

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *HMGR* И *SLCO1B1* НА РАЗВИТИЕ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ, КАК ФАКТОРА РИСКА ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА, И ЛЕЧЕНИЕ СИМВАСТАТИНОМ

Покровский А.А.^{1,2}, Оседко А.В.¹, Котловский М.Ю.¹, Оседко О.Я.¹, Искра И.П.¹, Якименко А.В.¹, Курдюк Е.В.¹, Якимович И.Ю.³, Аксютин Н.В.¹, Титова Н.М.², Котловский Ю.В.¹, Дыгай А.М.⁴

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка д. 1), e-mail: 13th_Apostol@mail.ru

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, д. 79)

³Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия (634050, г. Томск, Московский тракт, д.2)

⁴Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск, Россия (634028, г. Томск, проспект Ленина, д.3)

Генетические полиморфизмы могут быть ассоциированы с риском развития мультифакторных и моногенных заболеваний, а также оказывать влияние на эффективность лекарственной терапии. Цель исследования - установить влияние полиморфизма rs3846663 гена *HMGR* на развитие гиперхолестеринемии и полиморфизма с.521T>C гена *SLCO1B1* на эффективность достижения целевого уровня липидов в сыворотке крови при лечении симвастатином. Для идентификации однонуклеотидного полиморфизма использовали времяпролетный MALDI-TOF масс-спектрометр. Было обнаружено статистически достоверное различие в уровне общего холестерина в зависимости от наличия полиморфизма rs3846663. У носителей аллеля Т уровень холестерина был выше на 0,58 ммоль/л. Наличие мутантного аллеля полиморфизма с.521T>C ассоциировано с негативным влиянием на достижение целевых уровней липидов в сыворотке крови при терапии симвастатином. Эффективность достижения целевого уровня ОХ и ХС ЛПНП у носителей была выше на 39,2% и 22,9% соответственно.

Ключевые слова: *SLCO1B1*, *HMGR*, полиморфизм, симвастатин, ишемическая болезнь сердца, гиперхолестеринемия, rs3846663

INFLUENCE OF *HMGR* AND *SLCO1B1* GENES POLYMORPHISM ON DEVELOPMENT OF HYPERCHOLESTEROLEMIA, A RISK FACTOR OF CORONARY HEART DISEASE, AND TREATMENT WITH SIMVASTATIN

Pokrovskiy A.A.^{1,2}, Osedko A.V.¹, Kotlovskiy M.Y.¹, Osedko O.Y.¹, Iskra I.P.¹, Yakimenko A.V.¹, Kurdoyak E.V.¹, Yakimovich I.Y.³, Aksyutina N.V.¹, Titova N.M.², Kotlovskiy Y.V.¹, Dygai A.M.⁴

¹Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia (660022, Krasnoyarsk City, Partizana Zheleznyaka St., 1), e-mail: 13th_Apostol@mail.ru

²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia (660041, Krasnoyarsk City, Svobodny av., 79)

³Siberian State Medical University, Tomsk, Russia (634050, Tomsk city, Moscow tract, 2)

⁴Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D.Goldberg, Tomsk, Russia (634028, Tomsk city, Lenin av., 3)

Genetic polymorphisms may be associated with the risk of developing multifactorial and monogenic diseases, as well as have an impact on the effectiveness of drug therapy. The purpose of the study - to establish the effect of the polymorphism rs3846663 of *HMGR* gene on the development of hypercholesterolemia and research the influence of polymorphism с.521T>C of *SLCO1B1* gene on effectiveness of achieving the target level of serum lipids in the treatment with simvastatin. MALDI-TOF mass spectrometer was used to identify a single nucleotide polymorphism. There was a statistically significant difference in the level of total cholesterol of polymorphism rs3846663. T allele carriers had higher cholesterol level by 0.58 mmol / L. The presence of the mutant allele of

polymorphism c.521T> C is associated with a negative impact on the achievement of target levels of lipids in the serum during therapy with simvastatin. The effectiveness of achieving the target level of total cholesterol and low-density lipoprotein from the non-carriers was higher by 39.2% and 22.9% respectively.

