

# Связь генного полиморфизма с традиционными факторами риска и сердечно-сосудистыми осложнениями

**Natalia Caproș,\* Nicolae Barbacar, Valeriu Istrati, Victor Popescu, Cristina Butovscaia**

## Авторы:

**Natalia Caproș**, доктор медицины, доцент, д.м.н., Государственный университет медицины и фармации им. Николае Тестемицану, Кишинев, Молдова

**Nicolae Barbacar**, профессор Университета, генетик, д.м.н., Государственный университет медицины и фармации им. Николае Тестемицану, Кишинев, Молдова

**Valeriu Istrati**, профессор Университета, доктор медицины, д.м.н., Государственный университет медицины и фармации им. Николае Тестемицану, Кишинев, Молдова

**Victor Popescu**, главный исследователь; д.м.н., Государственный университет медицины и фармации им. Николае Тестемицану, Кишинев, Молдова

**Cristina Butovscaia**, исследователь, Государственный университет медицины и фармации им. Николае Тестемицану, Кишинев, Молдова

## Резюме

Целью исследования было определение связи полиморфизма генов с традиционными факторами риска и сердечно-сосудистыми осложнениями. Исследование методом случай-контроль проводилось в период 2007–2011 гг.; в нем участвовали 405 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и эпизодами острой ишемии миокарда, поступившими в Муниципальную клинику «Sfânta Treime», г. Кишинева. С помощью полимеразной цепной реакции и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов определялись инсерционно-делеционный генотип ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), полиморфизм A1166C гена рецептора к ангиотензину-II 1-го типа (AT<sub>1</sub>), Asp298Glu (A/G) генотипы eNOS и P1A1/2 (A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>), генотипы полиморфизмов рецепторов GP1Ib/IIIa. Авторы установили, что носительство D/D генотипа и D-аллеля в гене АПФ имеет положительную корреляцию с полиморфизмом высокого риска C/C гена AT<sub>1</sub> и ассоциировано с артериальной гипертензией (АГ) и сердечно-сосудистой смертностью. A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>-генотип гена GP 1Ib/IIIa-рецепторов был ассоциирован с предрасположенностью к ИБС, высокой частотой инфаркта миокарда и дислипидемией, особенно у курильщиков. Доказано, что влияние маркеров полиморфизма eNOS на течение ИБС зависит от наличия АГ.

## Ключевые слова:

генный полиморфизм, Традиционные факторы риска, сердечно-сосудистые осложнения.

## Gene polymorphisms association with conventional risk factors and cardiovascular complications

Caproș N., Barbacar N., Istrati V., Popescu V., Butovscaia C.

### Authors:

**Natalia Caproș**, MD, PhD, Associate Professor, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Moldova

**Nicolae Barbacar**, PhD, University Professor, Geneticist, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Moldova

**Valeriu Istrati**, MD, PhD, University Professor, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Moldova

**Victor Popescu**, PhD, Senior Researcher, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Moldova

**Cristina Butovscaia**, Researcher, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Moldova

### Summary

*The aim of this study was to evaluate the gene polymorphisms association with conventional risk factors and cardiovascular complications. The case control study was conducted in 2007-2011 and included 405 patients with coronary artery disease (CAD) and acute ischemic episodes admitted to the Municipal Clinical Hospital "Sfânta Treime", Chisinau. Insertion/deletion (I/D) genotypes of angiotensin-converting enzyme (ACE) and A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor gene, Asp298Glu (A/G) genotypes of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and PLA1/2 (A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>) genotypes of A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> genotype of glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor gene (GPIIb/IIIa) receptor polymorphisms were identified by amplified polymerase chain reaction and restricted fragment length polymorphism. The authors concluded that the carrier of D/D genotype and D allele in ACE gene, being positively correlated with the risk C/C polymorphic variant of angiotensin II type 1 receptor gene, was associated with hypertension and cardiovascular death. A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> genotype of GP IIb/IIIa receptor gene was associated with susceptibility to CAD and high frequency of myocardial infarction and dyslipidemia, particularly in smokers. The impact of eNOS polymorphic markers for CAD proved to be hypertension-mediated.*

### Keywords

*Gene polymorphisms, conventional risk factors, cardiovascular complications*

### Введение

Определение генетических факторов, способствующих развитию ишемической болезни сердца (ИБС) или предрасположенности к ней, остается темой многих научных публикаций. Эти факторы были исследованы в европейской популяции раздельно или в связи друг с другом, однако сложность генетических аспектов этого заболевания оказалась непредвиденной, что потребовало разработки новых подходов к проблеме [1, 2].

