

Бушуева О. Ю.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ rs1049255 CYBA И rs2333227 MPO АССОЦИИРОВАНЫ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У РУССКИХ ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

Цель	Изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO с развитием ишемической болезни сердца (ИБС) у русских жителей Центральной России.
Материал и методы	Материалом для исследования послужили образцы ДНК 436 пациентов с ИБС (265 мужчин, 171 женщина; средний возраст 61 год) и 370 относительно здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту (209 мужчин, 161 женщина; средний возраст 60 лет). Генотипирование проводили путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов.
Результаты	Сравнительный анализ частот генотипов (лог-аддитивная регрессионная модель) показал, что SNP rs1049255 CYBA (отношение шансов – ОШ 0,79 при 95% доверительном интервале – ДИ от 0,65 до 0,96; $p=0,02$) и rs2333227 MPO (ОШ 0,72 при 95% ДИ от 0,55 до 0,95; $p=0,02$) ассоциировались с пониженным риском развития ИБС, с учетом поправки на пол, возраст. Анализ эффектов, специфических для пола, выявил, что протективный эффект rs1049255 CYBA проявляется только у мужчин (ОШ 0,72 при 95% ДИ от 0,55 до 0,94; $p=0,16$).
Заключение	Установлен протективный эффект rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO относительно развития ИБС у русских. Протективный эффект rs1049255 CYBA наблюдается только у мужчин.
Ключевые слова	Ишемическая болезнь сердца; окислительный стресс; активные формы кислорода; rs1049255; CYBA; rs2333227; MPO; SNP; половой диморфизм
Для цитирования	Bushueva O.Yu. Genetic Variants rs1049255 CYBA and rs2333227 MPO are Associated with Susceptibility to Coronary Artery Disease in Russian Residents of Central Russia. <i>Kardiologiia</i> . 2020;60(10):47–54. [Russian: Бушуева О. Ю. Генетические варианты rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO ассоциированы с предрасположенностью к ишемической болезни сердца русских жителей Центральной России. <i>Кардиология</i> . 2020;60(10):47–54]
Автор для переписки	Бушуева Ольга Юрьевна. E-mail: olga.bushueva@inbox.ru

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) остается ведущей нозологией в структуре заболеваемости и смертности во всем мире [1]. Накопленные за последние десятилетия данные представляют важные доказательства роли окислительного стресса в возникновении и прогрессировании ИБС [2, 3]. Окислительный стресс определяется как дисбаланс между генерацией активных форм кислорода (АФК) и активностью антиоксидантов в пользу первых. Результатом окислительного стресса является образование окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛНП), которые существенно способствуют атерогенезу посредством нескольких механизмов: индуцируют активацию и дисфункцию эндотелиальных клеток, образование из макрофагов пенных клеток, миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток [4]. Кроме того, обнаружена прямая связь между генерируемыми НАДФ(Н)-оксидазами АФК и уровнем окисленных ЛНП, а также стабильностью атеросклеротических бляшек [5], что подтверждает прямую связь с развитием атеросклероза сосудов и, соответственно, ИБС. Вариации в генах, кодирующих ферменты редокс-гомеостаза, могут влиять на функциональную активность со-

ответствующих ферментов и тем самым определяют восприимчивость к окислительному стрессу.

НАДФ(Н)-оксидаза требуется для оксидантной активности в гладкомышечных клетках и является основным источником производства супероксида в сосудистой сети [6]. Однонуклеотидная замена (SNP) A640G (rs1049255) в 3'UTR-области гена CYBA (кодирующего субъединицу p22phox НАДФ(Н)-оксидазы) локализована в пределах сайта связывания miRNA и может влиять на уровни экспрессии CYBA и активность НАДФ(Н)-оксидазы [7]. Исследования связи однонуклеотидной замены в полиморфном сайте A640G гена CYBA с риском развития ИБС противоречивы. Так, A. Macias-Reyes и соавт. [8] обнаружили ассоциацию генотипа G/G rs1049255 CYBA с развитием ИБС у испанцев; при этом данный SNP не был связан с развитием ИБС в китайской популяции хань [9].

Еще один фермент с прооксидантной активностью – миелопероксидаза (MPO). MPO – фермент, впервые обнаруженный в фагоцитах и являющийся неотъемлемой частью противомикробной защиты [10]. Во время «окислительного взрыва» MPO генерирует значительное количество АФК, таких как гипохлорная кислота, ти-

розильные радикалы, а также химически активные частицы азота. Было показано, что эти метаболиты вовлечены в процессы окислительного разрушения при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ) [11]. Замена -463G>A в промоторной области гена МРО (rs2333227) приводит к потере сайта связывания для фактора транскрипции SP1 и существенно влияет на экспрессию гена [12].

