

УДК 577.21

Мультилокусный анализ генетической предрасположенности к инфаркту миокарда у русских: репликационное исследование

Н. Г. Кукава^{1#}, Б. В. Титов^{1,2#}, Г. Ж. Осьмак^{1,2}, Н. А. Матвеева^{1,2}, О. Г. Кулакова^{1,2},
А. В. Фаворов³, Р. М. Шахнович¹, М. Я. Руда¹, О. О. Фаворова^{1,2*}

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

³Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US

#Эти авторы внесли равный вклад в исследование.

*E-mail: olga.favorova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2017

Принята к печати 28.09.2017

РЕФЕРАТ В поисках генетических маркеров риска инфаркта миокарда (ИМ), обладающих прогностической значимостью для русского этноса, провели репликационное исследование ассоциации с ИМ вариантов генов *PCSK9* (rs562556), *APOE* (эпсилон-полиморфизм, rs7412 и rs429358), *LPL* (rs320), *MTHFR* (rs1801133), *eNOS* (rs2070744) и области 9p21 (rs1333049) у 405 пациентов, перенесших ИМ, в сравнении с 198 индивидами контрольной группы. Наблюдали значимую ассоциацию вариантов генов липидного обмена *PCSK9*, *APOE* и *LPL*, а также гена *eNOS* с ИМ. Варианты гена *MTHFR* и rs1333049 области 9p21 оказались незначимыми поодиночке, но входили в состав нескольких различных ИМ-ассоциированных аллельных сочетаний, обнаруженных с помощью мультилокусного анализа. Нелинейных эпистатических взаимодействий между компонентами найденных сочетаний не обнаружено. Сделано заключение, что кумулятивный эффект генов в составе сочетания возникает в результате суммирования их малых независимых вкладов. С помощью ROC-анализа оценивали прогностическую значимость аддитивной композитной модели, построенной с использованием генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS* как генетических маркеров. После включения этих маркеров в ранее опубликованную нами композитную модель индивидуального генетического риска ИМ предсказательная эффективность достигла значения $AUC = 0.676$. Однако результаты, полученные в настоящем исследовании, безусловно, нуждаются в воспроизведении на независимой выборке русских.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллельный полиморфизм, генетические маркеры, гены, инфаркт миокарда, мультилокусный анализ, русские.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AUC – площадь под кривой (area under curve) при ROC-анализе; GWAS – полно-геномное ассоциативное исследование (genome-wide association study); NO – оксид азота; ROC – рабочая характеристика приемника (receiver operating characteristic); SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism); ДИ – доверительный интервал; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМ – инфаркт миокарда; ОШ – отношение шансов; ПО – программное обеспечение; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-SSP – ПЦР с применением аллель-специфических праймеров; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ср. в. – средний возраст.

ВВЕДЕНИЕ

Инфаркт миокарда (ИМ) – наиболее тяжелая форма ишемической болезни сердца (ИБС). Несмотря на значительный прогресс в предотвращении и лечении сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), достиг-

нутый за последние десятилетия в ведущих странах мира, ИМ остается наиболее частой причиной смерти населения в мировом масштабе.

Как ИМ, так и ИБС представляют собой мультифакториальные полигенные заболевания, и прису-

щий им не-Менделевский характер наследования является следствием взаимодействия вариантов ряда генов. Генетическая предрасположенность к ИБС хорошо изучена с помощью полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), тогда как для ИМ как отдельного фенотипа проведено относительно немного полногеномных исследований [1, 2]. Наблюдается довольно плохая воспроизводимость немногочисленных ИМ-ассоциированных 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, отмечается, что пока они не привели к прогрессу в прогнозировании риска этого заболевания [3].

Не удивительно, что традиционный подход «ген-кандидат» сохраняет свою значимость. Накоплены обширные данные по ассоциации отдельных генов-кандидатов с ИМ у жителей России, многие из которых получены российскими участниками международных проектов MONICA [4] и HAPIEE [5]. Особое значение при выявлении факторов генетической предрасположенности придается воспроизведению (репликации) полученных результатов как на независимых выборках представителей того же этноса, так и в других этнических группах. Ранее мы наблюдали, что варианты генов *FGB*, *TGFB1*, *CRP*, *IFNG* и *PTGS1*, продукты которых вовлечены в системы воспаления и коагуляции, ассоциированы с риском развития ИМ у этнических русских, и реплицировали эти результаты на независимой выборке русских [6]. Показана прогностическая значимость найденных маркеров, причем эффективность прогноза существенно повышается при суммировании вкладов отдельных генов. Однако идентифицированные локусы объясняют только незначительную долю риска ИМ. В поисках других генетических маркеров риска ИМ, имеющих прогностическую значимость для русских, в настоящей работе мы расширили круг исследуемых нами генов-кандидатов, включив в него гены системы липидного обмена (*PCSK9*, *LPL* и *APOE*), гены *MTHFR* и *eNOS*, а также локус в области 9p21.

Известно, что продукты выбранных генов липидного обмена вовлечены в развитие ССЗ. Показано, что белок *PCSK9* (пропротеин-конвертаза субтилизин-кексинового типа 9), кодируемый геном *PCSK9*, участвует в деградации рецепторов липопротеинов низкой плотности и служит мишенью при терапии дислипидемией и связанных с ней ССЗ [7]. Продукт гена *APOE*, аполипопротеин Е, участвует в транспорте липидов и играет важную роль в развитии ССЗ [8]. Кодируемая геном *LPL* липопротеинлипаза является ключевым ферментом метаболизма и транспорта липидов и участвует в патогенезе атеросклероза [9].

Хорошо известна также роль продуктов генов *MTHFR* и *eNOS* в патогенезе ССЗ. *MTHFR* кодирует фермент метилентетрагидрофолатредуктазу, участвующую в превращении гомоцистеина в метионин. Гомоцистеинемия может приводить к дисфункции эндотелия, что является фактором риска атеросклероза и связанных с ним ССЗ. [10]. Кодируемая геном *eNOS* эндотелиальная синтаза оксида азота (NO) катализирует образование NO, участвующего в регуляции тонуса и проницаемости сосудистой стенки; нарушения в системе NO могут приводить к атеросклерозу, гипертонии и тромбозу [11].

