

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА RS3846663 ГЕНА *HMGCR* С ОБЩИМ ХОЛЕСТЕРИНОМ

Оседко А.В.¹, Котловский М.Ю.¹, Оседко О.Я.¹, Покровский А.А.^{1,2}, Искра И.П.¹, Дыгай А.М.³, Котловский Ю.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, e-mail: 13th_Apostol@mail.ru;

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет», Красноярск;

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск

Ген гидроксигидрокси-метилглутарил-кофермент А редуктазы кодирует фермент, катализирующий превращение гидроксигидрокси-метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту, которая является одним из промежуточных продуктов, образующихся в процессе биосинтеза холестерина. Эта реакция является скоростью-лимитирующей стадией на пути синтеза холестерина. Цель настоящего исследования заключалась в анализе ассоциации полиморфного маркера rs3846663 гена *HMGCR* с повышенным уровнем холестерина. Группа исследования состояла из условно здоровых лиц в количестве 173 человек. Для идентификации одноточечного нуклеотидного полиморфизма использовали времяпролетный MALDI-TOF масс-спектрометр. Было обнаружено статистически достоверное различие в уровне общего холестерина относительно общепопуляционной нормы ($\leq 5,5$ мм/л) в зависимости от генотипов полиморфного маркера rs3846663. Нами было показано, что генотипы СТ и ТТ полиморфного маркера rs3846663 ассоциированы с повышенным уровнем общего холестерина.

Ключевые слова: *HMGCR*, полиморфизм, rs3846663, симвастатин, ишемическая болезнь сердца, гиперхолестеринемия.

ASSOCIATION OF POLYMORPHISM RS3846663 IN HMG-CoA REDUCTASE GENE WITH LEVELS OF TOTAL CHOLESTEROL

Osedko A.V.¹, Kotlovskiy M.Y.¹, Osedko O.Y.¹, Pokrovskiy A.A.^{1,2}, Iskra I.P.¹, Dygai A.M.³, Kotlovskiy Y. V.¹

¹Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, e-mail: 13th_Apostol@mail.ru;

²Siberian Federal University, Krasnoyarsk;

³Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D.Goldberg, Tomsk

The *HMGCR* gene encodes HMG-CoA reductase, a protein best known as being the target for drugs designed to reduce cholesterol levels and thereby reduce the risk of heart disease. The purpose of this study was to analyze association of polymorphism rs3846663 in gene *HMGCR* with increased levels of total cholesterol. The study included 173 subjects. Mass-spectrometry based minisequencing method was used to determine the genotypes of polymorphism rs3846663. There was a statistically significant difference in levels of total cholesterol between genotype CC and genotypes CT and TT. We have shown that variants of genotype of polymorphism rs3846663 may influence the level of total cholesterol.

Keywords: *HMGCR*, polymorphism, simvastatin, coronary heart disease, hypercholesterolemia, rs3846663.

Изучение связи общего холестерина (ОХ), как важнейшего показателя липидного обмена, с полиморфизмами генов имеет значимый прогностический эффект. Оценка риска и расчет предрасположенности к высокому холестерину позволит повысить эффективность ранней профилактики и терапии. Одним из наиболее многообещающих генов-кандидатов является ген гидроксигидрокси-метилглутарил-КоА-редуктазы - один из ключевых ферментов,

регулирующих синтез ХС в печени на этапе превращения 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзима А (ГМГ-КоА) в мевалоновую кислоту путем двухступенчатого восстановления за счет NADH. Полиморфные варианты гена *HMGCR* могут влиять на метаболизм и транспорт липопротеидов плазмы и эффективность терапии статинами. Данный ген локализован на хромосоме 5 в области q13.3-q14.3, состоит из 20 экзонов, кодирует белок, состоящий из 888 аминокислот, который широко экспрессируется по всему телу.

Исследования, проведенные в различных популяциях [2; 3; 7], доказали наличие связи между некоторыми вариантами полиморфизмов гена *HMGCR* и липидным профилем, а также ассоциации между определенными вариантами полиморфизмов и повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, и эффективностью их медикаментозной терапии.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе ассоциации полиморфного варианта rs3846663 гена *HMGCR* с повышенным уровнем холестерина. Данный полиморфный маркер расположен в интроне 18 и обусловлен нуклеотидной заменой С на Т. Этот полиморфизм еще малоизучен, вследствие чего его распространенность и ассоциации с уровнем общего холестерина (ОХ) представляют особый интерес. Полученные нами данные позволяют сделать вполне обоснованный вывод об ассоциации гена *HMGCR* с уровнем общего холестерина.

Материалы и методы исследования

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.

