

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI 10.52727/2078-256X-2021-17-7-11

АССОЦИАЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ RS10867772, RS4700290 С ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТЬЮ

А. А. Иванова¹, С. К. Малютин¹, В. П. Новоселов², И. А. Родина³,
О. В. Хамович³, В. Н. Максимов¹¹НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1²ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52³ГБУЗ 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 rs10867772 и rs4700290, найденных в качестве возможных новых молекулярно-генетических маркеров ВСС по результатам полногеномного аллелотипирования на образцах 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±9,0 года, 73,5% мужчин). Контрольная группа (n=405, средний возраст 53,2±9,2 года, 70,0% мужчин) 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 ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. **Результаты.** Не обнаружено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей rs10867772 и rs4700290 между группой ВСС и контрольной группой (p>0,05), в том числе при разделении групп по полу и возрасту. **Заключение.**

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

Малютин 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., зав. кафедрой судебной медицины Лечебного факультета, e-mail: sme.ngmu@mail.ru

Родина Ирина Александровна — канд. мед. наук, врач-судебно-медицинский эксперт, ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы», 630087, Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, д.134, e-mail: ziza76@bk.ru

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

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

По результатам проведенного исследования не подтверждена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs10867772 и rs4700290 с ВСС.

Ключевые слова: внезапная сердечная смерть, однонуклеотидный полиморфизм, rs10867772, rs4700290, полногеномное аллелотипирование.

Внезапная сердечная смерть (ВСС) продолжает оставаться одной из крупномасштабных проблем здоровья и здравоохранения [1]. В США ВСС является лидирующей причиной смертности от сердечно-сосудистой патологии. И несмотря на успехи в профилактике ВСС, ее высокая частота остается неизменной [2]. В Российской Федерации около 50% лиц, умирающих по причине сердечно-сосудистых заболеваний, погибает вследствие ВСС [3]. Около 40% случаев ВСС у лиц моложе 35 лет остаются необъясненными (ВСС, возникшая вследствие нарушения ритма) [4]. Существует большое количество факторов риска развития ВСС, в том числе генетические. При этом стратификация риска ее возникновения несовершенна, особенно для лиц с клинически бессимптомной сердечно-сосудистой патологией [1]. Поэтому исследование молекулярно-генетических маркеров ВСС с целью включения их в будущие рискометры ВСС представляется актуальным и целесообразным. Успешное внедрение генетического тестирования в клиническую практику может способствовать диагностике наследственных сердечно-сосудистых заболеваний, идентификации групп высокого риска ВСС, своевременному проведению профилактических мероприятий и снижению ее частоты [5].

Целью исследования является верификация ассоциации с ВСС однонуклеотидных полиморфизмов rs10867772 и rs4700290, найденных в качестве возможных новых молекулярно-генетических маркеров ВСС по результатам полногеномного аллелотипирования на образцах пулированной ДНК [6]. Проведение подобного рода подтверждающего исследования является необходимым этапом выявления новых молекулярно-генетических маркеров, полученных с помощью современных методов молекулярно-генетического исследования (полноэкзомное секвенирование, полногеномное секвенирование, полногеномное ассоциативное исследование), выполняемым для исключения ложноположительных результатов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн верифицирующего исследования построен по принципу «случай–контроль». Группа ВСС (n=437, средний возраст 53,1±9,0 года, 73,5% мужчин) сформирована из архивного анонимного банка ДНК (1999–2014 гг.) внезапной смерти. В него включены образцы ДНК внезапно умерших жителей Октябрьского района г. Новосибирска, судебно-медицинское исследование которых проведено на базе ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы». ДНК выделена из ткани миокарда методом фенол-хлороформной экстракции. Группа ВСС сформирована с использованием критериев ВСС Европейского общества кардиологов [7]. Основные патолого-анатомические диагнозы включенных в нее лиц — острая коронарная недостаточность и острая недостаточность кровообращения. Из группы исключены лица с патолого-анатомическими диагнозами — инфаркт миокарда, дилатационная/гипертрофическая кардиомиопатия, а также находящиеся в состоянии алкогольного/наркотического опьянения. Контрольная группа (n=405, средний возраст 53,2±9,2 года, 70,0% мужчин) 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) (методика подбора примерно 1:1).