Генетические исследования наследственной предрасположенности к ИБС указывают на наличие ряда возможных генов, играющих различные роли в биологических функциях сосудов и, вероятно, вовлеченных в патогенез заболевания. Среди них наиболее важными являются гены, регулирующие работу ренин-ангиотензиновой системы (РАС), а также функции эндотелия и гомеостаз: гены ангиотензин-превращающего фермента

(АПФ) и рецептора к ангиотензину II 1 типа (AGT<sub>1</sub>R), Asp298Glu (A/G), ген эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и ген полиморфизмов рецепторов GPIIb/IIIa тромбоцитов (PLA1/2). Полиморфизмы генов этих систем активно изучаются в аспекте ИБС, однако полученные результаты таких исследований противоречивы [2–6]. С целью объяснения этих результатов исследовали связь полиморфизмов генов с традиционными ФР и сердечно-сосудистыми осложнениями (ССО).

Цель исследования — оценить связь полиморфизмов генов с традиционными ФР и ССО у пациентов с ИБС.

### Материал и методы

Исследование методом случай-контроль проводилось в период 2007–2011 гг.; в нем участвовали 405 пациентов (основная группа — ОГ) с эпизодами острой ишемии миокарда, поступив-

ших в Муниципальную клинику «Sfânta Treime», г. Кишинева. Контрольная группа (ГК) включала в себя 290 пациентов без ИБС. При отборе использовали информацию о возрасте, поле, месте жительства и профессиональной деятельности. Распределение по полу в ОГ было равномерным, соотношение мужчин и женщин составило 2:1, т.е. мужчин было в 2 раза больше ( $p < 0,001$ ). Средний возраст —  $57,93 \pm 0,34$  лет с небольшим различием с ГК ( $p > 0,05$ ).

Исследование было двуцентровым, проводилось методом случай-контроль; оно было одобрено Национальным Этическим Комитетом по Клиническим Исследованиям и Разработке Лекарств Министерства здравоохранения Республики Молдова (№ 331, 03.06.2010). Все пациенты — коренные граждане и резиденты республики Молдова, были сопоставимы по социально-экономическому статусу и этнической принадлежности.

Пациентов включали в исследование в порядке их поступления в стационар, после стабилизации клинического состояния, уровня ферментов и подписания информированного согласия. Такой набор пациентов обеспечил случайный состав групп.

Критериями включения являлись: клинически установленный диагноз Q-образующего и Q-необразующего инфаркта миокарда (Q-ИМ, неQ-ИМ), нестабильная стенокардия (НС) и стенокардия напряжения в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов (ЕОК) [7].

Критерии исключения: гиперхолестеринемия (ГХС) — общий холестерин (ОХС)  $\geq 8$  ммоль/л, и вторичная гипертриглицеридемия (ГТГ), имплантация электрокардиостимулятора при доказанном предвозбуждении желудочков, блокадах атриовентрикулярного проведения (синоатриальная или атриовентрикулярная блокада 2–3 степени), острые заболевания печени, желудочно-кишечного тракта, тяжелые заболевания почек и сопутствующая патология, способствующая снижению ожидаемой продолжительности жизни (ОПЖ).

Использовались стандартные опросники для сбора информации о перенесенных и текущих заболеваниях, результатах обследований, персональных демографических данных, ФР сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), семейном анамнезе ИБС, гемодинамических данных; также использовалась липидограмма, показатели гликемии, сердечных ферментов, результаты инструментальных обследований — ЭКГ и эхокардиография (ЭхоКГ).

Полиморфизмы генов PАС, включая I/D гена АПФ, A1166C-генотип (вариант с цитозином или

аденином, A/C) гена AGT<sub>1</sub>R, Asp298Glu (A/G) ген eNOS и P1A1/2 (A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>) генотипы GPIIb/IIIa рецепторов, изучались в Институте генетики и физиологии растений Академии наук Молдовы с применением методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [4, 5].