Убедительно доказано, что повышенные концентрации МРО независимо связаны с увеличением риска развития ИБС [13]. В то же время исследование SNP rs2333227 (-463G>A) МРО с развитием ИБС единичны. Так, в проведенном в 2001 г. в Канаде исследовании был впервые показан протективный эффект полиморфизма -463G>A относительно риска развития ИБС [14]. В мета-анализе N. Tang и соавт. (2013), основанном на исследовании преимущественно китайских популяций, было обнаружено, что генотипы G/A и A/A были существенно связаны с уменьшением риска развития ИБС [15], тогда как в другом мета-анализе, который включал 5 исследований случай–контроль, выполненных в популяциях Нидерландов, Канады, Швеции, Турции и Китая, ассоциации между данным полиморфизмом и риском развития ИБС не обнаружено [16]. В проведенном D. Mandsorwale и соавт. [17] исследовании в индийской популяции ассоциации полиморфизма -463G>A с развитием ИБС выявлено не было. Противоречивость полученных результатов может быть связана с различиями в генетической структуре исследованных популяций.

Исследований связи полиморфных вариантов генов с прооксидантным эффектом rs1049255 СУВА и rs2333227 МРО с развитием ИБС в русской популяции не проводилось.

Цель исследования

Цель исследования: изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов rs1049255 СУВА и rs2333227 МРО с развитием ИБС у русских жителей Центральной России.

Материал и методы

Материалом для исследования послужила выборка неродственных русских индивидов, проживающих в Курской области не менее чем в трех поколениях, общей численностью 806 человек. В исследование вошли 436 пациентов с ИБС (265 мужчин, 171 женщина), которые находились на стационарном лечении в Курской областной клинической больнице и в Курской городской клинической больнице скорой медицинской помощи в период 2011–2017 гг. [18]. Группу сравнения составили 370 практически здоровых добровольцев (209 мужчин, 161 женщина) без хронических заболеваний в анамнезе, имевших нормальный уровень артериального давле-

ния (АД) и не получавших гипотензивной терапии [19]. Контрольная выборка была сформирована из здоровых добровольцев, а также во время профессиональных осмотров на промышленных предприятиях, в лечебно-профилактических учреждениях г. Курска и Курской области. С целью контроля перед забором биологического материала проводилось измерение АД, дважды, с интервалом 5 мин. Формирование выборок больных и здоровых осуществлялось сплошным методом.

Группы больных ИБС и контроля были сопоставимы по полу ($p=0,41$). Средний возраст больных ИБС составил 61 год, средний возраст участников контрольной группы – 60 лет ($p=0,57$; табл. 1).

Критерием включения в исследование служил подтвержденный диагноз ИБС, установленный на основании данных анамнеза, инструментальных исследований (наличие ишемических изменений на электрокардиограмме по данным нагрузочных тестов, визуализация зон гипо- и акинезии по данным эхокардиографии (ЭхоКГ) в покое или при стресс-ЭхоКГ, выявление клинически значимого атеросклеротического поражения коронарного русла с помощью коронарографии).

Из исследования исключали пациентов с хроническими болезнями печени, почек (с клиренсом креатинина менее 60 мл/мин/1,73 м²), онкологическими заболеваниями, кардиомиопатией, хронической обструктивной болезнью легких, диффузными заболеваниями соединительной ткани, острыми и хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями, эндокринными заболеваниями (в том числе сахарным диабетом 2-го типа), анемией, алкоголизмом. Пациенты с мозговым инсультом в анамнезе также исключались из данного исследования. Все пациенты с ИБС страдали артериальной гипертензией (стадия III, риск 4) и имели хроническую сердечную недостаточность.

Исследование соответствует положениям Хельсинкской декларации. Исследование было одобрено региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

У всех обследуемых брали образцы венозной крови. Генотип ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование rs1049255 СУВА и rs2333227 МРО проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием опубликованных методик генотипирования на амплификаторе CFX96, Bio-Rad [20]. Синтез олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществлялся компанией «Синтол». Повторное генотипирование 10% исследованных образцов, отобранных по случайному принципу и в отсутствие информации о статусе болезни, показало 100% воспроизводимость оригинальных результатов.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием программной среды R. Гипотезу о нормальности распределения данных проверяли с помощью тестов Шапиро–Уилка и Шпигельхальтера, для проверки однородности групповых дисперсий в случае нормального распределения признаков использовали тест Левена. Поскольку тип распределения данных в большинстве случаев отличался от нормального и/или не соблюдалось условие равенства дисперсий, при сравнении количественных данных использовали непараметрический ранговый критерий Манна–Уитни. Уровень статистической значимости при сравнении номинальных данных рассчитывали с помощью критерия