Keywords: *SLCO1B1*, *HMGR*, polymorphism, simvastatin, coronary heart disease, hypercholesterolemia, rs3846663

Во многих экономически развитых странах за последние десятилетия удалось существенно снизить уровень смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), что связано как с внедрением современных методов ранней диагностики и лечения болезней системы кровообращения, так и с усилением профилактических мероприятий в здравоохранении. Тем не менее, проблема лечения ССЗ в настоящее время полностью не решена и неизменно занимает лидирующие позиции в структуре общих причин смертности [4, 9]. В России из всех причин смерти от сердечно-сосудистых заболеваний около 56% приходится на ишемическую болезнь сердца (ИБС), клинические проявления которой зависят от степени атеросклеротического поражения коронарных артерий [5].

На современном этапе развития медицины основным классом липидснижающих препаратов, использующихся при лечении ИБС, являются статины, имеющие существенную доказательную базу [2]. Симвастатин – один из наиболее хорошо изученных статинов, несомненными преимуществами которого являются высокая эффективность, безопасность и доступность [3]. Механизм действия данного препарата связан с ингибированием активности 3-гидрокси-3-метил-глутарил коэнзим А – редуктазы (ГМК-КоА – редуктазы) – лимитирующего фермента начальной стадии биосинтеза холестерина [6]. Наличие полиморфизмов в гене *HMGR*, который кодирует ГМК-КоА – редуктазу, может способствовать возникновению гиперхолестеринемии, которая является фактором риска развития ИБС и атеросклероза [7].

Терапия симвастатином также может быть подвержена влиянию генетических факторов. Белок-переносчик OATP1B1, который кодируется геном *SLCO1B1*, располагается на синусоидальной мембране гепатоцитов и участвует в транспорте статина в клетку. Niemi с соавторами в обзоре 2011 года указывает, что некоторые полиморфные маркеры гена *SLCO1B1* влияют на фармакокинетику симвастатина и способны увеличить вероятность возникновения побочных эффектов [8].

В настоящее время полиморфизм rs3846663 гена *HMGR* мало изучен, а его влияние на функционирование ГМК-КоА – редуктазы не доказано и нуждается в дополнительных исследованиях. Полиморфизм c.521T>C гена *SLCO1B1* наоборот изучен довольно подробно, но большинство работ затрагивает исследование его влияния на фармакокинетику различных лекарственных средств, а также возникновение побочных эффектов.

Таким образом, цель нашей работы – исследовать влияние полиморфизма rs3846663 гена *HMGR* на развитие гиперхолестеринемии и полиморфизма c.521T>C (rs4149056) гена

SLCO1B1 на эффективность достижения целевого уровня липидов в сыворотке крови при лечении симвастатином.

Материалы и методы

Для исследования влияния полиморфизма rs3846663 гена *HMGR* была сформирована группа условно здоровых лиц, состоящая из 173 человек (105 женщин и 68 мужчин), разделенных на носителей и неносителей мутантного Т-аллеля. Неносителей было 45 человек, а носителей - 128 человек. Средний возраст неносителей составлял $50,2 \pm 0,9$, носителей – $49,8 \pm 0,5$ лет. Критериями включения для данной группы являлись: возраст – от 40 до 65 лет, пол – мужчины и женщины. Критериями исключения являлись: наличие ИБС, острые заболевания, хронические заболевания на стадии обострения, наличие сахарного диабета, нарушения липидного обмена, тяжелые нарушения функции печени и почек, артериальная гипертензия.

