

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI 10.52727/2078-256X-2021-17-4-6-10

Ассоциация метилирования генов *F2RL3* и *CDKN2A* с внезапной сердечной смертью**А.А. Иванова¹, А.А. Гуражева¹, С.В. Максимова², С.К. Малютина¹,
В.П. Новоселов³, В.Н. Максимов¹**

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
630089, Россия, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный просп., 52

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы»
630087, Россия, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 134

Цель исследования – оценить ассоциацию метилирования генов *F2RL3* и *CDKN2A* с внезапной сердечной смертью (ВСС). **Материал и методы.** Дизайн исследования – «случай-контроль». В группу ВСС включены 150 внезапно умерших мужчин (средний возраст $46,7 \pm 9,2$ года) с основными патолого-анатомическими диагнозами «острая недостаточность кровообращения», «острая коронарная недостаточность», что соответствует критериям ВСС Европейского общества кардиологов. В контрольную группу включены 150 внезапно умерших мужчин, но не вследствие сердечно-сосудистой патологии (средний возраст $42,6 \pm 1,2$ года). ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда в обеих группах. Оценка статуса метилирования генов *F2RL3* (19:16890405-16890606, GRCh38.p13) и *CDKN2A* (9:21974726-21974877, GRCh38.p13) проведена методом метил-специфической полимеразной цепной реакции. **Результаты.** В группе ВСС у 26 (17,3 %) человек ген *F2RL3* полностью метилирован (ММ), у 9 (6,0 %) полностью неметилирован (UU), у 115 (76,7 %) мужчин обнаружен как метилированный, так и неметилированный ген *F2RL3* (MU). В контрольной группе таких людей обнаружено соответственно 24 (16 %), 8 (5,3 %) и 118 (78,7 %). При сравнении групп статистически значимых различий по статусу метилирования гена *F2RL3* не выявлено ($p > 0,05$). У всех обследованных в обеих группах ген *CDKN2A* полностью неметилирован. **Заключение.** Метилирование генов *F2RL3*, *CDKN2A* не ассоциировано с внезапной сердечной смертью. **Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках проекта № 19-415-543001.

Ключевые слова: внезапная сердечная смерть, метилирование, *F2RL3*, *CDKN2A*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Иванова А.А., e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Для цитирования: Иванова А.А., Гуражева А.А., Максимова С.В., Малютина С.К., Новоселов В.П., Максимов В.Н. Ассоциация метилирования генов *F2RL3* и *CDKN2A* с внезапной сердечной смертью. *Атеросклероз*, 2021; 17 (4): 6–10. doi: 10.52727/2078-256X-2021-17-4-6-10

Methylation of *F2RL3*, *CDKN2A* genes and sudden cardiac death

A.A. Ivanova¹, A.A. Gurazheva¹, S.V. Maksimova², S.K. Malyutina¹,
V.P. Novoselov³, V.N. Maksimov¹

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute
of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

² Novosibirsk State Medical University
630091, Russia, Novosibirsk, Krasnyj av., 52

³ Novosibirsk Regional Office of Forensic Medical Examination
630087, Russia, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 134

The aim of the study was to evaluate the association of methylation of the *F2RL3*, *CDKN2A* gene with sudden cardiac death (SCD). **Material and methods.** Case-control study design. The SCD group included 150 deceased men (mean age 46.7 ± 9.2 years) with the main pathological diagnoses of acute circulatory failure, acute coronary insufficiency, which meets the SCD criteria of the European Society of Cardiology. The control group included 150 men who died suddenly, but not due to cardiovascular pathology (mean age 42.6 ± 1.2 years). DNA was isolated by phenol-chloroform extraction from myocardial tissue in both groups. The methylation status of the *F2RL3* gene (19: 16890405-16890606, GRCh38.p13) and the *CDKN2A* gene (9: 21974726-21974877, GRCh38.p13) was assessed by methyl-specific polymerase chain reaction. **Results.** In the SCD group, 17.3 % (26/150) had the *F2RL3* gene completely methylated (MM); in 6.0 % (9/150) it is completely unmethylated (UU); 76.7 % (115/150) had both methylated and unmethylated *F2RL3* (MU) gene. In the control group, 16 % (24/150) had the *F2RL3* gene completely methylated (MM); in 5.3 % (8/150), it is completely unmethylated (UU); 78.7 % (118/150) had both methylated and unmethylated *F2RL3* (MU) gene. When comparing the groups, there were no statistically significant differences in the methylation status of the *F2RL3* gene between the groups ($p > 0.05$). In all subjects in the SCD group and the control group, the *CDKN2A* gene is completely unmethylated. **Conclusions.** Methylation of genes *F2RL3*, *CDKN2A* is not associated with sudden cardiac death. **Acknowledgments.** The reported study was funded by RFBR and Novosibirsk region according to the research project N 19-415-543001.