Таблица 1. Клинические характеристики исследуемых групп

Показатель		Больные ИБС (n=436)	Контроль (n=370)	P
Возраст, годы, Ме [Q1; Q3]		61 [55; 69]	60 [56; 68]	0,57
Пол	мужчины, n (%)	265 (60,8)	209 (56,5)	0,41
	женщины, n (%)	171 (39,2)	161 (43,5)	
Курение	курящие, n (%)	157 (44)	139 (40,8)	0,542
	некурящие, n (%)	200 (56)	202 (59,2)	
	курящие мужчины	143 (91,1)	128 (92,1)	0,76
	курящие женщины	14 (8,9)	11 (7,9)	
	некурящие мужчины	68 (34)	67 (33,2)	0,86
	некурящие женщины	132 (66)	135 (66,8)	
Индекс массы тела, Ме [Q1; Q3]		24,3 [22,5; 27,1]	23,9 [22,7; 26,4]	0,64
Характер основной работы, n (%)	физический	111 (47,6)	57 (60)	0,02
	интеллектуальный	122 (52,4)	38 (40)	
Отягощенная по ССЗ наследственность	есть, n (%)	138 (79,3)	44 (40)	2,05 × 10 ⁻¹⁰
	нет, n (%)	36 (20,7)	66 (60)	
Уровень холестерина, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]		5,4 [4,58; 6,02]	–	–
Уровень триглицеридов, ммоль/л, Ме [Q1; Q3]		1,37 [0,99; 2]	–	–
Возраст манифестации АГ, годы, Ме [Q1; Q3]		50 [44; 55]	–	–
Возраст манифестации ИБС, годы, Ме [Q1; Q3]		52 [47; 57]	–	–
Функциональный класс стенокардии	II, n (%)	56 (37,1)	–	–
	III, n (%)	90 (59,6)	–	–
	IV, n (%)	5 (3,3)	–	–
Функциональный класс ХСН	I, n (%)	33 (17,6)	–	–
	II, n (%)	152 (81,3)	–	–
	III, n (%)	2 (1,1)	–	–
Наличие ИМ в анамнезе	есть, n (%)	115 (26,4)	–	–
	нет, n (%)	321 (73,6)	–	–

ИБС – ишемическая болезнь сердца; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; АГ – артериальная гипертензия; ИМ – инфаркт миокарда.

хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса. С целью устранения эффекта множественных сравнений применяли процедуру Бенджамини–Хокберга для коррекции полученных значений «p». Для описания меры среднего уровня выборочных данных использовали медиану, 1-й и 3-й квартили – Ме [Q1; Q3]. При анализе ассоциаций аллелей с риском развития ИБС использовали логистический регрессионный анализ. Оценку ассоциаций генотипов с заболеванием проводили с использованием отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ), рассчитанных для лог-аддитивной регрессионной модели с поправками на пол и возраст в программе SNPStats, доступной онлайн (<https://www.snpsstats.net/start.htm>). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Для оценки регуляторного потенциала полиморфных вариантов генов использовали биоинформационные ресурсы HaploReg (v4.1) (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), QTLbase (<http://mulinlab.org/qtlbase>) и GTex portal (<https://gtexportal.org/home/>).

Результаты

Клинические характеристики участников исследования представлены в табл.1. Распределение частот генотипов rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO в общей исследованной выборке соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$), однако, в контроле наблюдалось отклонение от равновесия Харди–Вайнберга rs1049255 CYBA за счет увеличения наблюдаемой гетерозиготности ($p > 0,05$).

В табл. 2 представлены модели ассоциаций генотипов исследованных SNP с развитием ИБС. Однако для интерпретации результатов анализа ассоциаций пользовались лог-аддитивной регрессионной моделью, поскольку она предполагает анализ аддитивной модели наследования признака и позволяет оценить вклад каждого аллеля независимо от вклада других аллелей. Был выявлен протективный эффект аллеля G rs1049255 CYBA (ОШ 0,80 при 95% ДИ от 0,66 до 0,97; $p = 0,03$) и аллеля A rs2333227 MPO (ОШ 0,72 при 95% ДИ от 0,55 до 0,94; $p = 0,02$) относительно риска развития ИБС (табл.2). Сравнительный анализ частот генотипов также показал, что SNP rs1049255 CYBA (ОШ 0,79 при 95% ДИ от 0,65 до 0,96; $p = 0,02$) и rs2333227 MPO (ОШ 0,72 при 95% ДИ от 0,55 до 0,95; $p = 0,018$) ассоциировались со снижением риска развития ИБС (см. табл. 2).