Для изучения оценки распространенности и ассоциации полиморфизма rs3846663 гена *HMGCR* была обследована группа пациентов, состоящая из относительно здоровых лиц в количестве 173 человек (105 женщин, 68 мужчин), проживающих в городе Красноярске. Средний возраст составлял $49,98 \pm 0,49$ года. Критериями включения для данной группы являлись: возраст – от 40 до 65 лет, пол – мужчины и женщины, отсутствие ИБС, отсутствие острых заболеваний и хронических заболеваний в момент обострения, отсутствие тяжелых хронических заболеваний. Критериями исключения являлись: наличие ИБС, острые заболевания, хронические заболевания в стадии обострения, наличие сахарного диабета, нарушения липидного обмена, тяжелые нарушения функции печени и почек, артериальная гипертензия.

Первоначально определялся спектр липидов, что включало определение концентрации общего холестерина, ТГ, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП. Вышеперечисленные показатели определялись автоматически колориметрическим методом на приборе COBAS INTEGRA 400 plus (США).

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 реагентов для идентификации однонуклеотидных полиморфизмов (ООО НПФ «ЛИТЕХ»). Согласно инструкции последовательно проводили реакции амплификации, дефосфорилирования и мини-секвенирования для дальнейшей идентификации полиморфизмов на времяпролетном MALDI-TOF масс-спектрометре autoflex IV (Bruker Daltonics, Германия).

Для расчёта соответствия распределения генотипов в популяционной выборке закону Харди-Вайнберга использовали программное обеспечение Hardy-Weinberg equilibrium calculator. При обработке полученного материала применялись методы вариационной статистики (программное обеспечение IBM SPSS Statistics 20).

Результаты и обсуждение

В группе из 173 человек носителями гомозиготного генотипа СС полиморфизма rs3846663 гена *HMGCR* было 45 человек (26%), гетерозиготного генотипа СТ – 91 человек (52%) и патологической гомозиготы ТТ – 37 человек (21%). Частота встречаемости аллеля С составила 0,52, а аллеля Т – 0,48. Распределения частот генотипов полиморфизма rs3846663 гена *HMGCR* соответствовали популяционному равновесию Харди-Вайнберга, о чем свидетельствует значение χ^2 , равное 0,5 (табл. 1).

Таблица 1

Соответствие частот аллелей полиморфизма rs3846663 гена *HMGCR* равновесию Харди-Вайнберга в группе относительно здоровых людей.

Генотип	Наблюдаемая частота, %	Ожидаемая частота, %	χ^2 (df=2)	P
1	2	3	4	5
СС	26,0	27,3	0,5	0,4
СТ	52,6	49,8		
ТТ	21,4	22,7		

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

Анализ частот генотипов полиморфизма rs3846663 гена *HMGCR* показал, что преобладают гетерозиготные носители данного полиморфизма.

Для исследования зависимостей между уровнями холестерина и генотипами полиморфизма rs3846663 исследуемая группа была «ранжирована» по нормам общего холестерина согласно российским рекомендациям (общепопуляционная норма $\leq 5,5$ мм/л, 5-й пересмотр, 2012 год) (1). Далее в исследовании использовались два обозначения уровня общего холестерина: нормальный ($\leq 5,5$ мм/л) и повышенный уровень ($> 5,5$ мм/л).

С нормальным гомозиготным генотипом СС и нормальным уровнем ОХ было 75,6% (34 человека), с повышенным – 24,4% (11 человек). С гетерозиготным генотипом всего был 91 человек, из них только 37,4% (34 человека) с нормальным уровнем, а 62,6% (57 человек) с повышенным. Носителями патологического генотипа были 37 человек, из них 27% (10 человек) с нормальным уровнем ОХ и 73% (27 человек) с повышенным.

Итого, с мутантным аллелем Т было 128 человек – 34,4% (44 человека) с нормальным уровнем ОХ и 65,6% (84 человека) с повышенным.

Различия в этих трех группах были достоверными, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Распределение по нормам общепопуляционного холестерина в зависимости от генотипов полиморфизма rs3846663

Показатель		ОХ				Общее количество пациентов	p
		Нормальный уровень		Повышенный уровень			
		абс.	%	абс.	%		
Генотипы	СС	25	55,6%	20	44,4%	45	
	СТ	32	35,2%	59	64,8%	91	0,023
	ТТ	10	27,0%	27	73,0%	37	0,009
	СТ+ТТ	42	32,8%	86	67,2%	128	0,007

Примечание: p - асимптотическая значимость.

При анализе данных о носительстве генотипа СТ была выявлена зависимость между носительством гетерозиготного генотипа и уровнем холестерина и, соответственно, предрасположенность лиц с генотипом СТ к повышенному уровню холестерина. Расчет относительного риска показал, что вероятность повышенного уровня общего холестерина у носителей генотипа СТ в 1,3 раза выше (95%С.И. 1.02-1.73), чем у людей с гомозиготным генотипом СС. При этом отношение шансов равно 2,30 (95%С.И. 1,11-4,77).