Keywords: sudden cardiac death, methylation, *F2RL3*, *CDKN2A*.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence: Ivanova A.A., e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Citation: Ivanova A.A., Gurazheva A.A., Maksimova S.V., Malyutina S.K., Novoselov V.P., Maksimov V.N. Methylation of *F2RL3*, *CDKN2A* genes and sudden cardiac death. *Atherosclerosis*, 2021; 17 (4): 6–10. [In Russian]. doi: 10.52727/2078-256X-2021-17-4-6-10

Россия входит в список стран, лидирующих по смертности населения от сердечно-сосудистых заболеваний, при этом около половины умерших погибают внезапно. На долю внезапной сердечной смерти (ВСС) приходится 15–20 % смертей от всех причин в мире [1]. Во взрослой популяции кардиомиопатии, каналопатии и ишемическая болезнь сердца (ИБС) являются главными предрасполагающими к ВСС заболеваниями. По данным последних эпидемиологических исследований, в европейских странах ИБС диагностируется в 75 % всех случаев ВСС [2, 3]. ВСС – мультифакториальная нозология, вклад в развитие которой вносят в том числе генетические и эпигенетические факторы. К последним относятся факторы, влияющие на

экспрессию генов без изменения нуклеотидной последовательности ДНК (метилование ДНК, модификация гистонов, изменения микроРНК) [4]. ИБС является наиболее изученной сердечно-сосудистой нозологией в плане метилирования ДНК, в то же время исследования данного процесса при ВСС единичны. В ряде исследований показано, что метилирование генов *F2RL3* и *CDKN2A* ассоциировано с риском ИБС, которая является наиболее частой причиной развития ВСС [4]. Мы предположили, что метилирование генов *F2RL3* и *CDKN2A* также может быть связано с риском ВСС. Таким образом, целью исследования является оценка ассоциации метилирования генов *F2RL3* и *CDKN2A* с ВСС.

Материал и методы

Дизайн исследования — «случай-контроль». В группу ВСС включены 150 внезапно умерших мужчин (средний возраст $46,7 \pm 9,2$ года) с основными патолого-анатомическими диагнозами «острая недостаточность кровообращения», «острая коронарная недостаточность», что соответствует критериям ВСС Европейского общества кардиологов. В контрольную группу включены 150 внезапно умерших мужчин, но не вследствие сердечно-сосудистой патологии (средний возраст $42,6 \pm 1,2$ года). ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда в обеих группах. Оценка статуса метилирования CpG-островков генов *F2RL3* (19:16890405-16890606, GRCh38.p13) и *CDKN2A* (9:21974726-21974877, GRCh38.p13) проведена методом метил-специфической полимеразной цепной реакции на бисульфит-конвертированной ДНК. Конверсия образцов ДНК выполнена с использованием наборов EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Метилспецифическая ПЦР проведена в двух пробирках: с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю, с применением скорректированных методик, описанных в исследовании В. Indumathi et al. [4], с последующим анализом фрагментов в 5%-м полиакриламидном геле с окрашиванием бромистым этидием. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл для оценки статуса метилирования гена *F2RL3* в случае праймеров к метилированной последовательности включала: Трис-НCl (рН 9,0) 75 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 мМ, Tween-20 0,01 %, 1,7 мМ MgCl_2 , по 0,52 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности Hot Start Taq ДНК-полимеразы. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл для оценки статуса метилирования гена *F2RL3* в случае праймеров к неметилированной последовательности включала: Трис-НCl (рН 9,0) 75 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 мМ, Tween-20 0,01 %, 2,5 мМ MgCl_2 , по 0,52 мМ каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности Hot Start Taq ДНК-полимеразы. Температурный режим ПЦР в случае праймеров к метилированной, неметилированной последовательности: 1 цикл 95 °С 5 минут, 33 цикла: 95 °С 30 с, 62 °С 30 с, 72 °С 30 с, 1 цикл 72 °С 7 минут.