Учитывая характерный для мультифакторных заболеваний половой диморфизм в проявлении ассоциаций генетических маркеров, мы провели дифференцированный анализ в зависимости от пола (табл.3). У мужчин отмечался защитный эффект аллеля G rs1049255 CYBA относительно риска развития ИБС на пограничном уровне статистической значимости (ОШ 0,77 при 95% ДИ

Таблица 2. Анализ ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO с риском развития ИБС

Генетические модели ассоциаций rs1049255 CYBA с развитием ИБС

Модели ассоциаций		Минорный аллель/ Генотипы	Контроль (n=370)	Больные ИБС (n=436)	ОШ (95% ДИ)	P*
Ассоциации аллелей		G	0,51	0,46	0,80 (от 0,66 до 0,97)	0,03
Ассоциации генотипов	кодоминантная модель	A/A	74 (20%)	136 (31,2%)	1	0,0005
		A/G	211 (57%)	200 (45,9%)	0,51 (от 0,36 до 0,72)	
		G/G	85 (23%)	100 (22,9%)	0,63 (от 0,42 до 0,95)	
	доминантная модель	A/A	74 (20%)	136 (31,2%)	1	0,0002
		A/G-G/G	296 (80%)	300 (68,8%)	0,54 (от 0,39 до 0,75)	
	рецессивная модель	A/A-A/G	285 (77%)	336 (77,1%)	1	0,97
		G/G	85 (23%)	100 (22,9%)	0,99 (от 0,71 до 1,38)	
	модель сверхдоминирования	A/A-G/G	159 (43%)	236 (54,1%)	1	0,0013
		A/G	211 (57%)	200 (45,9%)	0,63 (от 0,48 до 0,84)	
лог-аддитивная модель		–	–	–	0,79 (от 0,65 до 0,96)	0,02

Генетические модели ассоциаций rs2333227 MPO с развитием ИБС

Генотипские модели ассоциации: 10255527 / HLA-C*8:01					
--	--	--	--	--	--

* – p с коррекцией на пол и возраст; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; полужирным шрифтом выделены статистически значимые ассоциации.

Таблица 3. Анализ ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO с риском развития ишемической болезни сердца в зависимости от пола

Ген/SNP	Минорный аллель/ генотипы	Контроль	Больные ИБС	ОШ (95% ДИ)	p*
Мужчины		n=209	n=265		
rs1049255 CYBA	G	0,519	0,455	0,77 (от 0,60 до 1,00)	0,049
	A/A	38 (18,2%)	84 (31,7%)	0,72 (от 0,55 до 0,94) **	0,016**
	A/G	125 (59,8%)	121 (45,7%)		
	G/G	46 (22%)	60 (22,6%)		
rs2333227 MPO	A	0,179	0,142	0,75 (от 0,53 до 1,07)	0,13
	G/G	142 (67,9%)	192 (72,5%)	0,75 (от 0,52 до 1,07) **	0,12**
	G/A	59 (28,2%)	71 (26,8%)		
	A/A	8 (3,8%)	2 (0,8%)		
Женщины		n=161	n=171		
rs1049255 CYBA	G	0,509	0,456	0,84 (от 0,62 до 1,14)	0,3
	A/A	36 (22,4%)	52 (30,4%)	0,82 (от 0,60 до 1,11) **	0,2**
	A/G	86 (53,4%)	79 (46,2%)		
	G/G	39 (24,2%)	40 (23,4%)		
rs2333227 MPO	A	0,189	0,137	0,68 (от 0,45 до 1,03)	0,08
	G/G	104 (64,6%)	128 (74,8%)	0,66 (от 0,43 до 1,01) **	0,052**
	G/A	53 (32,9%)	39 (22,8%)		
	A/A	4 (2,5%)	4 (2,3%)		

* – p с коррекцией на возраст; ** – показатели, рассчитанные для лог-аддитивной регрессионной модели с коррекцией на пол и возраст; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; полужирным шрифтом выделены статистически значимые ассоциации.

от 0,60 до 1,00; $p=0,049$); лог-аддитивная модель ассоциаций генотипов выявила протективный эффект rs1049255 CYBA относительно риска развития ИБС у мужчин (ОШ 0,72 при 95% ДИ от 0,55 до 0,94; $p=0,016$). При этом у женщин ассоциаций не обнаружено.