Для исследования влияния полиморфизма с.521Т>С 52 пациента (31 женщина и 21 мужчина) были разделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия С-аллеля в гене *SLCO1B1*. С-аллель встречается в двух генотипах: СС и ТС, число пациентов с этими генотипами в нашем исследовании составило 17. Носителями ТТ генотипа было 35 человек. Средний возраст носителей С-аллеля составлял $65,06 \pm 8,46$ лет, неносителей – $65,2 \pm 10,3$ лет. Нами также учитывался вес пациентов. Средний вес носителей генотипа ТТ составлял $82,02 \pm 14,2$ кг, а носителей генотипов ТС и СС – $79,34 \pm 14,68$ кг. Критериями включения для пациентов являлись: возраст - от 40 лет, пол – мужчины и женщины, подтвержденный диагноз ИБС (стенокардия напряжения 1-2 функционального класса), наличие дислипидемии (Ia, Ib, III, IV типов), неэффективность гиполлипидемической диеты. Критериями исключения пациентов из исследования являлись: стенокардия напряжения 3-4 функционального класса; инфаркт миокарда, прогрессирующая стенокардия, тромбоэмболия легочной артерии менее чем за 6 месяцев до обследования, острое нарушение мозгового кровообращения, тяжелые нарушения функции печени и почек, острые и хронические заболевания в стадии обострения, гипотиреозидизм, порфирия, миопатия, фракция выброса > 60%, повышенная активность ферментов аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы более 3 верхних пределов норм и злоупотребление алкоголем. Пациентам назначался симвастатин («СимваГЕКСАЛ®», Германия) в дозировке 40 мг/сутки. За день до начала приема симвастатина оценивался уровень общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ) и холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП). Средний уровень ОХ у носителей и неносителей С-аллеля до лечения составлял $5,68$ ммоль/л и $5,71$ ммоль/л, ХС ЛПНП – $3,72$ ммоль/л и $3,9$ ммоль/л, ТГ – $1,58$ ммоль/л и $1,52$ ммоль/л соответственно. Повторная оценка указанных показателей проводилась через 1 месяц после

приема препарата. Достижение пациентами целевого уровня липидов диагностировали согласно V пересмотру российских рекомендаций по профилактике и лечению атеросклероза за 2012 год [1].

Для генетического анализа использовался образец ДНК, выделенный из венозной крови пациента при помощи стандартного фенол-хлороформного метода. Для проведения последующих этапов молекулярно-генетических исследований использовался специальный набор для идентификации однонуклеотидных полиморфизмов (ООО НПФ «ЛИТЕХ»). Согласно инструкции последовательно проводили реакции амплификации, дефосфорилирования и минисеквенирования для дальнейшей идентификации полиморфизмов на времяпролетном MALDI-TOF масс-спектрометре.

Для проведения исследования было получено разрешение локального этического комитета при ГБОУ ВПО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также добровольное информированное согласие пациентов на участие в исследовании.

Сравнение среднего уровня общего холестерина проводилось по критерию Стьюдента для независимых выборок. Нормальность оценивалась по критерию Колмагорова-Смирнова. Оценка зависимости признаков проводилась в таблицах сопряженности. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали по критерию хи-квадрат с помощью онлайн калькулятора (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Частоты генотипов при $\chi^2 < 3.84$ соответствуют равновесию Харди-Вайнберга.

Результаты и обсуждение

В исследуемых группах пациентов наблюдаемые частоты генотипов обоих полиморфизмов соответствовали ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга (табл. 1).

Таблица 1

Соответствие частот аллелей полиморфизма *c.521T>C* гена *SLCO1B1* и *rs3846663* гена *HMGR* равновесию Харди-Вайнберга.

Ген	Генотип	Наблюдаемая частота, %	Ожидаемая частота, %	Частота аллеля		χ^2 (df=2)	P
				T	C		
SLCO1B1	TT	64,3	63,6	0,8	0,2	0,07	0,79
	TC	31	32,3				
	CC	4,7	4,1				
HMGR	CC	26,30	27,3	0,5	0,4	0,5	0,4

	СТ	53,20	49,8			
	ТТ	20,40	22,7			

Примечание: $df = 2$ — степень свободы для анализа частот генотипов, χ^2 – хи-квадрат, P – уровень значимости различий (уровень соответствия равновесию Харди-Вайнберга).

Средний уровень общего холестерина у носителей генотипа СС составил $5,29 \pm 0,14$ ммоль/л, что значительно ниже уровня холестерина при генотипах СТ+ТТ - $5,85 \pm 0,11$ ммоль/л. Различие составляло $0,56$ ммоль/л (9,6%) и являлось статистически достоверным для уровня значимости $p < 0,05$ (табл.2).

Таблица 2

Средний уровень общего холестерина по генотипам

Показатель	Генотип	Количество наблюдений	$M \pm m$ (ммоль/л)	p
Общий холестерин	СС	45	$5,29 \pm 0,14$	0,007
	СТ+ТТ	128	$5,85 \pm 0,11$	

Примечание: $M \pm m$ – средний уровень общего холестерина \pm стандартная ошибка среднего, P – уровень значимости различий.