Смесь для ПЦР объемом 25 мкл для оценки статуса метилирования промотора гена *CDKN2A* в случае праймеров к метилированной, неметилированной последовательности включала: Трис-НCl (рН 9,0) 75 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 мМ, Tween-20 0,01 %, 1,5 мМ MgCl_2 , по 0,4 мМ

каждого праймера, 0,2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу активности Hot Start Taq ДНК-полимеразы. Температурный режим ПЦР в случае праймеров к метилированной последовательности: 1 цикл 95 °С 5 минут, 33 цикла: 95 °С 30 с, 58 °С 30 с, 72 °С 15 с, 1 цикл 72 °С 7 минут. Температурный режим ПЦР в случае праймеров к неметилированной последовательности: 1 цикл 95 °С 5 минут, 33 цикла: 95 °С 30 с, 62 °С 30 с, 72 °С 15 с, 1 цикл 72 °С 7 минут. Для оценки работоспособности систем и эффективности конверсии ДНК использованы наборы контролей (метилированной и неметилированной ДНК) Human Methylated & Non-methylated DNA Set (Zymo Research).

Полученные результаты статистически обработаны с применением критерия Пирсона, критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Результаты

В группе ВСС у 26 (17,3 %) человек ген *F2RL3* полностью метилирован (ММ), у 9 (6,0 %) полностью неметилирован (УУ), у 115 (76,7 %) мужчин обнаружен как метилированный, так и неметилированный ген *F2RL3* (МУ). В контрольной группе таких людей обнаружено соответственно 24 (16 %), 8 (5,3 %) и 118 (78,7 %). При сравнении групп статистически значимых различий по статусу метилирования гена *F2RL3* не выявлено ($p > 0,05$). У всех обследованных в обеих группах ген *CDKN2A* полностью неметилирован.

Обсуждение

Согласно данным мировой научной литературы, исследований по изучению метилирования гена *F2RL3* при ВСС ранее не проводилось. Ген *F2RL3* (F2R like thrombin or trypsin receptor 3, 19p13.11) кодирует рецептор, который играет роль в процессе свертывания крови, воспалении и реакции на боль. В исследованиях на базе проектов KAROLA, ESTHER показана ассоциация метилирования гена *F2RL3* со смертностью у лиц с ИБС, которая является причиной ВСС в почти в 80 % случаев [5, 6]. 1206 участников исследования KAROLA (лица, перенесшие инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, операцию на коронарных сосудах) находились под восьмилетним наблюдением, за это время произошло 64 кардиоваскулярных смерти и 50 смертей от других причин. У обследованных из наименьшего квартиля в сравнении с лицами из наибольшего квартиля по метилирова-

нию гена *F2RL3* скорректированное отношение шансов (ОШ) для кардиоваскулярной смерти составляет 2,32, однако 95%-й доверительный интервал (95 % ДИ) не является статистически значимым (0,97–5,58), тогда как ОШ и 95 % ДИ для некардиоваскулярной смерти и смерти от всех причин остаются достоверными [5]. В более позднем исследовании метилирования гена *F2RL3* (3588 человек, наблюдение в течение 10,1 года), проведенном на базе проекта ESTHER, ОШ для сердечно-сосудистой смерти составило 2,45 с достоверным 95 % ДИ (1,28–4,68), найденная ассоциация оказалась более значимой для мужчин, чем для женщин.

В ряде исследований показано также, что метилирование гена *F2RL3* связано с курением, которое является фактором риска кардиоваскулярных событий [6]. В.F. Gao et al. установили, что метилирование гена *F2RL3* ассоциировано с артериальной гипертензией и смертностью при ИБС; в исследование включено 30 человек с ИБС и артериальной гипертензией и 30 человек с ИБС без артериальной гипертензии, период наблюдения составил 8 лет, конечными точками были инсульт, инфаркт миокарда, сердечно-сосудистая смерть, несердечная смерть [7]. Кроме того, в недавнем исследовании повышение экспрессии гена *F2RL3* было ассоциировано с ИБС [4]. Таким образом, закономерно предположить, что метилирование гена *F2RL3*, имеющего отношение к процессу коагуляции, может быть связано с ВСС, так как по результатам предыдущих исследований метилирование гена оказалось ассоциированным с ИБС (основной причиной ВСС у взрослого населения), кардиоваскулярной смертью, курением, которое также является фактором риска и ВСС. Однако данная гипотеза не подтвердилась: по результатам проведенного исследования метилирование гена *F2RL3* не ассоциировано с ВСС.