Обсуждение

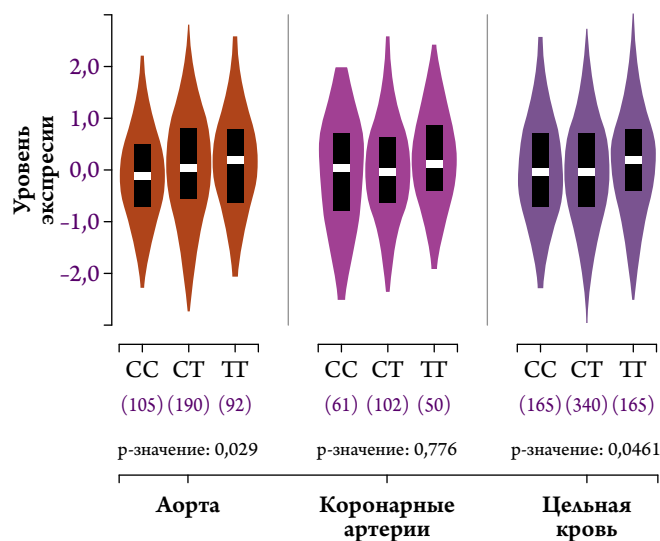
НАДФ(Н)-оксидазы, продуцирующие супероксидный анионный радикал в результате окисления НАДФ(Н) или НАД(Н), служат преобладающим источником супероксидных анионных радикалов в коронарных артериях [5]. НАДФ(Н)-оксидазы в наибольшей степени экспрессируются в фибробластах, эндотелиальных, гладкомышечных и иммунных клетках, инфильтрирующих стенки сосудов, и фагоцитах [21]. Молекулярный комплекс НАДФ(Н)-оксидазы состоит из ассоциированных с мембранами субъединиц, одной из которых является $p22^{phox}$ (так называемый цитохром *b*, или CYBA). Поскольку субъединица CYBA является каналом для транспорта электронов НАДФ(Н)-оксидазы через мембрану, она в наибольшей степени влияет на активность НАДФ(Н)-оксидазы. Полиморфизм 640A>G, локализованный в 3' нетранслируемой области гена, не приводит к аминокислотной замене, однако показано, что генотип AA ассоциирован с повышением продукции АФК на 30% по сравнению с таковой у гомозигот GG [22]. Примечательно, что rs1049255-cis-eQTL, ассоциированные с рисковым аллелем А (Т) CYBA, связаны с повышением экспрессии гена в аорте (нормализованный размер эффекта – $NES=0,05$; $p=0,029$), коронарных артериях ($NES=0,01$; $p=0,766$), цельной крови ($NES=0,03$; $p=0,046$) и, следовательно, повышенной генерацией АФК в этих таргетных для CC3 тканях (<https://gtexportal.org/>; рис. 1).

Согласно данным базы HaploReg (v4.1), rs1049255 CYBA располагается в регионе связывания ДНК с гистонем H3, характеризующимся монометилированием лизина 4 (H3K4me1) и маркирующим энхансеры в провоспалительных моноцитах-CD14+. Действие этой гистоновой метки усиливается ацетилированием лизина-27 гистона H3 (H3K27ac), маркирующим энхансеры в первичных моноцитах периферической крови, в правом желудочке сердца, моноцитах CD14+.

Последующий биоинформатический анализ mQTL (локусов количественных признаков метилирования) выявил, что аллель риска А rs1049255 CYBA связан с cis-mQTL, ассоциированными со снижением метилирования ДНК в периферической крови (табл. 4). Следовательно, носительство данного аллеля может быть связано с повышением экспрессии CYBA посредством механизмов mQTL-ассоциированного снижения метилирования.

Таким образом, биоинформатический анализ показал, что rs1049255 CYBA характеризуется высоким регуля-

Рисунок 1. Влияние носительства различных генотипов rs1049255 на экспрессию CYBA в аорте, коронарных артериях и цельной крови (по данным GTEx Portal)



торным потенциалом, в том числе посредством эпигенетических механизмов регуляции генной экспрессии.

Наше исследование также показало, что rs1049255 CYBA ассоциирован с развитием ИБС только у мужчин и не связан с предрасположенностью к заболеванию у женщин. В основе этих различий могут лежать два основных механизма. Во-первых, пол имеет большое значение как в регуляции АД, так и в формировании предрасположенности к атеросклерозу, что объясняется не только дифференциальной регуляцией биодоступности оксида азота (NO), но и гендерными различиями в генерации супероксидного анионного радикала [23], основным источником которого служат НАДФ(Н)-оксидазы, в частности, исследованный нами CYBA. Во-вторых, курильщиков среди мужчин было гораздо больше, чем среди женщин. Учитывая, что сигаретный дым является основным средовым источником супероксида [24], можно предположить, что избыток супероксида, обусловленный воздействием компонентов сигаретного дыма, в сочетании с носительством функционально более активного аллеля А rs1049255 CYBA может способствовать повышенному риску развития ИБС именно у мужчин.

Еще одним SNP, показавшим ассоциацию с развитием ИБС в популяции Центральной России, был rs2333227 MPO. Полиморфизм -463G>А гена MPO может быть связан с восприимчивостью к ИБС посредством нескольких молекулярных механизмов. Было показано, что MPO способствует дисфункции эндотелия и вазоконстрикции за счет увеличения потребления NO [25]. MPO может потреблять NO в каталитической реакции, действуя как его каталитический поглотитель, ограничивая тем самым его биодоступность in vivo. Кроме того, генерируемая MPO хлорноватистая кислота может вступать в химиче-

Таблица 4. Cis-mQTL, ассоциированные с «рисковым» аллелем A rs1049255 CYBA в периферической крови