ДНК в банке ДНК участников проектов MONICA и HAPIEE выделена методом фенол-хлороформной экстракции из венозной крови. Генотипирование групп по однонуклеотидным полиморфизмам rs10867772, rs4700290 выполнено методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов по авторским протоколам в полиакриламидном геле.

Для генотипирования по rs10867772 использовали праймеры 5'- AAAGAACTTT-CAGTTATGCTTACCC-3' (F) и 5'- AGGGCT-GAATTATAGTAAAATTTCG-3' (R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: Трис-HCl

(рН 9,0) 75 мМ, (NH₄)₂SO₄ 20мМ, Tween-20 0,01%, 4,0 мМ MgCl₂, по 0,8 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, одну единицу активности Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск). Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 33 цикла, включающих денатурацию 95 оС 30 с, отжиг праймеров 52 оС 30 с и элонгацию 72 оС 40 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы TaqI («СибЭнзим», Новосибирск). Размер продукта амплификации 233 п.н. После проведения рестрикции при генотипе AA детектировался продукт 233 п.н., при ТТ генотипе — продукты 210 п.н. и 23 п.н., при гетерозиготном генотипе ТА — все перечисленные продукты (233, 210 и 23 п.н.).

Для генотипирования по rs4700290 использовали праймеры 5'-AAGTATAGGGTGCAGCGAA-3' (F) и 5'-GAGGTATCTTGTCTTCTCAAGCG-3' (R). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала 12,5 мкл реакционной смеси БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×) (ООО «БИОЛАБМИКС», Новосибирск), по 0,4 мМ каждого праймера, 2 мкг ДНК. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 33 цикла, включающих денатурацию 95 оС 30 с, отжиг праймеров 48 оС 30 с и элонгацию 72 оС 20 с. Рестрикцию выполняли с 10 единицами активности рестриктазы AspLE I («СибЭнзим», Новосибирск). Размер продукта амплификации 212 п.н. После проведения рестрикции при генотипе AA детектировался продукт 212 п.н., при GG генотипе — продукты 191 и 21 п.н., при гетерозиготном генотипе AG — все перечисленные продукты (212 п.н., 191 п.н., 21 п.н.).

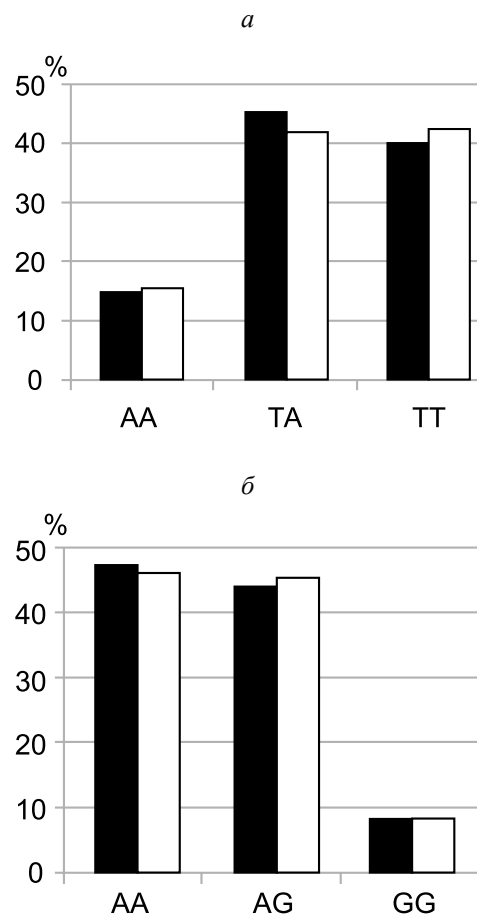
С использованием критерия χ^2 оценено соответствие частот генотипов равновесию Харди — Вайнберга в контрольной группе. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей выполнено с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц применен точный двусторонний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