Статистическая обработка результатов была выполнена с использованием компьютера при помощи анализа сравнения переменных, а также ассоциативного и описательного анализов. Взаимосвязь между исследуемыми параметрами определяли методом простой линейной регрессии, и количественно выражалась при помощи коэффициента корреляции «г». Для оценки частоты распространения генов применяли популяционный генетический анализ молекулярной эволюционной генетики Nei Masatoshi для диплоидного набора данных в Центре генетики Лангона при Нью-Йоркском университете. Частота распространения исследуемых локусов генов высчитывалась по закону Харди-Вейнберга.

## Результаты

Стратификация пациентов из ОГ по I/D полиморфизму АПФ выявила преобладание гомозиготных индивидов с генотипом риска D/D по сравнению с ГК — 19,4% и 11,03%, соответственно ( $\chi^2 = 8,77$ ,  $p < 0,05$ ), в то время как генотип I/I был больше представлен в ГК — 33,11% по сравнению с 19,64% ( $\chi^2 = 13,31$ ,  $p < 0,01$ ). По количеству гетерозиготных индивидов (I/D) значимых различий между группами не получено — 60,72% и 55,86%, соответственно ( $p > 0,05$ ). Генотипирование I/D полиморфизма АПФ и оценка частоты аллелей выявили значимое различие по частоте аллеля высокого риска D у пациентов ОГ в сравнении с ГК — 78,65% в сравнении с 61,24% (OR = 1,29,  $\chi^2 = 8,77$ ,  $p < 0,05$ ). При сравнении с пациентами, у которых данный аллель не был представлен (I/I), анализ ФР и клинической манифестации показал, что гомозиготные АПФ D/D или гетерозиготные АПФ I/D генотипы у пациентов с ИБС были ассоциированы с большей частотой распространенности артериальной гипертензии (АГ) — 90,91% и 88,24% vs 78,18%, высоким систолическим артериальным давлением (САД) —  $155,32 \pm 1,46$  мм рт.ст. и  $140,5 \pm 1,31$  мм рт.ст. vs  $125,42 \pm 1,36$  мм рт.ст.), диастолическим артериальным давлением (ДАД) —  $95,42 \pm 1,35$  мм рт.ст. и  $90,6 \pm 1,28$  мм рт.ст. vs  $80,5 \pm 1,84$  мм рт.ст., и продолжительностью стенокардии — 40,00% vs 34,11% и 23,64%, соответственно ( $p < 0,01$ ).

Статистически значимые различия между носителями генотипов I/I, D/D и I/D в отношении степени АГ отсутствовали. Учитывая спектр ФР и клиническое состояние при поступлении в соответствии с генным полиморфизмом АПФ, выявленном в этом исследовании, очевидно, что присутствие D-аллеля и в частности гомозиготного состояния D/D ассоциировано с цифрами АД, превышающими оптимальный уровень ( $r_{xy} = 0,81$ ,  $p_{(DD-II)} < 0,01$ ). Носительство D-аллеля при гетерозиготном состоянии I/D было ассоциировано с возвратом симптомов стенокардии ( $r_{xy} = 0,42$ ,  $p_{(ID-II)} < 0,05$ ) и значимо более высоким риском сердечно-сосудистой смертности ( $r_{xy} = 0,27$ ,  $p_{(ID-II)} < 0,05$ ).

Распространенность вариантов генотипа AGT<sub>1</sub>R с цитозином или аденином (A/C) в ОГ была следующей: генотип A/A встречался у 72 (25,74%) пациентов, C/C — у 47 (16,78%), A/C — у 161 (59,28%). В ГК распространенность генотипов была следующей: 31 (10,69%) носитель C/C, 162 (55,86%) носителя A/C и 97 (33,40%) носителей A/A. Значимых различий по частоте распространения изучаемых генотипов не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Генотипирование полиморфизма AGT<sub>1</sub>R A/C не определило значимых различий между распространенностью аллеля высокого риска C — 72,83% и 70,71% ( $p > 0,05$ ) и аллеля без риска A — 27,17% и 29,29% ( $p > 0,05$ ) у пациентов ОГ по сравнению ГК.