СрG-сайт (геномный регион)	Размер эффекта (beta)	p ¹	FDR ²
cg05463589 (chr16:88706426)	-0,35405	4,83×10 ⁻¹⁸	2,33×10 ⁻¹²
cg05463589 (chr16:88706426)	-0,36935	9,38×10 ⁻¹⁸	4,34×10 ⁻¹²
cg00362322 (chr16:88704230)	-0,0273	1,29×10 ⁻¹⁶	–
cg21593409 (chr16:88706389)	-0,34401	2,28×10 ⁻¹⁶	9,74×10 ⁻¹¹
cg05463589 (chr16:88706426)	-0,36793	2,68×10 ⁻¹⁶	1,21×10 ⁻¹⁰
cg05463589 (chr16:88706426)	-0,35159	1,59×10 ⁻¹⁵	8,55×10 ⁻¹⁰
cg00362322 (chr16:88704230)	-0,32524	3,57×10 ⁻¹⁵	1,35×10 ⁻⁹
cg00362322 (chr16:88704230)	-0,32951	7,85×10 ⁻¹⁵	2,88×10 ⁻⁹
cg21593409 (chr16:88706389)	-0,30911	2,78×10 ⁻¹⁴	9,7×10 ⁻⁹
cg05463589 (chr16:88706426)	-0,32285	3,1×10 ⁻¹³	1,13×10 ⁻⁷
cg05202654 (chr16:88706241)	-0,2978	7,1×10 ⁻¹²	1,91×10 ⁻⁶
cg21593409 (chr16:88706389)	-0,29932	2,91×10 ⁻¹¹	7,93×10 ⁻⁶
cg05202654 (chr16:88706241)	-0,29788	4,61×10 ⁻¹¹	1,22×10 ⁻⁵
cg00362322 (chr16:88704230)	-0,28602	8,3×10 ⁻¹⁰	0,000199
cg08155347 (chr16:88704957)	-0,2629	1,45×10 ⁻⁹	0,000273
cg00816037 (chr16:88812342)	-0,245	1,63×10 ⁻⁹	0,000306
cg05202654 (chr16:88706241)	-0,25173	9,04×10 ⁻⁹	0,00152
cg26748794 (chr16:88804051)	-0,24464	1,71×10 ⁻⁸	0,00275
cg21593409 (chr16:88706389)	-0,24545	3,17×10 ⁻⁸	0,00583
cg00362322 (chr16:88704230)	-0,25588	4,21×10 ⁻⁸	0,00719
cg26748794 (chr16:88804051)	-0,23896	6,85×10 ⁻⁸	0,01

В таблицу 4 включены результаты исследований европейских популяций, представленных ресурсом QTLbase (<http://mulinlab.org/qtlbase>)

¹ – p-уровень значимости; ² – p-уровень значимости после коррекции поправок на множественные сравнения методом false discovery rate (FDR).

Таблица 5. Cis-mQTL, ассоциированные с «протективным» аллелем A rs2333227 MPO в периферической крови

Cis-mQTL, ассоциированные с аллелем A rs2333227 MPO в периферической крови				
№	СрG-сайт (геномный регион)	Размер эффекта (beta)	p ¹	FDR ²
1.	cg13734043 (chr17:56270198)	0,283395	2×10 ⁻⁸	0,01
2.	cg13734043 (chr17:56270198)	0,26839	1,2×10 ⁻⁸	0,005
3.	cg13734043 (chr17:56270198)	0,31877	1,49×10 ⁻⁹	0,001
4.	cg13734043 (chr17:56270198)	0,281783	9,47×10 ⁻¹⁰	0,001

В таблицу 5 включены результаты исследований европейских популяций, представленных ресурсом QTLbase (<http://mulinlab.org/qtlbase>);

¹ – p-уровень значимости; ² – p-уровень значимости после коррекции поправок на множественные сравнения методом false discovery rate (FDR).

ские реакции непосредственно с L-аргинином – ключевым субстратом для синтазы оксида азота (NOS), а образовавшийся хлорированный L-аргинин ингибирует продуцирование NO в эндотелиальных клетках, что влияет на эндотелийзависимую вазорелаксацию [26]. MPO также может вносить вклад в развитие ССЗ через увеличение жесткости артериальной стенки в результате ее окислительной модификации и ремоделирования и вследствие опосредованной MPO активации металлопротеиназ [27].

Анализ локусов количественных признаков показал, что rs2333227 MPO связан с cis-mQTL, ассоциированными с увеличением метилирования четырех СрG-сайтов в гене MPO (см. табл. 5). Повышение уровня метилирования MPO у носителей аллеля А, соответственно, может влиять на снижение его экспрессии, и, как следствие, уменьшение выработки АФК, чем также могут быть обусловлены защитные механизмы аллеля А относительно

риска развития ИБС. Обращает внимание то, что аллель А rs2333227 MPO связан с cis-pQTL, снижающими экспрессию белка MPO (белок P05164) в периферической крови ($p=1,17 \times 10^{-10}$), причем у пациентов с ССЗ атеросклеротического генеза [28].

