизмы rs7172856 и rs61999948 не были включены в какие-либо исследования.

Полиморфизм rs7172856 (g.101254948G > A) принадлежит к не кодирующему РНК локусу LOC107984727. Частота редкого аллеля А полиморфизма для европейской популяции составляет около 0,06 [7]. По результатам верифицирующего исследования нами не подтверждена ассоциация полиморфизма rs7172856 с ВСС.

Однонуклеотидный полиморфизм rs61999948 (g.24115197C > T) относится к межгенному пространству 15-й хромосомы. Частота редкого аллеля Т для европейской популяции составляет около 0,25 [8]. По результатам верифицирующего исследования подтверждена ассоциация полиморфизма rs61999948 с ВСС: генотип ТТ полиморфизма является протективным в отно-

шении ВСС в группе мужчин, в группе лиц младше 50 лет, в группе мужчин младше 50 лет; генотип СС полиморфизма ассоциирован с повышенным риском ВСС в группе людей младше 50 лет, в группе мужчин младше 50 лет. В группе ВСС найдена ассоциация генотипа ТТ полиморфизма rs61999948 с атеросклерозом: для носителей генотипа ТТ риск развития атеросклероза значимо ниже по сравнению с носителями двух других генотипов. Известно, что во взрослой популяции лидирующей причиной развития ВСС является ишемическая болезнь сердца. В патогенезе ишемической болезни сердца играют роль многие факторы, в том числе и нарушения липидного обмена. Нарушение липидного гомеостаза с формированием гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии ведет к развитию атеросклероза, являющегося субстратом ишемической болезни сердца и ВСС [9]. Таким образом, вероятно, механизм реализации вклада генотипа ТТ в феномен ВСС связан с защитной ролью в отношении развития атеросклероза, но данная гипотеза требует дальнейших исследований и подтверждения.

Так как ранее однонуклеотидные полиморфизмы rs7172856 и rs61999948 не были включены в какие-либо исследовательские проекты, сопоставить полученные данные с результатами других исследований не представляется возможным. В связи с небольшой численностью групп, являвшихся объектом настоящей работы, необходимо продолжить изучение найденного молекулярно-генетического маркера ВСС в более крупных проектах с включением в исследование подгрупп разного этнического, полового и возрастного состава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного верифицирующего исследования не подтверждена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs7172856 с ВСС. Для мужчин младше 50 лет генотип ТТ однонуклеотидного полиморфизма rs61999948 ассоциирован с протективным эффектом в отношении ВСС, генотип СС rs61999948 ассоциирован с повышенным риском ВСС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность академику РАН Юрию Петровичу Никитину за предоставленную возможность сформировать контрольную группу на материале когорт НАPIEE и MONICA.

Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шляхто Е.В., Арутюнов Г.П., Беленков Ю.Н. Национальные рекомендации по определению риска и профилактике внезапной сердечной смерти // Арх. внутр. медицины. 2013. Т. 4, № 12. С. 5–15.
2. Lucena J.S. Sudden cardiac death // Forensic Sci. Res. 2019. Vol. 4, N 3. P. 199–201. doi: 10.1080/20961790.2019.1622062
3. Wong C.X., Brown A., Lau D.H. et al. Epidemiology of sudden cardiac death: Global and regional perspectives // Heart Lung Circ. 2019. Vol. 28, N 1. P. 6–14. doi: 10.1016/j.hlc.2018.08.026
4. Isbister J., Semsarian C. Sudden cardiac death: an update // Intern. Med. J. 2019. Vol. 49, N 7. P. 826–833. doi: 10.1111/imj.14359
5. Бабенко В.Н., Максимов В.Н., Кулакова Е.В., Сафронова Н.С., Воевода М.И., Рогов Е.И. Полногеномный анализ пулированных выборок ДНК когорт человека // Вавил. журн. генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 4-2. С. 847–855.
6. Priori S.G., Aliot E., Blumstrom-Lundqvist C. et al. The task force for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death of the European Society of Cardiology (ESC) // G. Ital. Cardiol. 2016. Vol. 17, N 2. P. 108–170.
7. rs7172856. dbSNP. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7172856> (21 September 2019)
8. rs61999948. dbSNP. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs61999948> (21 September 2019)
9. Максимов В.Н., Иванова А.А., Орлов П.С., Шахтштейн Е.В., Иванощук Д.Е., Савченко С.В., Воевода М.И. Исследование ассоциации полиморфизмов генов липидного обмена АРОЕ, НЛ, SREBP2, USF1 с внезапной сердечной смертью в русской популяции // Атеросклероз. 2014. Т. 10, №1. С. 16–21

ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS RS61999948, RS7172856 WITH SUDDEN CARDIAC DEATH

A.A. Ivanova¹, V.N. Maksimov¹, S.K. Malyutina¹, V.P. Novoselov², I.A. Rodina², O.V. Hamovich², M.I. Voevoda¹

¹Research Institute of Internal and Preventive Medicine –
Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

²Novosibirsk Regional Clinical Bureau of Forensic Medicine
630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 134

The aim of the research is to verify the association with sudden cardiac death (SCD) of single nucleotide polymorphisms rs7172856 and rs61999948, identified as new molecular genetic markers of SCD in the own genome-wide pooled allelotyping. **Material and methods.** Case-control study. The SCD group is formed using the criteria of the European Society of Cardiology from the DNA bank of suddenly deceased residents of the Oktyabrsky district of Novosibirsk ($n = 437$, average age – 53.1 ± 9.0 years, men – 73.5 %, women – 26.5 %) The control group ($n = 405$, average age 53.2 ± 9.2 years, men - 70.0 %, women - 30.0 %) is formed from the DNA bank of participants of MONICA and HAPIEE projects. DNA was isolated by phenol-chloroform extraction from myocardial tissue in the SCD group and venous blood in the control group. Genotyping was performed by the PCR-RFLP method. **Results.** No statistical significance was found in allele and genotype frequencies of rs7172856 between groups, even in separating in sex and age ($p > 0.05$). The proportion of male carriers of the TT genotype rs61999948 in the SCD group (6.3 %) is statistically significantly less than the proportion of male carriers of the TT genotype rs61999948 in the control group (12.6 %)

(OR = 0.47, 95 % CI 0.26-0.85, $p = 0.011$). The identified significance is reserved in the group under 50 years old ($p = 0.007$) and in the group of men under 50 years old ($p = 0.002$). The proportion of carriers of the CC genotype rs61999948 is statistically significantly higher in the SCD group (59.0 %) compared with the control group (42.5 %) (OR = 1.94, 95 % CI 1.21–3.12, $p = 0.006$) for people under 50 years old. The identified association of the CC genotype with the SCD is reserved in the group of men under 50 years old ($p = 0.001$). Conclusions. Single nucleotide polymorphism rs7172856 is not associated with SCD. The TT genotype of the single nucleotide polymorphism rs61999948 is associated with a protective effect against SCD and the CC genotype of rs61999948 is associated with an increased risk of SCD for men under 50 years old.

Keywords: sudden cardiac death, single nucleotide polymorphism, rs7172856, rs61999948, genome-wide allelotyping.

Статья поступила 2 октября 2019 г.

Принята к печати 3 декабря 2019 г.