Ген *CDKN2A* (cyclin dependent kinase inhibitor 2A, 9p21.3) реализуется в виде нескольких транскриптов, как минимум три из которых кодируют разные белки (два из них функционируют как ингибиторы киназы CDK4, один — как стабилизатор для супрессора опухолей p53), играющие роль в контроле клеточного цикла. Ген известен *CDKN2A* как супрессор опухолей. Экспрессируется во многих тканях, наиболее активно в жировой ткани, надпочечниках, селезенке, желудке и яичках [8]. Локус 9p21, которому принадлежит ген *CDKN2A*, по данным нескольких исследований содержит ряд вариантов, ассоциированных с риском ИБС. «Горячие» варианты локуса локализованы вблизи генов *CDKN2B*, *CDKN2A*, 3'-конца *CDKN2BAS* и в их пределах.

Делеция локуса 9p21 приводит к снижению экспрессии *CDKN2A/B* и проявляется чаще всего в менее стабильных атеросклеротических бляшках [9], показана ассоциация полиморфизмов локуса с ВСС (rs1333049, rs10757278) [10, 11]. Установлено, что гипометилирование гена *CDKN2A* ассоциировано с повышенным риском ИБС (ОШ = 1,79, 95 % ДИ = 1,22–2,63) [4]. Таким образом, метилирование гена ассоциировано с риском ИБС, а варианты, локализованные в пределах гена, — с риском ИБС, ВСС, поэтому мы предположили, что статус метилирования *CDKN2A* может быть связан с ВСС. Однако у всех лиц, включенных в настоящее исследование, ген оказался полностью неметилированным. При получении однородного результата по статусу метилирования гена *CDKN2A* можно было бы заподозрить ошибку в методике проведения метил-специфической ПЦР, однако корректность работы системы ПЦР неоднократно успешно проверена с использованием контрольной ДНК. Кроме того, один и тот же образец конвертированной ДНК использовался для оценки метилирования как гена *CDKN2A*, так и гена *F2RL3*, что доказывает отсутствие ошибок в конверсии ДНК.

Исследований по оценке статуса метилирования *CDKN2A* в ткани миокарда нами не найдено. Однако интересно, что, например, в мета-анализе исследований метилирования гена при раке пищевода в большинстве исследований в контрольной группе (без рака) ген *CDKN2A* также не был метилирован у большинства участников (материалом для исследования служила кровь или ткань пищевода) [12]. В исследовании «случай-контроль» в Китае не выявлено ассоциации метилирования гена *CDKN2A* с ИБС, доля образцов с метилированным геном *CDKN2A* составляла 15–20 % [13]. Таким образом, отсутствие гена в *CDKN2A* в метилированном состоянии в настоящем исследовании может быть связано с небольшими размерами исследуемых групп, расовыми особенностями изучаемых лиц, особенностями метилирования гена в ткани миокарда.

Ограничениями метода метил-специфической ПЦР является его меньшая чувствительность по сравнению с пиросеквенированием, а также невозможность оценить статус метилирования за пределами участков отжига праймеров.

Закключение

Несмотря на связь метилирования генов *F2RL3* и *CDKN2A* с риском ИБС (*F2RL3*, *CDKN2A*), смертностью при ИБС (*F2RL3*), ассоциацию полиморфизмов, локализованных в

пределах гена (*CDKN2A*) с риском ВСС, согласно результатам настоящего исследования метилирование гена *F2RL3*, *CDKN2A* не ассоциировано с ВСС.