Согласно данным базы HaploReg (v4.1), rs2333227 MPO располагается в регионе связывания ДНК с модифицированным гистонем H3K4me1, маркирующим энхансеры (в моноцитах периферической крови, моноцитах CD14+), с модифицированным гистонем H3K4me3, маркирующим промоторы (в правом желудочке сердца, моноцитах CD14+), с модифицированным гистонем H3K27ac, маркирующим энхансеры (в первичных моноцитах периферической крови, в правом желудочке сердца, моноцитах CD14+). Следовательно, выявленные регуляторные эффекты rs2333227 MPO реализуются посредством широкого спектра эпигенетических механизмов.

Заключение

Таким образом, впервые установлена ассоциация rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO с развитием ишемической болезни сердца в популяции Центральной России. Учитывая выраженные прооксидантные эффекты этих генов и доказанную значимость генерируемых с их участием активных форм кислорода в развитии коронарного атеросклероза, механизмы обнаруженных ассоциаций, вероятнее всего, связаны с защитными эффектами аллелей, ассоциированных со снижением продукции оксидантов. Кроме того, наша работа показала, что протективный эффект аллеля G rs1049255 CYBA проявляется только у мужчин, представляя дополнительные доказательства значимой роли пол-специфических эффектов в формировании предрасположенности к ишемической болезни сердца. Следует также отметить, что биоинформатический анализ rs1049255 CYBA и rs2333227 MPO выявил высокий регуляторный потенциал исследованных однонуклеотидных полиморфизмов, предполагая потенциально важную роль эпигенетических механизмов в регуляции генной экспрессии. С практической точки зрения, полученные результаты могут быть использованы

для разработки новых подходов к профилактике и лечению ишемической болезни сердца, основанных на «борьбе» с окислительным стрессом.

Благодарности

Автор выражает благодарности за консультирование на различных этапах выполнения исследования Иванову В.П., Заслуженному деятелю науки РФ, д.м.н., профессору кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета; Полоникову А.В., д.м.н., профессору кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, директору НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии Курского государственного медицинского университета.

Источник финансирования

Работа выполнена при финансовой поддержке Курского государственного медицинского университета.

Конфликт интересов не заявлен.

Статья поступила 25.06.20

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Laslett LJ, Alagona P, Clark BA, Drozda JP, Saldivar F, Wilson SR et al. The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Prevalence, Diagnosis, Therapy, and Policy Issues. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(25):S1–49. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.11.002
- Lubrano V, Pingitore A, Traghella I, Storti S, Parri S, Berti S et al. Emerging Biomarkers of Oxidative Stress in Acute and Stable Coronary Artery Disease: Levels and Determinants. *Antioxidants*. 2019;8(5):115. DOI: 10.3390/antiox8050115
- Golubenkov M.V., Babushkina N.P., Zarubin A.A., Salakhov R.R., Makeeva O.A., Markova V.V. et al. Association of the mitochondrial DNA haplogroup H1 variants with the risk of acute cardiovascular events. *Research Results in Biomedicine*. 2019;5(4):19–31. [Russian: Голубенко М.В., Бабушкина Н.П., Зарубин А.А., Салахов Р.Р., Макеева О.А., Маркова В.В. и др. Ассоциация вариантов гаплогруппы H1 митохондриальной ДНК с риском сердечно-сосудистых катастроф. Научные результаты биомедицинских исследований. 2019;5(4):19–31]. DOI: 10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-2
- Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*. 2020;41(24):2313–30. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz962
- Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP et al. Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(12):1429–35. DOI: 10.1161/01.CIR.0000012917.74432.66
- Prieto-Bermejo Rodrigo, Hernández-Hernández Angel. The Importance of NADPH Oxidases and Redox Signaling in Angiogenesis. *Antioxidants*. 2017;6(2):32. DOI: 10.3390/antiox6020032
- Liu C, Rennie WA, Carmack CS, Kanoria S, Cheng J, Lu J et al. Effects of genetic variations on microRNA: target interactions. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(15):9543–52. DOI: 10.1093/nar/gku675
- Macías-Reyes A, Rodríguez-Esparragón F, Caballero-Hidalgo A, Hernández-Trujillo Y, Medina A, Rodríguez-Pérez JC. Insight into the role of CYBA A640G and C242T gene variants and coronary heart disease risk. A case-control study. *Free Radical Research*. 2008;42(1):82–92. DOI: 10.1080/10715760701796918
- Liu S, Li X, Wang J, Ji J, Liu J, Lin Y et al. The rs9932581 and rs1049255 Polymorphisms in CYBA is not Associated with Pre-eclampsia in Chinese Han Women. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(4):1471–8. DOI: 10.1159/000447850
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase: Current Opinion in Hematology. 2000;7(1):53–8. DOI: 10.1097/00062752-200001000-00010
- Zelzer S, Enko D, Pilz S, Tomaschitz A, März W, Meinitzer A. Myeloperoxidase, asymmetric dimethyl-arginine and the renin-angiotensin-aldosterone-system in cardiovascular risk patients: Cross-sectional findings from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clinical Biochemistry*. 2017;50(13–14):739–45. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.03.013
- Desikan R, Narasimhulu CA, Khan B, Rajagopalan S, Parthasarathy S. Myeloperoxidase (MPO): Do We Need Inhibitors? In: *Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus* [ISBN: 978-3-319-60323-0]. Kartha CC, Ramachandran S, Pillai RM, editors -Cham: Springer International Publishing; 2017. - P. 535–571. [DOI: 10.1007/978-3-319-60324-7_24].
- Afshinnia F, Zeng L, Byun J, Gadegbeku CA, Magnone MC, Whatling C et al. Myeloperoxidase Levels and Its Product 3-Chlorotyrosine Predict Chronic Kidney Disease Severity and Associated Coronary Artery Disease. *American Journal of Nephrology*. 2017;46(1):73–81. DOI: 10.1159/000477766
- Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Thérault P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *American Heart Journal*. 2001;142(2):336–9. DOI: 10.1067/mhj.2001.116769
- Tang N, Wang Y, Mei Q. Myeloperoxidase G-463A polymorphism and susceptibility to coronary artery disease: A meta-analysis. *Gene*. 2013;523(2):152–7. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.131

16. Chang C, Gao B, Liu Z, Mao J, Jiang G. The myeloperoxidase -463G/A polymorphism and coronary artery disease risk: A meta-analysis of 1938 cases and 1990 controls. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(16–17):1644–8. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.09.002
17. Mandsorwale D, Nagtilak S, Lalchandani A, Srivastava AK. Role of -463 G/A genetic polymorphism & myeloperoxidase activity in prediction of cardiovascular disease. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*. 2014;2(4D):1402–7. [Av. at: <http://saspublisher.com/wp-content/uploads/2014/07/SJAMS-24D1402-1407.pdf>]
18. Polonikov A, Kharchenko A, Bykanova M, Sirotna S, Ponomarenko I, Bocharova A et al. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene*. 2017;627:451–9. DOI: 10.1016/j.gene.2017.07.004
19. Bushueva O, Solodilova M, Ivanov V, Polonikov A. Gender-specific protective effect of the -463G>A polymorphism of myeloperoxidase gene against the risk of essential hypertension in Russians. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2015;9(11):902–6. DOI: 10.1016/j.jash.2015.08.006
20. Packer BR, Yeager M, Burdett L, Welch R, Beerman M, Qi L et al. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(90001):D617–21. DOI: 10.1093/nar/gkj151
21. Katsuyama M. NOX/NADPH Oxidase, the Superoxide-Generating Enzyme: Its Transcriptional Regulation and Physiological Roles. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010;114(2):134–46. DOI: 10.1254/jphs.10R01CR
22. Schirmer M, Hoffmann M, Kaya E, Tzvetkov M, Brockmöller J. Genetic polymorphisms of NAD(P)H oxidase: variation in subunit expression and enzyme activity. *The Pharmacogenomics Journal*. 2008;8(4):297–304. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500467
23. Dantas A, Franco M, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D et al. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovascular Research*. 2004;61(1):22–9. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.10.010
24. Dikalov S, Itani H, Richmond B, Arslanbaeva L, Vergeade A, Rahman SMJ et al. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2019;316(3):H639–46. DOI: 10.1152/ajp-heart.00595.2018
25. Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, Eiserich JP et al. Heparins Increase Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Liberating Vessel-Immobilized Myeloperoxidase. *Circulation*. 2006;113(15):1871–8. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590083
26. Yang J, Cheng Y, Ji R, Zhang C. Novel model of inflammatory neointima formation reveals a potential role of myeloperoxidase in neointimal hyperplasia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291(6):H3087–93. DOI: 10.1152/ajp-heart.00412.2006
27. Rodríguez-Pla A, Bosch-Gil JA, Rosselló-Urgell J, Huguet-Re-decilla P, Stone JH, Vilardell-Tarres M. Metalloproteinase-2 and -9 in Giant Cell Arteritis: Involvement in Vascular Remodeling. *Circulation*. 2005;112(2):264–9. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.520114
28. Yao C, Chen G, Song C, Keefe J, Mendelson M, Huan T et al. Genome-wide mapping of plasma protein QTLs identifies putatively causal genes and pathways for cardiovascular disease. *Nature Communications*. 2018;9(1):3268. DOI: 10.1038/s41467-018-05512-x