Сравнительный анализ характеристик пациентов с ИБС, сгруппированных по A/C полиморфизму гена AGT<sub>1</sub>R, выявил связь гомозиготного состояния C/C и гетерозиготного состояния A/C с высокой частотой АГ — 95,49%, 89,44% и 68,33% ( $p < 0,05$ ).

Оценка связи клинических детерминант и A/C полиморфизма гена AGTR показала, что присутствие генотипа высокого риска C/C у пациентов с ИБС связано с повышенной распространенностью АГ ( $r_{xy} = 0,88$ ,  $p_{(CC-AA)} < 0,01$ ) по сравнению с гомозиготным генотипом A/A. Анализ индексов взаимосвязи у пациентов с ИБС  $jghtltk bk$  умеренную положительную корреляцию между носительством аллеля риска D гена АПФ и аллеля риска C гена AGT1R ( $r_{xy} = 0,58$ ,  $\chi^2 = 35,30$ ,  $p < 0,001$ ).

Распределение частот полиморфизма Asp298Glu гена eNOS у пациентов ОГ не выявило значимых различий по сравнению с ГК в отношении частоты распространения генотипа A/G — 53,21% и 57,93% ( $p > 0,05$ ) и частоты распространения аллеля риска A/A — 63% и 79% ( $p > 0,05$ ). Значимых различий по возрасту пациентов выявлено не было, однако обнаружена тенденция к большей частоте данного аллеля у женщин — 37,84% и 24,27% ( $p = 0,06$ ).

Сравнительный анализ характеристик пациентов из ОГ, разделенных на подгруппы по полиморфизму Asp298Glu гена eNOS показал, что гомозиготное состояние с генотипом высокого риска A/A или гетерозиготное состояние A/G ассоциированы с высокой распространенностью АГ — 96,00% и 87,91% vs 69,64% ( $p < 0,05$ ).

Анализ клинической манифестации показал, что ~ 89,33% всех носителей генотипа A/A имели АГ 2–3 степеней, в то время как указанные степени АГ среди носителей генотипа G/G были обнаружены лишь у 69,64% пациентов и у 85,23% носителей генотипа A/G. Анализ показателей ЭхоКГ показал снижение фракции выброса (ФВ) <50% у более половины больных с генотипом A/G (57,05%); то же самое было обнаружено у больных с генотипами G/G и A/A — 42,86% и 46,67%, соответственно.

Оценка связи между клиническими детерминантами и полиморфизмом Asp298Glu гена eNOS показала, что гомозиготное состояние A/A и гетерозиготное носительство (A/G) у пациентов с ИБС ассоциировано с повышенной распространенностью АГ в сравнении с пациентами без носительства таких полиморфизмов (GG) ( $r_{xy} = 0,84$ ,  $p_{(AA-GG)} < 0,01$ ).

При анализе частоты распространения генотипов P1A GPIIb/IIIa IIb/IIIa рецепторов в зависимости от полиморфизма, определяемого методом расщепления рестрикционного фермента Msp-I, обнаружили, что гаплотип высокого риска A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> определялся у 63 (22,50%) пациентов из ОГ и у 28 (9,66%) пациентов из ГК; различия были статистически значимыми ( $\chi^2 = 16,28$ ,  $p < 0,001$ ). Значимые различия между группами по возрасту отсутствовали, однако имела место тенденция к преимущественной распространенности у мужчин — 53,39% vs 43,24% ( $p = 0,06$ ).

Анализ генотипирования полиморфизма A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> GPIIb/IIIa показал, что мутантный аллель A2 имеет тенденцию к более высокой распространенности среди больных ИБС в сравнении с ГК — 72,85% и 70,71% ( $p = 0,06$ ). В то же время распространенность рецессивного аллеля A1 у больных ОГ была ниже, чем в ГК.

Гликопротеиды мембраны тромбоцитов играют важную роль в адгезии и агрегации. Аллельные варианты для GPIIb/IIIa связываются с фибриногеном, что является ключевой реакцией в процессе агрегации тромбоцитов. Присутствие аллеля P1A<sub>2</sub> ведет к повышению функциональной активности рецепторов и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*.