Литература

1. Yildiz A., Gьrpinar S.S., Yađci F.E., Zayli E., Baydar 3.L. Retrospective analysis of sudden cardiac deaths in a 10-year autopsy series in the city of Isparta in Turkey. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 2020; 41 (4): 263–268. doi: 10.1097/PAF.0000000000000593
2. Mizusawa Y. Recent advances in genetic testing and counseling for inherited arrhythmias. *J. Arrhythm.*, 2016; 32 (5): 389–397.
3. Rai V., Agrawal D.K. Role of risk stratification and genetics in sudden cardiac death. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2017; 95 (3): 225–238. doi: 10.1139/cjpp-2016-0457
4. Indumathi B., Oruganti S.S., Naushad S.M., Kutala V.K. Probing the epigenetic signatures in subjects with coronary artery disease. *Mol. Biol. Rep.*, 2020; 47 (9): 6693–6703. doi: 10.1007/s11033-020-05723-w
5. Breitling L.P., Salzmann K., Rothenbacher D., Burwinkel B., Brenner H. Smoking, *F2RL3* methylation, and prognosis in stable coronary heart disease. *Eur. Heart J.*, 2012; 33 (22): 2841–2848. doi: 10.1093/eurheartj/ehs091
6. Zhang Y., Yang R., Burwinkel B., Breitling L.P., Holleczer B., Schuttler B., Brenner H. *F2RL3* methylation in blood DNA is a strong predictor of mortality. *Int. J. Epidemiol.*, 2014; 43 (4): 1215–1225. doi: 10.1093/ije/dyu006
7. Gao B.F., Shen Z.C., Bian W.S., Wu S.X., Kang Z.X., Gao Y. Correlation of hypertension and *F2RL3* gene methylation with Prognosis of coronary heart disease. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 2018; 32 (6): 1539–1544.
8. *CDKN2A* cyclin dependent kinase inhibitor 2A [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029>
9. Tajbakhsh A., Khorrami M.S., Hassanian S.M., Aghasizade M., Pashar A., Maftouh M., Tabatabai E., Parizadeh S.M., Fazeli M., Ferns G.A., Ghayour-Mobarhan M., Avan A. The 9p21 locus and its potential role in atherosclerosis susceptibility; molecular mechanisms and clinical implications. *Curr. Pharm. Des.*, 2016; 22 (37): 5730–5737. doi: 10.2174/1381612822666160628082453
10. Ivanova A.A., Maksimov V.N., Orlov P.S., Ivanoshchuk D.E., Savchenko S.V., Voevoda M.I. Association of the genetic markers for myocardial infarction with sudden cardiac death. *Indian Heart J.*, 2017; 69 (Suppl 1): S8–S11. doi: 10.1016/j.ihj.2016.07.016
11. Buysschaert I., Carruthers K.F., Dunbar D.R., Peuteman G., Rietzschel E., Belmans A., Hedley A., De Meyer T., Budaj A., Van de Werf F., Lambrechts D., Fox K.A. A variant at chromosome 9p21 is associated with recurrent myocardial infarction and cardiac death after acute coronary syndrome: the GRACE Genetics Study. *Eur. Heart J.*, 2010; 31 (9): 1132–1141. doi: 10.1093/eurheartj/ehq053
12. Zhou C., Li J., Li Q. *CDKN2A* methylation in esophageal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.*, 2017; 8 (30): 50071–50083. doi: 10.18632/oncotarget.18412
13. Zhong J., Chen X., Ye H., Wu N., Chen X., Duan S. *CDKN2A* and *CDKN2B* methylation in coronary heart disease cases and controls. *Exp. Ther. Med.*, 2017; 14 (6): 6093–6098. doi: 10.3892/etm.2017.5310

Сведения об авторах:

Анастасия Андреевна Иванова, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Анна Александровна Гуражева, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: annapalnal@mail.ru

Софья Владимировна Максимова, студентка 5-го курса педиатрического факультета, e-mail: 99naruto@mail.ru

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

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

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

Information about the authors:

Anastasiya A. Ivanova, candidate of medical sciences, senior researcher at the laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru

Anna A. Gurazheva, junior researcher, laboratory of molecular genetic research of therapeutic diseases, e-mail: annapalnal@mail.ru

Sofya V. Maksimova, 5th year student of the Faculty of Pediatrics, e-mail: 99naruto@mail.ru

Sofya K. Malyutina, doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of etiopathogenesis and clinic of internal medicine, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Vladimir P. Novoselov, doctor of medical sciences, professor, head, e-mail: nokbsme@nso.ru

Vladimir N. Maksimov, doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

Статья поступила 18.10.2021

Принята к печати 12.11.2021

Received 18.10.2021

Accepted 12.11.2021