Ассоциацию rs1333049 в области 9p21 с ИМ наблюдали в нескольких GWAS и валидировали в ряде этносов. В этом локусе находится ген некодирующей регуляторной РНК ANRIL. Эта РНК может влиять на экспрессию ингибиторов циклинзависимых киназ $p15^{INK4a}$ и $p16^{INK4b}$, которые кодируются генами *CDKN2A* и *CDKN2B*, расположенными в той же области. Предполагают, что область 9p21 может участвовать в патогенезе атеросклероза через регуляцию пролиферации и апоптоза гладкомышечных клеток [12].

Целью нашей работы было репликационное исследование ассоциации вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL*, *MTHFR*, *eNOS* и области 9p21 с риском развития ИМ у русских. В табл. 1 представлены характеристики выбранных генов и однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Мы провели также мультилокусный анализ ассоциации сочетаний вариантов этих генов/локусов с ИМ, поскольку такой подход создает возможность выявления кумулятивного эффекта генов [13], и исследовали природу этого эффекта. Мы оценили прогностическую эффективность найденных маркеров как по отдельности, так и совместно с ранее найденными маркерами [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследовании методом «случай-контроль» использовали образцы геномной ДНК больных ИМ, которые проходили лечение в отделе неотложной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава РФ. Группа больных включала 405 человек, этнических русских, средний возраст (ср. в.) \pm стандартное отклонение 57.5 ± 12.8 лет. Из них 271 мужчина (ср. в. 53.4 ± 11.9 лет) и 134 женщины (ср. в. 65.6 ± 10.3 лет). Диагноз ИМ ставился согласно критериям [14]. 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). От всех индивидов получено информированное согласие на проведение исследования.

Таблица 1. Включенные в исследование гены и их полиморфные участки

Ген	Хромосомная локализация	Продукт(ы) гена	Полиморфный участок*	
			SNP	rs ID
<i>PCSK9</i>	1p32.3	Пропропротеин-конвертаза субтилизин-кексинового типа 9	1420G > A	rs562556
<i>APOE</i>	19q13.2	Аполипопротеин E	эпсилон-полиморфизм	rs7412, rs429358
<i>LPL</i>	8p22	Липопротеинлипаза	495T > G (HindIII H+>H-)	rs320
<i>MTHFR</i>	1p36.22	5,10-Метилентетрагидрофолатредуктаза	677C > T	rs1801133
<i>eNOS</i> (другое название <i>NOS3</i>)	7q36	Эндотелиальная синтаза оксида азота	-786T > C	rs2070744
кластер генов <i>ANRIL</i> и <i>CDKN2A/2B</i>	9p21.3	Длинная некодирующая РНК (ген <i>ANRIL</i>); ингибиторы 2A и 2B циклинзависимой киназы (гены <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i>)	C > G	rs1333049

*Исследуемый однонуклеотидный полиморфизм (SNP) и его обозначение по референсной нуклеотидной последовательности генома человека (rs ID).

Геномное типирование проводили методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для эпсилон-полиморфизма гена *APOE* (rs7412, rs429358) [15], 495T > G гена *LPL* (rs320) [16], 677C > T *MTHFR* (rs1801133) [17] и -786T>C гена *eNOS* (rs2070744) [18] проводили анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР. Геномное типирование rs562556 *PCSK9*, rs1333049 в области 9p21.3 осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением набора TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems).

Статистический анализ

Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга проводили с использованием программы Haploview 4.2 [19]. Поиск ассоциаций носительства аллелей и генотипов отдельных SNP и их сочетаний с развитием ИМ проводили с помощью программного обеспечения (ПО) APSampler [20]. Значимость найденных ассоциаций оценивали с помощью точного критерия Фишера и по значениям отношения шансов (ОШ). Для величин p по Фишеру вводили поправку на число тестов (множественных сравнений) в соответствии с методом Бонферрони (p_{corr}). Величины p и p_{corr} считали значимыми при уровне < 0.05 при условии, что значения 95% доверительного интервала (ДИ) для ОШ не пересекали 1. Считали SNP ассоциированным с ИМ, если ассоциация была значимой либо в рецессивной, либо в доминантной модели.

Для выявления возможного нелинейного взаимодействия (эпистаза) между аллелями в найден-

ных биаллельных сочетаниях использовали подход, предложенный нами ранее [6], определяя величины p в точном трехфакторном тесте [21] и фактор синергии (SF) [22]. Взаимодействие между аллелями в сочетании рассматривали как эпистатическое, если величина p была менее 0.05, а значение 95% ДИ для SF не пересекало 1.

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 (receiver operating characteristic) анализе с использованием пакета rROC v.1.8 for R; парные сравнения проводили по методу [23]. Для оценки чувствительности и специфичности предиктивных моделей рассчитывали пороговый уровень вероятности по методу [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Равновесие Харди-Вайнберга соблюдалось для исследованных полиморфных участков в контрольной группе ($p > 0.05$). На рис. 1 представлены частоты аллелей всех исследованных локусов в контрольной группе в сравнении с частотами минорных аллелей (global MAF) из базы данных SNP [25] по данным проекта «1000 геномов», фаза 3. Абсолютные различия наблюдаемых частот аллелей от данных базы SNP составляют до 10%.