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ терапии

и профилактической медицины — филиала ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» (протокол № 99 от 27.09.2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наблюдаемые частоты генотипов однонуклеотидных полиморфизмов rs10867772 и rs4700290 в контрольной группе соответствуют ожидаемым согласно равновесию Харди — Вайнберга ($\chi^2 = 3,6$ и $1,3$ соответственно). Не обнаружено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей rs10867772 и rs4700290 между группой ВСС и контрольной группой ($p > 0,05$) (рисунок а, б), в том числе при разделении групп по полу и возрасту.



Частоты генотипов и аллелей однонуклеотидных полиморфизмов rs10867772 (а) и rs4700290 (б) в группе ВСС (черные столбики) и контрольной группе (белые столбики)

ОБСУЖДЕНИЕ

Однонуклеотидные полиморфизмы rs10867772 и rs4700290 найдены как возможные новые молекулярно-генетические маркеры ВСС по результатам проведенного полногеномного аллелотипирования на образцах пулированной ДНК. В отношении ассоциации с ВСС данные полиморфизмы исследованы впервые в мире.

Полиморфизмы rs10867772 и rs4700290 локализованы в межгенных участках хромосом. Однонуклеотидный полиморфизм rs10867772 (g.84172144T>A) расположен на 9-й хромосоме. Частота его редкого аллеля А для европейской популяции составляет около 0,36 [8]. Наиболее близко к полиморфизму rs10867772 расположен ген TLE1 (TLE family member 1, transcriptional corepressor), для которого связь с сердечно-сосудистой патологией не изучалась [9], но была исследована корреляция с сахарным диабетом 2 типа, гипергликемией, инсулинорезистентностью [10, 11]. Однонуклеотидный полиморфизм rs4700290 (g.57762048A>G) локализован на 5-й хромосоме, частота его редкого аллеля G для европейской популяции составляет около 0,34 [12]. Полиморфизм расположен между генами PLK2 (polo like kinase 2) и GAPT (GRB2 binding adaptor protein, transmembrane) [13, 14]. Киназа Plk2 индуцирует апоптоз и гибель клеток в ответ на ишемическое/реперфузионное повреждение во время операций на сердце [15], выступает в качестве координатора клеточной пролиферации и дифференцировки в отношении кардиальных клеток-предшественников [16].

По результатам верифицирующего исследования не подтверждена ассоциация полиморфизмов rs10867772 и rs4700290 с ВСС. Ранее эти полиморфизмы не были исследованы в отношении ассоциации с какой-либо патологией человека, поэтому сопоставить полученные данные с результатами других исследований не представляется возможным. Нами установлено, что однонуклеотидные полиморфизмы rs10867772 и rs4700290 не являются молекулярно-генетическими маркерами ВСС, несмотря на их возможную связь с ВСС, выявленную по данным полногеномного аллелотипирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного верифицирующего исследования не подтверждена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs10867772 и rs4700290 с ВСС.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Morin D.P., Homoud M.K., Estes N.A.M. 3rd. Prediction and Prevention of sudden cardiac death. *Card. Electrophysiol. Clin.*, 2017; 9 (4): 631–638. doi: 10.1016/j.ccep.2017.07.012
2. Jazayeri M.A., Emert M.P. Sudden cardiac death: who is at risk? *Med. Clin. North Am.*, 2019; 103 (5): 913–930. doi: 10.1016/j.mcna.2019.04.006
3. Шляхто Е.В., Арутюнов Г.П., Беленков Ю.Н., Ардашев А.В. Национальные Рекомендации по определению риска и профилактике внезапной сердечной смерти. *Арх. внутр. медицины*, 2013; (4): 5–15. doi: 10.20514/2226-6704-2013-0-4-5-15
4. Skinner J.R., Winbo A., Abrams D., Vohra J., Wilde A.A. channelopathies that lead to sudden cardiac death: clinical and genetic aspects. *Heart Lung. Circ.*, 2019; 28 (1): 22–30. doi: 10.1016/j.hlc.2018.09.007
5. Stallmeyer B., Dittmann S., Schulze-Bahr E. Genetische Diagnostik zur Vermeidung des plötzlichen Herztods. *Internist (Berl.)*, 2018; 59 (8): 776–789. doi: 10.1007/s00108-018-0462-x.
6. 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. 186, № 4–2. С. 847–855.
7. Priori S.G., Blomström-Lundqvist C., Mazzanti A., Blom N., Borggrefe M., Camm J., Elliott P.M., Fitzsimons D., Hatala R., Hindricks G., Kirchhof P., Kjeldsen K., Kuck K.H., Hernandez-Madrid A., Nikolaou N., Norekvål T.M., Spaulding C., van Veldhuisen D.J. ESC Scientific Document Group. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: 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). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital

- Cardiology (AEP). Eur. Heart J., 2015; 36 (41): 2793–2867. doi: 10.1093/eurheartj/ehv316
8. rs10867772. dbSNP. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs10867772 (21 December 2020)
9. TLE1 TLE family member 1, transcriptional corepressor [Homo sapiens (human)]. dbGene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7088> (24 December 2020)
10. Huopio H., Cederberg H., Vangipurapu J., Hakkarainen H., Pääkkönen M., Kuulasmaa T., Heinonen S., Laakso M. Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. Eur. J. Endocrinol., 2013; 169 (3): 291–7. doi: 10.1530/EJE-13-0286
11. Armour S.L., Anderson S.J., Richardson S.J., Ding Y., Carey C., Lyon J., Maheshwari R.R., Al-Jahdani N., Krasnogor N., Morgan N.G., MacDonald P., Shaw J.A.M., White M.G. Reduced expression of the co-regulator TLE1 in type 2 diabetes is associated with increased islet α -cell number. Endocrinology., 2020; 161 (4): bqaa011. doi: 10.1210/endo/bqaa011
12. rs4700290. dbSNP. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4700290 (21 December 2020)
13. PLK2 polo like kinase 2 [Homo sapiens (human)]. dbGene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10769> (24 December 2020)
14. GAP2 GRB2 binding adaptor protein, transmembrane [Homo sapiens (human)]. dbGene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/202309> (24 December 2020)
15. Zhao D., Shun E., Ling F., Liu Q., Warsi A., Wang B., Zhou Q., Zhu C., Zheng H., Liu K., Zheng X. Plk2 Regulated by miR-128 induces ischemia-reperfusion injury in cardiac cells. Mol. Ther. Nucleic Acids., 2020; 19: 458–467. doi: 10.1016/j.omtn.2019.11.029
16. Mochizuki M., Lorenz V., Ivanek R., Della Verde G., Gaudiello E., Marsano A., Pfister O., Kuster G.M. Polo-like kinase 2 is dynamically regulated to coordinate proliferation and early lineage specification downstream of yes-associated protein 1 in cardiac progenitor cells. J. Am. Heart Assoc., 2017; 6 (10): e005920. doi: 10.1161/JAHA.117.005920

ASSOCIATION OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS RS10867772, RS4700290 WITH SUDDEN CARDIAC DEATH

A.A. Ivanova¹, S.K. Malyutina¹, V.P. Novoselov², I.A. Rodina³, O.V. Khamovich³, V.N. Maximov¹

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

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia 630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

³ 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 rs10867772 and rs4700290, 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 rs10867772 and rs4700290 between groups, even in separating in sex and age ($p > 0.05$). Conclusion. Single nucleotide polymorphism rs10867772 and rs4700290 are not associated with SCD.

Keywords: sudden cardiac death, single nucleotide polymorphism, rs10867772, rs4700290, genome-wide allelotyping.

Статья поступила 25.12.20
Принята к печати 17.02.21