При проведении анализа на поиск отличий между носительством генотипов СС и ТТ мы также получили данные о существовании зависимости между носительством мутантного генотипа и уровнем холестерина и, как следствие, предрасположенности лиц с генотипом ТТ к повышенному уровню холестерина. Расчет относительного риска показал, что вероятность повышенного уровня общего холестерина у носителей генотипа ТТ в 2,01 раза выше (95%С.І. 1.12-3.58), чем у людей с гомозиготным генотипом СС. При этом отношение шансов равно 3,37 (95%С.І. 1,32-8,58).

Также была найдена зависимость между носительством аллеля Т и повышенным общепопуляционным уровнем холестерина. Расчет относительного риска показал, что вероятность повышенного уровня общего холестерина у носителей аллеля Т в 1,3 раза выше (95%С.І. 1.05-1.59), чем у людей с гомозиготным генотипом СС. При этом отношение шансов равно 2,56 (95%С.І. 1,27-5,12).

При проведении анализа внутри групп, сформированных по половому признаку, отличия были найдены только в группе женщин. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Распределение по нормам общепопуляционного холестерина среди женщин в зависимости от генотипов полиморфизма rs3846663

Показатель		ОХ				Общее количество пациентов	р
		Нормальный уровень		Повышенный уровень			
		абс.	%	абс.	%		
Генотипы	СС	21	65,6%	11	34,4%	32	
	СТ	19	35,2%	35	64,8%	54	0,006
	ТТ	5	26,3%	14	73,7%	19	0,009
	СТ+ТТ	24	32,9%	49	67,1%	73	0,002

Примечание: р - асимптотическая значимость.

При расчете относительного риска было выявлено, что при генотипе СТ у женщин вероятность повышенного уровня общего холестерина в 1,8 раза выше (95%С.І. 1,20-2,89), чем у женщин с генотипом СС. Отношение шансов равно 3,51 (95%С.І. 1,40-8,81).

В то же время у женщин - носительниц генотипа ТТ вероятность повышенного уровня общего холестерина в 2,49 раза выше (95%С.І. 1,12-5,51) в сравнении с носительницами генотипа СС. Отношение шансов при этом составляло 5,34 (95%С.І. 1.52-18.75).

У женщин при носительстве аллеля Т вероятность повышенного уровня общего холестерина в 1,99 раза выше (95%С.І. 1,32-3,01) в сравнении с носительницами генотипа СС. Отношение шансов при этом составляло 3,89 (95%С.І. 1.62-9.37).

Заключение

Носительство полиморфных аллелей генов, кодирующих фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу, может существенно влиять на предрасположенность к повышенному уровню холестерина.

В нашем исследовании выявлена корреляционная зависимость между полиморфизмом rs3846663 гена *HMGCR* и уровнем общего холестерина относительно общепопуляционных норм. У носителей генотипа СТ риск повышения холестерина относительно общепопуляционных в 1,3 раза выше, чем у носителей СС генотипа. У женщин риск повышенного уровня холестерина выше в 1,8 раза. У носителей генотипа ТТ риск повышения холестерина относительно общепопуляционных норм выше в 2 раза, а у женщин в 2,49. У носителей аллеля Т риск повышения холестерина относительно общепопуляционных норм в 1,3 раза выше по сравнению с носителями СС генотипа. В группе женщин при аллеле Т риск повышенного уровня холестерина выше в 1,99 раза.

Все участники исследования подписывали информированное согласие. Протокол исследования соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом (выписка из протокола № 41/2012 заседания локального этического комитета ГБОУ ВПО «КрасГМУ», заседание состоялось 21.06.2012).

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. Burkhardt R. [et al.] Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13 // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2008. – 28 (11):2078-84.
3. Chen Y.C. et al. The HMG-CoA reductase gene and lipid and lipoprotein levels: the multi-ethnic study of atherosclerosis // *Lipids.* - 2009. - № 44. - P. 733-43.
4. Gotto A.M. Contemporary Diagnosis and Management of Lipid Disorders. – Int. Lipid Information bureaw. - New York, 2001. – 236 p.

5. Lucia A. Hindorff [et al.] 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.
6. Mangravite L.M. [et al.] Combined influence of LDLR and HMGCR sequence variation on lipid-lowering response to simvastatin // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 2010. - № 7. - 1485-92.
7. Medina M.W. and Krauss R.M. The role of HMGCR alternative splicing in statin efficacy // Trends Cardiovasc Med. - 2009. - № 19. - 173-7.
8. Waterworth D.M. [et al.] Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 2010. - № 30. - P. 2264-76.
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/.