Данные о носительстве аллелей и генотипов генов *PCSK9* (rs562556), *APOE* (эпсилон-полиморфизм, rs7412 и rs429358), *LPL* (rs320), *MTHFR* (rs1801133), *eNOS* (rs2070744) и области 9p21 (rs1333049) у 405 пациентов, перенесших ИМ, и 198 индивидов контроль-

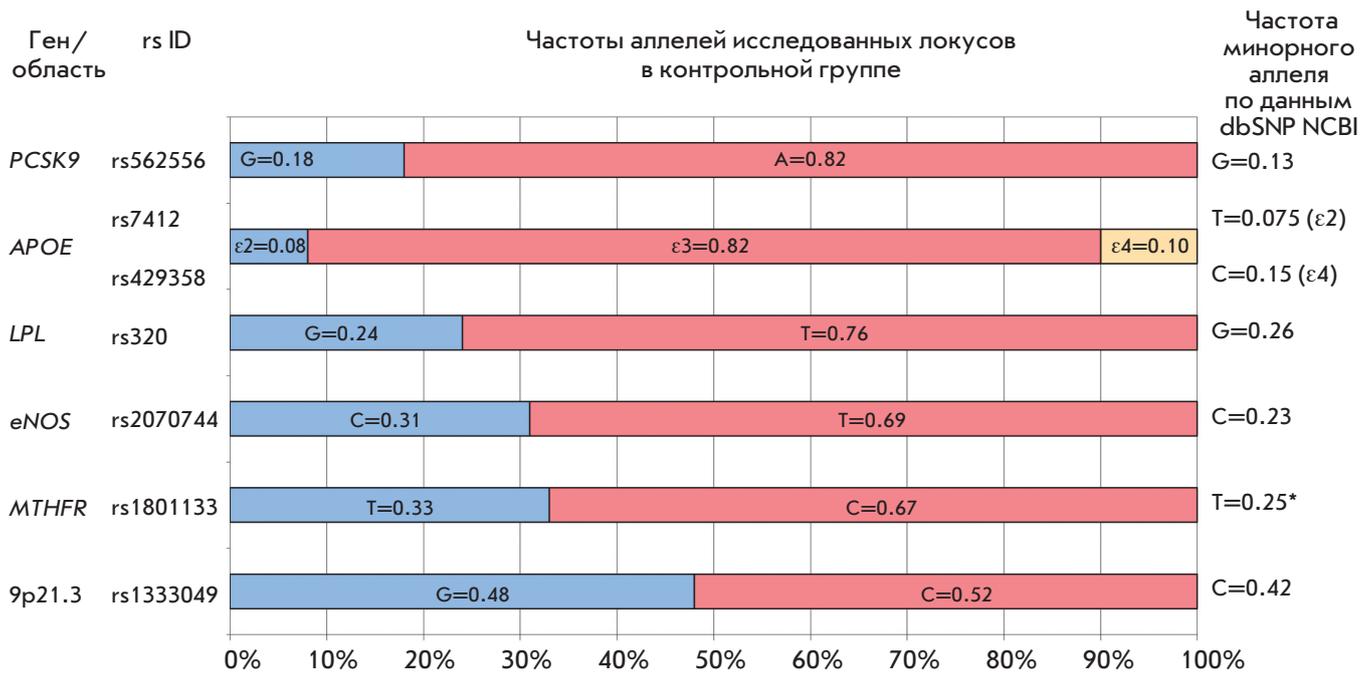


Рис. 1. Частоты аллелей исследованных локусов в контрольной группе (этнические русские) по сравнению с частотами аллелей из базы данных dbSNP NCBI [25].

*В базе данных dbSNP NCBI частота минорного аллеля (MAF) приведена по комплементарной цепи.

ной группы представлены в табл. 2. Наблюдали значимые различия в частотах носительства аллелей и генотипов полиморфных участков всех трех генов липидного обмена: *PCSK9*, *APOE* и *LPL*. Значимые различия выявлены также для гена *eNOS*, но не *MTHFR* и области 9p21. Факторами риска развития ИМ оказались генотипы *PCSK9**A/A ($p = 0.013$, ОШ = 1.45), *APOE**ε3/ε3 ($p = 0.017$, ОШ = 1.52) и *LPL**G/G ($p = 0.032$, ОШ = 1.96), а также носительство аллеля *eNOS**C ($p = 0.0034$, ОШ = 1.63). Следует отметить, однако, что величина p_{corr} , полученная с поправкой Бонферрони на число тестов (множественных сравнений), была значимой только в случае вариантов генов *APOE* и *eNOS*.

С помощью ПО 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. Обнаружены ассоциированные с риском ИМ би- и триаллельные сочетания, характеризующиеся большим размером эффекта и большим уровнем значимости ассоциации с ИМ, чем компоненты этих сочетаний. В состав сочетаний входят не только варианты генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS*, значимо ассоциированные с ИМ поодиночке, но и аллели/генотипы *MTHFR* и rs1333049 в области 9p21. На рис. 2

(A–B) приведены значения ОШ и 95% ДИ для сочетаний, содержащих варианты двух последних локусов: *MTHFR**C, rs1333049*C и rs1333049*C/G. Видно, что во всех случаях перечисленные варианты, представленные в нижней части каждого рисунка, не значимы. Однако сочетание аллеля *MTHFR**C с аллелем *eNOS**C оказывается значимым ($p = 0.0006$; ОШ = 1.80), причем более значимым, чем носительство одного аллеля *eNOS**C (рис. 2А). С риском ИМ ассоциировано также триаллельное сочетание (*LPL**G/G + *MTHFR**C + rs1333049*C) ($p = 0.018$; ОШ = 2.83) и входящее в его состав биаллельное сочетание (*LPL**G/G + *MTHFR**C) ($p = 0.021$; ОШ = 2.30), которое ассоциировано слабее, чем это триаллельное сочетание, но более значимо, чем один генотип *LPL**G/G (рис. 2Б). Еще одно триаллельное сочетание (*APOE**ε4 + *eNOS**T + rs1333049*C/G) негативно ассоциировано с риском ИМ ($p = 0.00041$; ОШ = 0.30) (рис. 2В). Слабее с риском ИМ ассоциированы входящие в его состав биаллельные сочетания (*APOE**ε4 + rs1333049*C/G) и (*APOE**ε4 + *eNOS**T). Однако эта ассоциация сильнее, чем у единственного значимого поодиночке компонента сочетания – носительства аллеля *APOE**ε4. Таким образом, с помощью мультилокусного анализа удалось выявить участие в формировании предрасположенности к ИМ в составе нескольких аллельных сочетаний вариантов

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов полиморфных участков исследуемых генов у больных ИМ (405 человек) и в контрольной группе (198 человек)