Анализ соотношения между носительством различных генотипов и ФР выявил значимые различия

между носителями генотипов  $A_1/A_1$ ,  $A_1/A_2$  и  $A_2/A_2$  по распространенности курения — 48,68% и 53,90% vs 69,84%, соответственно ( $p < 0,01$ ) и смешанной дислипидемии (ДЛП) — 59,21% и 75,17% vs 63,49% ( $p < 0,05$ ). Отмечены статистически значимые различия между группами в отношении доли пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) в анамнезе: генотип  $A_2/A_2$  был обнаружен у большего количества больных, чем  $A_1/A_1$  — 20,63% и 9,21%, соответственно ( $p < 0,05$ ).

Анализ соотношения биохимических характеристик с полиморфизмом  $A_1/A_2$  гена GP IIb/IIIa показал, что генотип  $A_2/A_2$  был ассоциирован с более высоким уровнем протромбина в сравнении с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_1/A_2$  —  $106,96 \pm 0,52\%$ ,  $90,83 \pm 0,59\%$  и  $80,00 \pm 1,05\%$  ( $p < 0,05$ ). Симптомы сердечной недостаточности (СН) II и III функционального класса по NYHA имели 25,53% носителей генотипа  $A_1/A_2$ , 15,87% носителей генотипа  $A_2/A_2$  и 14,47% носителей генотипа  $A_1/A_1$  ( $p > 0,05$ ).

Стоит отметить, что четверть носителей генотипа высокого риска  $A_2/A_2$  и  $A_1/A_2$  перенесли острый Q-ИМ в отличие от носителей генотипа  $A_1/A_1$  — 28,36%, 22,22% и 19,73%, соответственно ( $p < 0,05$ ).

Носительство аллеля  $A_2$  и гомозиготного состояния  $A_2/A_2$  ассоциировано с наличием ДЛП ( $r_{xy} = 0,53$ ,  $p_{[A2A2-A1A1]} < 0,05$ ) и курением ( $r_{xy} = 0,64$ ,  $p_{[A2A2-A1A1]} < 0,01$ ) в качестве ФР и высокой вероятностью предшествующего ИМ.

## Заключение

Носительство генотипа D/D и аллеля D гена АПФ является маркером повышенного риска ИБС, ассоциировано с высокой частотой АГ и сердечно-сосудистой смертности и имеет положительную корреляцию с C/C-вариантом полиморфизма высокого риска гена AGTR1. Генотип  $A_2/A_2$  гена рецепторов

GP IIb/IIIa ассоциирован с предрасположенностью к ИБС и повышенной частотой возникновения ИМ и ДЛП, особенно у курильщиков. Доказана зависимость влияния маркеров полиморфизма гена eNOS на течение ИБС от наличия АГ.

**Конфликт интересов:** не декларирован.

## Литература

1. Caproş N. Coronary artery disease, environmental and genetic factors. Chisinau. 2012; 270. Romanian.
2. Covic M. Genomica bolii coronariene — o mare speranta pentru descifarea mecanismelor patogenice ale bolii [Genomics of coronary artery disease - a great hope for reveal pathogenic mechanisms of the disease]. Viata Medicala. 2012; 27 (1173): 13-6. Romanian.
3. Curocichin Gh. Complexul dereglarilor metabolice la pacientii hipertensivi: caracteristica clinico-genetica [Complex of metabolic disorders in hypertensive patients: clinical and genetic characteristics] [Thesis of doctor in medicine]. Chisinau (Moldova); 2009. Romanian.
4. Hamm C, Bassand J, Agewall S, et al. Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J. 2011; 32: 2999-3054.
5. Istrati V, Manea D, Barbacar N, et al. Corelatia unor marcheri polimorfici genelor enzimei de conversie a angiotensinei 1 si areceptorilor tip 1 ai angiotensinei 2 cu extinderea procesului atherosclerotic in arterele coronariene [Correlation of angiotensin converting enzyme polymorphic marker and type 1 receptor of angiotensin 2 gene with atherosclerotic process expansion in the coronary arteries]. Buletinul Academiei de Stiinte a Moldovei, Stiinte medicale. 2006; 1 (5): 64-9. Romanian.
6. Lusis AJ. Genetics of atherosclerosis. Trends Genet 2012; 28: 267-75.
7. O'Donnell CJ, Nabel EG. Genomics of cardiovascular disease. N Engl J Med. 2011; 365: 2098-109.