Для получения информации об относительном риске проводили сопряжение пациентов с нормальным уровнем холестерина ($ОХ < 4$ ммоль/л) и повышенным. Коэффициент корреляции Спирмена равен $0,193$ со значимостью $0,011$, что указывает на существовании зависимости между носительством Т-аллеля и уровнем холестерина и, соответственно, на предрасположенность лиц с генотипами СТ и ТТ к повышенному уровню холестерина (табл.3).

Таблица 3

Таблица сопряженности уровней общего холестерина и генотипов

Полиморфизм RS3846663			Генотипы	
			СС	СТ+ТТ
Общий холестерин	Нормальный уровень	кол-во	14	18
		%	31,10%	14,10%
	Повышенный уровень	кол-во	31	110
		%	68,90%	85,90%
Общее количество пациентов			45	128
χ^2			0,011	

Примечание: χ^2 - хи-квадрат Пирсона

Расчет относительного риска показал, что вероятность повышенного уровня общего холестерина у носителей Т-аллеля в 1,24 раза выше (95%С.И. 1.01-1.53), чем у людей с гомозиготным генотипом СС. При этом отношение шансов равно 2,76 (95%С.И. 1,23-6,16).

Параллельно первому исследованию проводили анализ эффективности лечения симвастатином, который показал, что целевого значения ОХ после месяца терапии достигло 45,5% неносителей и 6,3% носителей С-аллеля. Таким образом, данный показатель был выше у пациентов с генотипом ТТ на 39,2% (P=0,007). Целевого уровня ХС ЛПНП достигло 22,9% неносителей и ни одного носителя С-аллеля (P=0,039). Та же тенденция прослеживалась и для целевого уровня ТГ, где пациенты с генотипом ТТ достигли заданного значения в 53,8% случаев, а пациенты с генотипами ТС и СС – в 28,6%, однако полученные данные были статистически незначимы (рис.1). Согласно проведенному исследованию, целевого уровня липидов достигло значительно большее число неносителей, чем носителей С-аллеля, что говорит о негативном влиянии полиморфизма на эффективность лечения симвастатином.