Носительство аллелей и генотипов	Пациенты, n (%)	Контроль, n (%)	p	p_{corr}^*	ОШ (95% ДИ) для значимых различий**
PCSK9 rs562556					
A	389(96)	193(97)	НЗ	НЗ	
G	102(25)	65(33)	0.013	НЗ	0.69 (0.47–1.00)
A/A	303(75)	133(67)	0.013	НЗ	1.45 (1.00–2.10)
A/G	86(21)	60(30)	0.010	НЗ	0.62 (0.42–0.91)
G/G	16(4)	5(3)	НЗ	НЗ	
APOE rs7412, rs429358 (эпсилон-полиморфизм)					
ε2	63(16)	30(15)	НЗ	НЗ	
ε3	393(98)	194(98)	НЗ	НЗ	
ε4	40(10)	38(19)	0.0013	0.0091	0.46 (0.28–0.75)
ε2/ε2	5(1)	2(1)	НЗ	НЗ	
ε2/ε3	55(14)	26(13)	НЗ	НЗ	
ε2/ε4	3(1)	2(1)	НЗ	НЗ	
ε3/ε3	305(75)	132(67)	0.017	НЗ	1.52 (1.05–2.2)
ε3/ε4	33(8)	36(18)	0.00033	0.0023	0.40 (0.24–0.66)
ε4/ε4	4(1)	0(0)			
LPL rs320					
G	192(47)	85(43)	НЗ	НЗ	
T	363(90)	187(94)	0.032	НЗ	0.51 (0.25–0.99)
G/G	42(10)	11(6)	0.032	НЗ	1.96 (1.00–3.91)
G/T	150(37)	74(37)	НЗ	НЗ	
T/T	213(53)	113(57)	НЗ	НЗ	
MTHFR rs1801133					
C	369(91)	174(87)	НЗ	НЗ	
T	206(51)	106(54)	НЗ	НЗ	
C/C	199(49)	92(46)	НЗ	НЗ	
C/T	170(42)	82(41)	НЗ	НЗ	
T/T	36(9)	24(13)	НЗ	НЗ	
eNOS rs2070744					
C	253(62)	100(50)	0.0034	0.024	1.63 (1.16–2.30)
T	343(85)	174(88)	НЗ	НЗ	
C/C	62(15)	24(12)	НЗ	НЗ	
C/T	191(47)	76(38)	НЗ	НЗ	
T/T	152(38)	98(50)	0.0034	0.024	0.61 (0.43–0.86)
9p21 rs1333049					
C	313(78)	155(78)	НЗ	НЗ	
G	305(75)	146(74)	НЗ	НЗ	
C/C	100(25)	52(26)	НЗ	НЗ	
C/G	213(53)	103(52)	НЗ	НЗ	
G/G	92(22)	43(22)	НЗ	НЗ	

*Приведены значения p с поправкой Бонферрони на число тестов (множественных сравнений).

** $p < 0.05$.

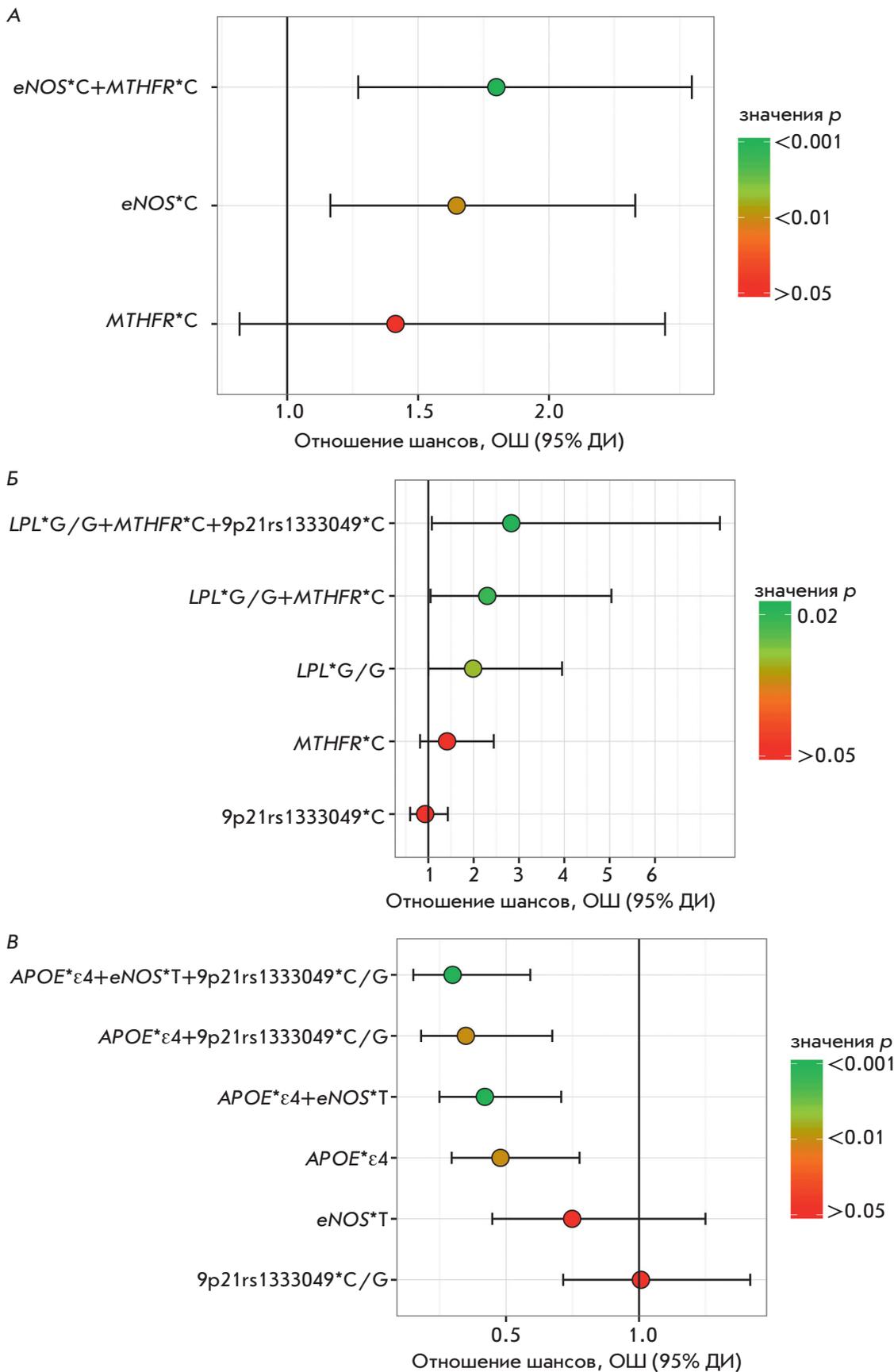


Рис. 2. Мультилокусный анализ, позволивший выявить ассоциацию с ИМ rs1801133 в гене *MTHFR* и rs1333049 в области 9p21, которые поодиночке значимо не ассоциированы с ИМ. Графически представлены значения отношения шансов (ОШ), доверительные интервалы (ДИ) и уровни значимости (качественно, градацией цвета кружка, соответствующего значению ОШ), для ассоциированных с ИМ сочетаний, которые включают варианты гена *MTHFR* и/или rs1333049, а также для компонентов этих сочетаний. А – биаллельное сочетание (*MTHFR**C + *eNOS**C), позитивно ассоциированное с ИМ, и его компоненты. Б – триаллельное сочетание (*LPL**G/G + *MTHFR**C + rs1333049*C), позитивно ассоциированное с ИМ, и его компоненты. В – триаллельное сочетание (*APOE**ε4 + *eNOS**T + rs1333049*C/G), негативно ассоциированное с ИМ, и его компоненты.

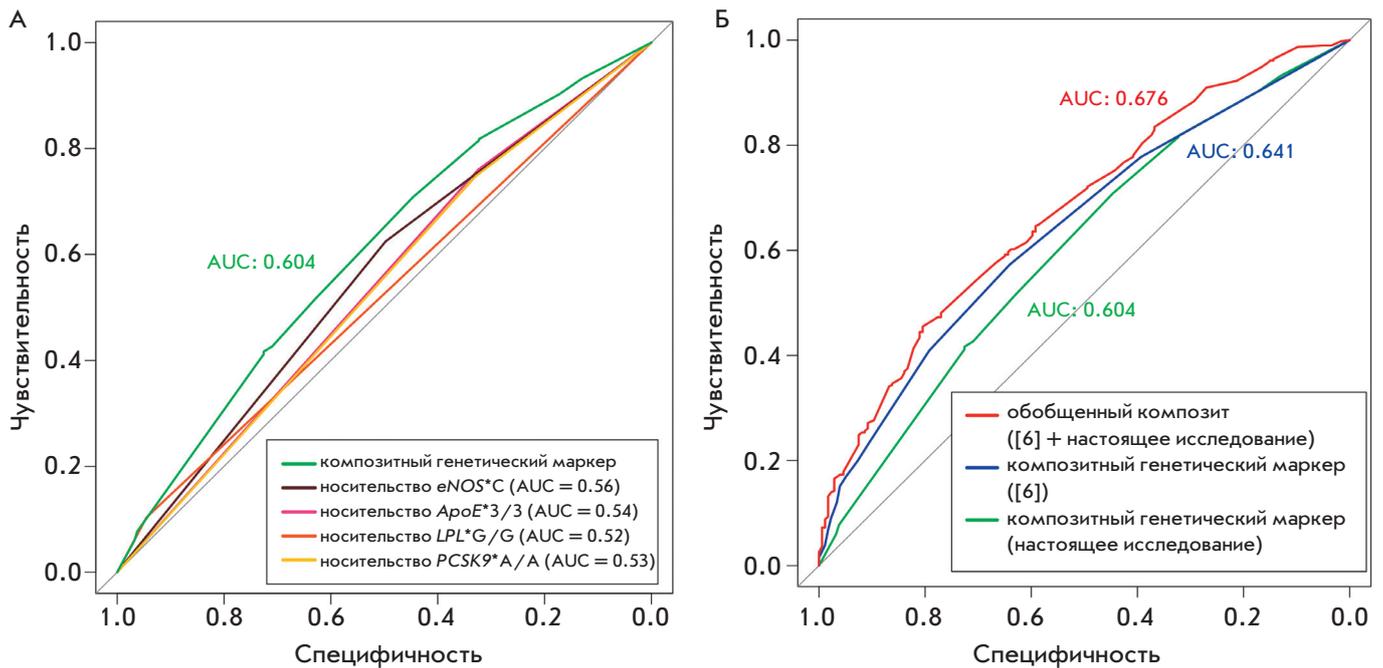


Рис. 3. ROC-анализ эффективности моделей, построенных на основе различных генетических маркеров индивидуального риска возникновения ИМ. А – эффективность классификации индивидов с помощью моделей, построенных на основе носительства отдельных генетических маркеров (вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS*), и модели, учитывающей носительство вариантов всех четырех генов (композиционный генетический маркер, зеленая линия). Б – прогностическая эффективность обобщенной композитной модели индивидуального генетического риска ИМ (красная линия), полученной при дополнении ранее описанной модели [6] (синяя линия) данными о носительстве вариантов генов *PCSK9*, *LPL*, *eNOS* и *APOE* (зеленая линия). Значения AUC (площади под кривой) для различных моделей представлены на рисунке тем же цветом, что и соответствующая этой модели кривая

гена *MTHFR* (rs1801133) и локуса 9p21 (rs1333049), которые не были значимо ассоциированы с ИМ по одиночке.

Для выяснения вопроса о том, чем объясняется наблюдаемый кумулятивный эффект аллелей разных генов – суммированием малых взаимно независимых вкладов отдельных аллелей или же эпистатическими взаимодействиями между этими аллелями – мы провели анализ трехфакторных взаимодействий с помощью статистического подхода, описанного нами ранее [6]. Полученные при этом значения фактора синергии (SF) с 95% ДИ и величины *p* в точном трехфакторном тесте, аналогичные ОШ с 95% ДИ и величине *p* в тесте Фишера при стандартной оценке ассоциаций между фенотипом и генотипом (т.е. в двухфакторном тесте), оказались незначимыми. Таким образом, мы не выявили значимых эпистатических взаимодействий между компонентами всех найденных сочетаний.

Для оценки прогностической значимости обнаруженных генетических факторов риска с помощью метода логистической регрессии была рассчитана индивидуальная вероятность возникновения ИМ

у каждого индивида в зависимости от носительства вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS*. Оценивали вклад совместного носительства аллелей/генотипов риска этих генов с помощью ROC-анализа (рис. 3А), исходя из эффективности классификации индивидов на больных и здоровых. Видно, 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 эффективность (AUC = 0.604). Надо отметить, что добавление в модель незначимых по одиночке аллелей гена *MTHFR* и области 9p21, входящих в состав выявленных с помощью APSampler сочетаний, не делает ее более эффективной.

Эти данные использованы для улучшения полученной нами ранее композитной генетической модели риска ИМ, включающей в качестве предикторов варианты генов *TGFB1*, *FGF* и *CRP*, а также эпистатическое сочетание *IFNG* с *PTGS1* [6]. На рис. 3Б показаны три ROC-кривые: ROC-кривая, полученная в исследованной выборке для композитной модели, описанной в [6],

ROC-кривая для совместного носительства найденных новых маркеров, представленная на *рис. 3А*, и ROC-кривая для обобщенной композитной модели, включающей как маркеры из предыдущей, так и из настоящей работы. Видно значимое ($p = 0.014$) повышение прогностической эффективности модели от AUC 0.641 в модели без новых маркеров до 0.676 в обобщенной композитной модели.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный методом «случай-контроль» мультилокусный анализ ассоциации полиморфных вариантов *PCSK9* (rs562556), *APOE* (эпсилон-полиморфизм, rs7412 и rs429358), *LPL* (rs320), *MTHFR* (rs1801133), *eNOS* (rs2070744) и области 9p21 (rs1333049) с риском развития ИМ позволил выявить значимо ассоциированные с ИМ аллели/генотипы *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *NOS*, а также би- и триаллельные сочетания, несущие, помимо вариантов перечисленных генов, еще и аллели/генотипы *MTHFR* и области 9p21.

Каждый из исследованных нами генов системы липидного обмена – *PCSK9*, *LPL* и *APOE* – оказался ассоциированным с риском ИМ; ОШ для генотипов риска лежит в пределах от 1.45 до 1.96, однако уровень значимости невелик (от 0.013 до 0.032). Вовлечение генов системы липидного обмена в развитие ИМ хорошо согласуется с общеизвестным фактом, что нарушения обмена липидов и повышение уровня холестерина и индекса атерогенности приводят к атеросклеротическим поражениям интимы артерий. Однако опубликованные данные об участии изученных нами вариантов генов системы липидного обмена в формировании ССЗ противоречивы.

rs562556 в гене *PCSK9* определяет замену Ile на Val в положении 474 кодируемого белка, что, по всей видимости, не влияет на уровень его продукции [26]. Мы наблюдали ассоциацию генотипа А/А этого SNP с ИМ у русских. Однако у японцев не наблюдали различий в распределении вариантов rs562556 у больных с ИМ и в контрольной группе, хотя этот SNP был ассоциирован с уровнем холестерина [27]. Выявлена связь между полиморфизмом rs562556, присутствием антифосфолипидных антител и развитием у носителей этих антител тромбоза – фактора риска ИМ [28]. Ассоциация с ИМ других вариантов гена *PCSK9*, а именно rs11206510 [29] и rs11591147 [30], показана в различных популяциях. Таким образом, полученные нами данные об ассоциации гена *PCSK9* с возникновением ИМ находятся в соответствии с опубликованными данными.

Отдельные аллельные варианты включенного в наше исследование эпсилон-полиморфизма гена *APOE* практически во всех популяциях ассоциированы с ССЗ и, в частности, с ИМ. Согласно проведен-

ным метаанализам, с риском развития ИМ ассоциирован аллель $\epsilon 4$, а $\epsilon 2$ является протективным [31, 32]. Однако выводы, полученные при метаанализе, включающем различные этносы, нельзя автоматически распространять на отдельные популяции, в которых наблюдается большой разброс в оценке роли отдельных аллелей в предрасположенности к ИМ. Вероятно, основной причиной плохой сходимости результатов отдельных исследований является существенная разница в частотах аллелей в различных популяциях и даже в одной и той же популяции, проживающей на разных территориях [33]. В частности, в нашем исследовании, выполненном для русских из Центральной России, генотипом риска оказался $\epsilon 3/\epsilon 3$, а в выборке мужчин из сибирской популяции – генотип $\epsilon 2/\epsilon 3$ [34].

rs320, известный также как HindIII-полиморфизм, определяет замену Т на G в интроне 8 гена *LPL*. Предполагают, что он находится в регуляторной области и влияет на экспрессию *LPL* [35]. Мы наблюдали ассоциацию rs320 с ИМ в нашей выборке. Связь этого полиморфизма с развитием ИМ показана и в ряде других исследований [36, 37], в том числе и у русских [38]. Описаны и другие полиморфизмы этого гена, ассоциированные с ИМ в японской популяции [39]. Однако данные об ассоциации отдельных аллелей с ИМ не всегда совпадают.

Еще один локус, вариант которого значимо ассоциирован с ИМ в нашей работе – это rs2070744 гена *eNOS*. Этот полиморфный участок находится в промоторной области гена. Аллель С, ассоциированный с риском ИМ в нашем исследовании, связан с уменьшением экспрессии мРНК и соответственно уровня белка *eNOS* [40]. Наши данные совпадают с результатами других исследований [41].

Замена С на Т в rs1801133 гена *MTHFR* приводит к замещению Ala в положении 222 белка на Val [42] и к почти к 50% снижению ферментативной активности метилентетрагидрофолатредуктазы [43]. В большинстве исследований не наблюдали ассоциации rs1801133 с риском развития ИМ в различных этносах, включая европеоидов [44] и русских [45]. Мы также не выявили ассоциации rs1801133 с риском развития ИМ у русских, однако носительство аллеля С оказалось значимо ассоциированным с риском ИМ в сочетании с носительством аллеля С гена *eNOS* (см. *рис. 2А*) или с носительством генотипа G/G гена *LPL* (см. *рис. 2Б*). Мы полагаем, что эти данные могут быть интерпретированы как аргумент в пользу вовлечения гена *MTHFR* в формирование предрасположенности к ИМ.

Область 9p21 – единственная область генома, вовлеченность которой в формирование ИМ воспроизведена в нескольких GWASs с полногеномным

уровнем значимости ($p < 5 \times 10^{-8}$) [2]. Эти данные подтверждены в ряде валидационных исследований, в том числе для rs10757278 и rs1333049 на выборке больных ИМ и контрольных групп из сибирской популяции (без указания этнической принадлежности) [46]. Мы не наблюдали значимой ассоциации rs1333049 с ИМ у русских, однако мультилокусный анализ позволил выявить ряд сочетаний, содержащих этот SNP. Носительство аллеля rs1333049*С в составе триаллельного сочетания ассоциировано с риском ИМ (см. рис. 2Б), а генотип rs1333049*С/С в составе би- и триаллельного сочетаний оказался протективным (см. рис. 2В), в хорошем соответствии с результатами работы [46].

Проведенный статистический анализ трехфакторных взаимодействий свидетельствует об отсутствии эпистатических взаимодействий между компонентами всех найденных сочетаний. В то же время все биаллельные сочетания, ассоциированные с риском ИМ (ОШ > 1), имеют по сравнению с входящими в них отдельными аллелями/генотипами бóльший уровень значимости и бóльшие значения ОШ (соответственно для протективных сочетаний с ОШ < 1 – меньшие значения ОШ). Аналогичная закономерность проявляется для триаллельных сочетаний при сравнении с биаллельными. Мы приходим к заключению, что наблюдаемые в настоящей работе кумулятивные эффекты возникают в результате аддитивности вкладов отдельных генов. Аддитивность эффекта при этом обусловлена тем, что в сравнительно небольшой выборке статистическая значимость наблюдения ассоциации заболевания с сочетанием слабых генетических факторов, действующих в одном направлении, выше, чем при наблюдении каждого из этих факторов. Следовательно, есть все основания предположить, что локусы *MTHFR* (rs1801133) и 9p21 (rs1333049) являются самостоятельными факторами риска ИМ с малыми эффектами, для выявления значимых ассоциаций с которыми в исследуемой нами выборке оказалось недостаточно статистической мощности, а использование мультилокусного анализа позволило восполнить этот недостаток.

Аналогичным образом, вследствие малых эффектов локусов *MTHFR* (rs1801133) и 9p21 (rs1333049), их добавление в композитную генетическую модель риска ИМ не повышало ее прогностической эффективности. Здесь следует отметить преимущество эпистатических сочетаний перед сочетаниями аддитивными в качестве классификаторов риска. Действительно, в работе [6] одним из предикторов риска ИМ оказалось эпистатическое сочетание

IFNG с *PTGS1*, оба компонента которого поодиночке не были ассоциированы с заболеванием. В то же время выявление генетических вариантов, входящих в состав аддитивных сочетаний, открывает возможность обнаружить их ассоциацию с заболеванием поодиночке на выборках большего объема.

Прогностическая эффективность композитной генетической модели риска ИМ, построенной на основании результатов настоящего исследования, хотя и значима, но невелика. Это справедливо и для модели, полученной нами ранее [6]. При объединении двух моделей удалось достичь величины AUC 0.676, что при пороге вероятности (cut-off) 0.74 соответствует чувствительности 0.80 и специфичности 0.45. В целом, на сегодняшний день ни результаты GWAS, ни данные, полученные с использованием подхода «ген-кандидат», не позволяют эффективно использовать данные генетического анализа для предсказания возникновения ИМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ ассоциации полиморфных участков шести генов-кандидатов показал их значимую ассоциацию с ИМ или поодиночке, или в составе сочетаний. В целом, мы реплицировали на независимых выборках русских из Центральной России ассоциацию с ИМ полиморфных вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL*, *MTHFR*, *eNOS* и области 9p21. Поскольку варианты одних и тех же генов (rs1801133 гена *MTHFR* или rs1333049 области 9p21), не значимые поодиночке, входили в состав нескольких различных сочетаний, между компонентами которых не выявлено эпистатических взаимодействий, можно заключить, что обнаруженный с помощью мультилокусного анализа кумулятивный эффект генов в составе сочетания возникает в результате суммирования их малых независимых вкладов.

Включение найденных маркеров в ранее опубликованную нами модель индивидуального генетического риска ИМ [6] значительно повышает ее предсказательную эффективность, хотя полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в воспроизведении на независимой выборке русских. Для дальнейшего повышения предсказательной способности композитной модели необходимо улучшать ее путем включения других генетических предикторов риска и уточнения значений коэффициентов уравнения регрессии на расширенных выборках. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-14-10251).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dai X., Wiernek S., Evans J.P., Runge M.S. // *World J. Cardiol.* 2016. V. 8. № 1. P. 1–23.
2. <http://www.ebi.ac.uk/gwas>
3. Dehghan A., Bis J.C., White C.C., Smith A.V., Morrison A.C., Cupples L.A., Trompet S., Chasman D.I., Lumley T., Völker U., et al. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 3. e0144997.
4. <http://www.thl.fi/monica/>
5. <http://www.ucl.ac.uk/easteurope/hapiee.html>
6. Barsova R.M., Lvovs D., Titov B.V., Matveeva N.A., Shakhnovich R.M., Sukhinina T.S., Kukava N.G., Ruda M.Y., Karamova I.M., Nasibullin T.R., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. e0144190.
7. Catapano A.L., Papadopoulos N. // *Atherosclerosis.* 2013. V. 228. № 1. P. 18–28.
8. Mahley R.W. // *J. Mol. Med. (Berlin).* 2016. V. 94. № 7. P. 9–46.
9. Li Y., He P.P., Zhang D.W., Zheng X.L., Cayabyab F.S., Yin W.D., Tang C.K. // *Atherosclerosis.* 2014. V. 237. № 2. P. 597–608.
10. Ueland P.M., Refsum H. // *J. Lab. Clin. Med.* 1989. V. 114. № 5. P. 473–501.
11. Liu D., Jiang Z., Dai L., Zhang X., Yan C., Han Y. // *Gene.* 2014. V. 545. № 1. P. 175–183.
12. Holdt L.M., Teupser D. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. V. 32. № 2. P. 196–206.
13. Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 3. С. 62–75.
14. Third Universal definition of myocardial infarction // *Eur. Heart J.* 2012. V. 33. P. 2551–2567.
15. Hixson J.E., Vernier D.T. // *J. Lipid. Res.* 1990. V. 31. P. 545–548.
16. Shimo-Nakanishi Y., Urabe T., Hattori N., Watanabe Y., Nagao T., Yokochi M., Hamamoto M., Mizuno Y. // *Stroke.* 2001. V. 32. P. 1481–1486.
17. Genest J., Rozen R. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997. V. 17. № 3. P. 569–573.
18. Augeri A.L., Tsongalis G.J., van Heest J.L., Maresh C.M., Thompson P.D., Pescatello L.S. // *Atherosclerosis.* 2009. V. 204. № 2. e28–34.
19. <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>
20. <https://sourceforge.net/projects/apsampler/>
21. White D.R., Pesner R., Reitz K.P. // *Behavior Sci. Res.* 1983. V. 18. P. 103–122.
22. Cortina-Borja M., Smith A.D., Combarros O., Lehmann D.J. // *BMC Res. Notes.* 2009. V. 2. P. 105–111.
23. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. // *Biometrics.* 1988. V. 44. P. 837–845.
24. Youden W.J. // *Cancer.* 1950. V. 3. № 1. P. 32–35.
25. www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
26. Астракова (Бенимецкая) К.С., Шахтшнейдер Е.В., Иванов-щук Д.Е., Орлов П.С., Рагино Ю.И., Воевода М.И. // *Атеросклероз.* 2016. Т. 12. № 2. С. 18–24.
27. Shioji K., Mannami T., Kokubo Y., Inamoto N., Takagi S., Goto Y., Nonogi H., Iwai N. // *J. Hum. Genet.* 2004. V. 49. № 2. P. 109–114.
28. Ochoa E., Iriondo M., Manzano C., Fullaondo A., Villar I., Ruiz-Irastorza G., Zubiaga A.M., Estonba A. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 1. e0146990.
29. Myocardial Infarction Genetics Consortium, Kathiresan S., Voight B.F., Purcell S., Musunuru K., Ardissino D., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 3. P. 334–341.
30. Kathiresan S., Myocardial Infarction Genetics Consortium // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 21. P. 2299–2300.
31. Wang Y.L., Sun L.M., Zhang L., Xu H.T., Dong Z., Wang L.Q., Wang M.L. // *FEBS Open Bio.* 2015. V. 5. P. 852–858.
32. Xu H., Li H., Liu J., Zhu D., Wang Z., Chen A., Zhao Q. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. e104608.
33. Боринская С.А., Кальина Н.Р., Санина Е.Д., Кожекбаева Ж.М., Гупало Е.Ю., Гармаш И.В., Огурцов П.П., Паршукова О.Н., Бойко С.Г., Веселовский Е.М. и др. // *Генетика.* 2007. Т. 43. № 10. С. 1434–1440.
34. Воевода М.И., Шахтшнейдер Е.В., Максимов В. Н., Куликов И.В., Ромащенко А.Г. // *Атеросклероз.* 2008. Т. 4. № 1. С. 11–26.
35. Chen Q., Razzaghi H., Demirci F.Y., Kamboh M.I. // *Atherosclerosis.* 2008. V. 200. № 1. P. 102–108.
36. Tanguturi P.R., Pullareddy B., Rama Krishna B.S., Murthy D.K. // *Indian Heart J.* 2013. V. 65. № 6. P. 653–657.
37. Gigeck Cde O., Chen E.S., Cendoroglo M.S., Ramos L.R., Araujo L.M., Payão S.L., Smith Mde A. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007. V. 45. № 5. P. 599–604.
38. Мальгина Н.А., Мелентьев А.С., Костомарова И.В., Мелентьев И.А., Сайгитов Р.Т., Смирнова Ю.Б., Серова Л.Д. // *Молекуляр. биология.* 2001. Т. 35. № 5. С. 787–791.
39. Matsuoka R., Abe S., Tokoro F., Arai M., Noda T., Watanabe S., Horibe H., Fujimaki T., Oguri M., Kato K., et al. // *Int. J. Mol. Med.* 2015. V. 35. № 5. P. 1451–1459.
40. Doshi A.A., Ziolo M.T., Wang H., Burke E., Lesinski A., Binkley P. // *J. Card. Fail.* 2010. V. 16. № 4. P. 314–319.
41. Kong X.Z., Zhang Z.Y., Wei L.H., Li R., Yu J. // *Med. Sci. Monit.* 2017. V. 11. № 23. P. 759–766.
42. Dayakar S., Goud K.I., Reddy T.P., Rao S.P., Sesikeran S.B., Sahnani M. // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2011. V. 15. № 11. P. 765–769.
43. Xuan C., Bai X.Y., Gao G., Yang Q., He G.W. // *Arch. Med. Res.* 2011. V. 42. № 8. P. 677–685.
44. Alizadeh S., Djafarian K., Moradi S., Shab-Bidar S. // *Int. J. Cardiol.* 2016. V. 217. P. 99–108.
45. Назаренко Г.И., Скворцова В.И., Клейменова Е.Б., Константинова М.В. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2009. Т. 109. № 10. Прилож. 2. С. 19–25.
46. Максимов В.Н., Куликов И.В., Орлов П.С., Гафаров В.В., Малютина С.К., Ромащенко А.Г., Воевода М.И. // *Вест. РАМН.* 2012. Т. 67. № 5. С. 24–29.