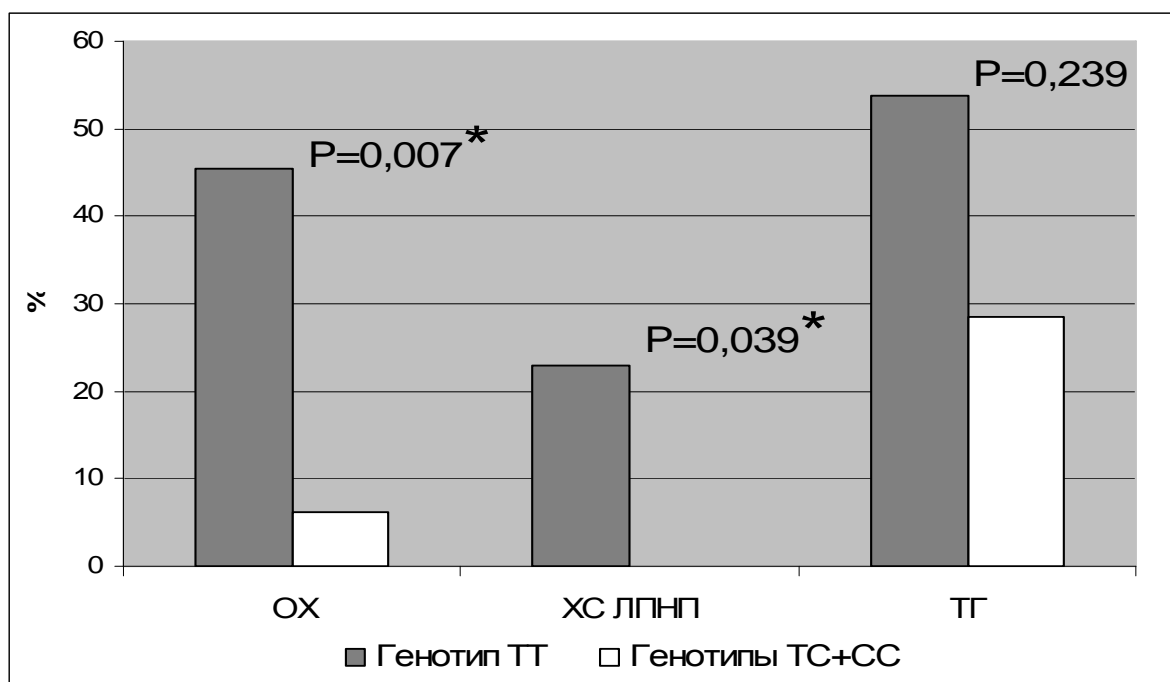


Рис. 1. Достижение целевого уровня ОХ, ХС ЛПНП и ТГ (в %) при лечении симвастатином в дозировке 40 мг у пациентов с различными аллельными вариантами гена *SLCO1B1*. P – уровень значимости, ОХ – общий холестерин, ХС ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности, ТГ – триглицериды.

Заключение

Поиск генов-кандидатов ассоциированных с развитием заболеваний, а также оценка индивидуального генетического риска с дальнейшей разработкой подхода к профилактике и лечению, является одним из наиболее перспективных направлений в современной

медицинской генетике. В рамках настоящего исследования была изучена связь полиморфизма rs3846663 гена *HMGCR* с уровнем общего холестерина и полиморфизма с.521Т>С гена *SLCO1B1* с достижением целевого уровня липидов при лечении симвастатином.

Данные, полученные в ходе исследования, позволяют сделать вывод о прогностической значимости полиморфизма rs3846663, так как наличие мутантного Т-аллеля ассоциировано с повышенным уровнем холестерина. Различие между носителями и неносителями по общему холестерину составило 0,56 ммоль/л (9,6%). Вероятность повышенного уровня холестерина у носителей в 1,24 раза выше по сравнению с гомозиготным генотипом СС.

Также обнаружено негативное влияние С-аллеля полиморфизма с.521Т>С на достижение целевых уровней липидов в сыворотке крови при лечении симвастатином. Эффективность достижения целевого уровня ОХ и ХС ЛПНП у неносителей была выше на 39,2% и 22,9% соответственно.

Список литературы

1. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации V пересмотр // Атеросклероз. – 2012. – № 2. – С. 61-94.
2. Житникова Л.М. "Новые" статины - новые возможности для врача и пациента / Л. М. Житникова // Русский медицинский журнал: Независимое издание для практикующих врачей. - 2011. - т. 19, № 29. - С. 1832-1834
3. Карпов Ю. А. Симвастатин: актуальная классика гиполлипидемической терапии / Ю. А. Карпов // Атмосфера. Новости кардиологии. - 2012. - № 3. - С. 2-8.
4. Ким И.В. Оценка диагностической значимости скрининговой методики выявления вероятности кардио- и цереброваскулярных заболеваний в амбулаторных условиях: дис.... канд. мед. наук. – Москва, 2014. - 110 с.
5. Оганов Р.Г. Демографические тенденции в Российской Федерации: вклад болезней системы кровообращения / Р.Г. Оганов, Г.Я. Масленникова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2012. - №1. – С. 5-10
6. Gotto, A.M. Contemporary Diagnosis and Management of Lipid Disorders / A.M. Gotto. – Int. Lipid Information bureau, New York, 2001. – 236 p.
7. Lucia A. Hindorff, Praveen Sethupathy, Heather A. Junkins, Erin M. Ramos, Jayashri P. Mehta, Francis S. Collins, Teri A. Manolio. Potential etiologic and functional implications of

genome-wide association loci for human diseases and traits. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. - Vol. 106, № 23. – P. 9362-9367

8. Niemi M. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake / M. Niemi, M.K. Pasanen, P.J. Neuvonen // Pharmacol. Rev. – 2011. – Vol. 63, №1. – P. 157–181.

9. World Health Organization: World Health Statistics 2012 [Электронный ресурс]. – 2012. – P.34. - Режим доступа: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/

Рецензенты:

Замай Т.Н., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий, ГБОУ ВПО "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск.

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск.