

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ ХОЛЕСТЕРИНА: СВЯЗЬ С УРОВНЕМ ЛИПИДОВ КРОВИ, ТОЛЩИНОЙ ИНТИМА-МЕДИА И РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

© 2020 г. М. И. Чурилин^{1, *}, С. И. Кононов¹, Ю. В. Лунева¹,
В. А. Казанов¹, Ю. Э. Азарова^{1, 2}, Е. Ю. Клёсова², М. А. Быканова², Г. Пасчоалини¹,
А. В. Харченко¹, С. Н. Жабин¹, О. Ю. Бушуева^{1, 2}, С. В. Поветкин¹, Г. С. Маль¹,
А. П. Ковалев³, М. А. Солодилова¹, А. В. Полоников^{1, 2}

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, 305041 Россия

²Курский государственный медицинский университет, Научно-исследовательский институт генетической
и молекулярной эпидемиологии, Курск, 305041 Россия

³Курская областная клиническая станция переливания крови, Курск, 305035 Россия

*e-mail: mpmi2@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.03.2019 г.

После доработки 24.04.2019 г.

Принята к публикации 10.06.2019 г.

Изучено влияние однонуклеотидных вариантов полиморфизма (SNP) генов внутриклеточных транспортеров холестерина rs1883025 *ABCA1*, rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STAR3* на показатели липидного состава сыворотки крови, толщину комплекса интима-медиа (ТИМ), а также их взаимосвязь с риском развития ишемической болезни сердца (ИБС). Генотипирование SNP проводили на генетическом анализаторе MassARRAY 4. Влияние полиморфных вариантов генов на трансформированные показатели липидного обмена и ТИМ анализировали методом линейного регрессионного анализа отдельно у мужчин и женщин с поправкой на возраст и индекс массы тела. У мужчин установлена ассоциация rs881844 гена *STAR3* с пониженным риском развития ИБС (OR = 0.67, 95% CI 0.46–0.96, $P = 0.02$). У женщин для SNP rs1883025 *ABCA1* установлена ассоциация с пониженным риском развития ИБС (OR = 0.65, 95% CI 0.44–0.95, $P = 0.02$). SNP rs1883025 *ABCA1* ассоциировался с уровнем холестерина липопротеидов низкой плотности ($P = 0.05$), а SNP rs217406 – с уровнем триглицеридов ($P = 0.02$) только у мужчин. У женщин rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STAR3*, а у мужчин rs1883025 *ABCA1* были ассоциированы с ТИМ. Нами впервые выявлены ассоциации rs1883025 гена *ABCA1* и rs881844 гена *STAR3* с развитием ИБС и показаны значительные половые различия в ассоциациях генов с исследованными фенотипами. Таким образом, исследованные полиморфные варианты генов внутриклеточных транспортеров холестерина могут быть вовлечены в формирование атеросклеротического процесса в артериях посредством механизмов, которые напрямую не связаны с нарушениями обмена холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, липиды сыворотки крови, обмен холестерина, толщина комплекса интима-медиа, внутриклеточные транспортеры холестерина, однонуклеотидный полиморфизм (ОМП).

DOI: 10.31857/S0016675820020046

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – распространенное сердечно-сосудистое заболевание, характеризующееся абсолютным или относительным нарушением кровоснабжения миокарда вследствие поражения коронарных артерий. В большинстве случаев ИБС является результатом атеросклероза коронарных артерий, его основу составляют нарушения липидного обмена [1]. По своей природе ИБС представляет собой типичное

мультифакториальное заболевание, развитие которого детерминировано сложным взаимодействием генетических и средовых факторов [2]. Основные нарушения липидного обмена, патогенетически значимые для развития атеросклероза, – повышение уровня общего холестерина и холестерина липопротеидов низкой плотности. Наряду с изменением биохимических атерогенных факторов сыворотки крови, что составляет основу диагно-

стики атеросклероза, пристальное внимание исследователей привлекает показатель “толщина комплекса интима-медиа сонных артерий” (ТИМ), который отражает системные атеросклеротические изменения и фактически является ранним ультразвуковым индикатором, позволяющим оценить формирование начальных стадий изменения сосудистой стенки [3, 4].

К настоящему времени идентифицирован широкий спектр генов, вовлеченных в регуляцию липидного обмена и характеризующихся патогенетической взаимосвязью с атеросклерозом и ИБС [2, 5, 6]. Выполнено несколько крупномасштабных полногеномных исследований, позволивших установить более сотни локусов, контролирующих уровни липидов и липопротеидов сыворотки крови, многие из которых выявили ассоциацию с ИБС [7–10]. Как за рубежом, так и в России основной вектор генетических исследований продолжительное время был смещен в сторону поиска полиморфных вариантов генов *LPA*, *LDLR* и аполипопротеидов С [6, 11–13], тогда как гены, кодирующие транспортеры клеточного холестерина, не получили должного внимания исследователей в качестве генетических детерминант липидного обмена и предрасположенности к ИБС. Цель настоящего исследования – изучение влияния полиморфных вариантов генов внутриклеточных транспортеров холестерина rs1883025 *ABCA1*, rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STAR3* на показатели липидного состава сыворотки крови, толщину комплекса интима-медиа, а также их взаимосвязь с риском развития ишемической болезни сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 1700 неродственных индивидов славянского происхождения – уроженцев Центральной России, включая 991 пациента с подтвержденным диагнозом ИБС (633 – мужчины и 358 женщин, средний возраст 59.9 ± 8.8). Доля больных стенокардией 2–4-го функционального класса – 42%, больные инфарктом миокарда – 58%. Группа из 709 человек – относительно здоровые добровольцы без клинических проявлений сердечно-сосудистых и других хронических заболеваний (мужчин 452 и женщин 257, средний возраст 60.4 ± 8.1). Исследуемые группы были сопоставимы как по полу ($P = 0.24$), так и по возрасту ($P = 0.24$). Сбор клинического и биологического материалов от пациентов с ИБС, их клиническое обследование осуществлялись на базах кардиологических отделений БМУ “Курская областная клиническая больница”, ОБУЗ “Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи” и ОБУЗ “Курская городская больница № 1 им. Н.С. Короткова”. Контрольная группа формировалась в ходе проведения про-

фессиональных медицинских осмотров из числа медперсонала и пациентов лечебно-профилактических учреждений, не страдающих хроническими заболеваниями, здоровых доноров, сотрудников образовательных и других учреждений г. Курска. Детальная информация по сбору клинического и биологического материалов и обследования пациентов была представлена нами ранее [14–17]. Для оценки липидного состава крови использовали кровь из кубитальной вены пациентов, забор которой проводили утром натощак после 12-часового голодания, а также после приема легкого ужина (с ограничением жиров) в день, предшествующий взятию крови. Для молекулярно-генетических исследований у всех обследуемых осуществлялся забор крови объемом 5 мл в пластиковые пробирки с 0.5 М раствором ЭДТА, после чего образцы замораживали и хранили при -20°C до этапа выделения ДНК. Геномную ДНК выделяли из размороженной венозной крови стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции и преципитации этанолом.

Для молекулярно-генетического анализа были отобраны три однонуклеотидных полиморфных варианта (SNP) генов, а именно rs1883025 C>T гена *ABCA1* (9q31.1), rs217406 C>G гена *NPC1L1* (7p13) и G>C rs881844 гена *STAR3* (17q12). Критерии отбора генов и SNPs включали: 1) продукт гена участвует в транспорте холестерина в клетке; 2) в отношении гена и полиморфизма есть литературные данные о влиянии на показатели липидного обмена крови, установленные в результате крупных международных исследований; 3) частота минорного аллеля должна быть не ниже 5%. Генотипирование полиморфных вариантов генов проводилось с использованием технологии iPLEX на генетическом анализаторе MassARRAY 4 (Agena Bioscience, США) в НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии Курского государственного медицинского университета. Подготовка образцов (проведение ПЦП) для масс-спектрометрической детекции SNPs проводили на приборе MassARRAY 4, используя амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США). При подборе праймеров и формировании ПЦП-мультиплексов для генотипирования SNPs использовалось online программное обеспечение MassARRAY Assay Design Suite (<https://agenacx.com>). Праймеры для iPLEX генотипирования были синтезированы в ЗАО “Евроген” (г. Москва).

Оценка липидных параметров крови включала определение содержания в сыворотке крови общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ) на автоматическом анализаторе Vitalab Flexor E (Нидерланды) прямым ферментативным методом с использованием реагентов производства “Analyticon”

(Германия). Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛВП) определялось прямым иммунотурбидиметрическим методом без предварительного осаждения (Direct-метод прямой элиминации) с использованием реагентов производства “Roche Diagnostics” (Германия) на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas c 311 (Германия). Уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) рассчитывали по формуле Фридвальда. Значения липидных показателей выражали в ммоль/л. Дуплексное ультразвуковое исследование сонных артерий выполнялось в В-режиме линейным датчиком ультразвукового разрешения с применением ультразвуковой системы MyLab™40 (Esaote, Голландия).

Для анализа соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга и сравнения частот аллелей и генотипов между группами использовался точный тест Фишера. Ассоциации SNPs с риском развития ИБС оценивали методом логистической регрессии по коэффициенту отношения шансов (OR), показывающему, во сколько раз вероятность попасть в группу “случай” отличается от вероятности попасть в группу контроля для носителя определенного генотипа с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела обследуемых.

В связи с тем, что показатели липидного обмена и комплекса толщина интима-медиа характеризовались распределением, отличным от нормального (оценено тестом Колмогорова–Смирнова), эти параметры представлялись в виде медиан (Me) и интерквартильных размахов (Q1, первый – Q3, третий квартили). Для статистического анализа эти параметры были подвергнуты трансформации (обратное нормальное преобразование на основе рангов). Влияние полиморфных вариантов генов на показатели липидного обмена и ТИМ анализировали методом линейного регрессионного анализа раздельно у мужчин и женщин с поправкой на возраст и индекс массы тела с помощью программного обеспечения SNPStats [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение частот генотипов в исследуемой популяции соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($P > 0.05$). Частоты аллелей полиморфных вариантов генов rs1883025 *ABCA1*, rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STARD3* были сопоставимы с европейскими популяциями согласно данным третьей фазы проекта “1000 геномов” (1000 Genomes Project). В табл. 1 представлены сводные данные по частотам аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов в группах больных ИБС и здоровых индивидов, стратифицированных по полу. У мужчин уста-

новлена статистически значимая ассоциация полиморфного варианта G>C rs881844 гена *STARD3* с пониженным риском развития ишемической болезни сердца независимо от возраста и индекса массы тела (эффект сверхдоминирования влияния SNP на риск развития болезни): генотип G/C встречался чаще в контрольной группе, чем среди больных ИБС (OR = 0.67, 95% CI 0.46–0.96, $P = 0.02$). Напротив, носительство генотипа C/C ассоциировалось с повышенным риском развития ИБС (OR = 1.78, 95% CI 1.16–2.72). Также у мужчин наблюдалась отчетливая тенденция ($P = 0.052$) к ассоциации генотипа C/G rs217406 с повышенным риском развития ИБС. У женщин установлена статистически значимая ассоциация SNP rs1883025 гена *ABCA1* для генотипа C/T (модель сверхдоминирования) с пониженным риском развития ИБС независимо от возраста и индекса массы тела пациентов (OR = 0.65, 95% CI 0.44–0.95, $P = 0.02$). Статистически значимых различий в частотах генотипов rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STARD3* между группами больных ИБС и здоровых женщин не установлено ($P > 0.05$).

Следующей задачей исследования было изучение связи полиморфных вариантов генов rs1883025 *ABCA1*, rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STARD3* с показателями липидного спектра сыворотки крови и показателем толщина комплекса интима-медиа у больных ИБС. В табл. 2 представлены данные по ассоциациям полиморфных вариантов внутриклеточных транспортеров холестерина с липидами плазмы крови и ТИМ у больных ИБС. Анализ показателей липидного обмена позволил выявить влияние отдельных полиморфных вариантов генов на уровни холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов у мужчин. Так, установленная тенденция позволяет предполагать влияние SNP rs1883025 гена *ABCA1* на содержание ХС ЛНП ($P > 0.05$): мужчины-носители вариантного аллеля T имели более высокие значения холестерина липопротеидов низкой плотности (аддитивная генетическая модель влияния SNP). Кроме того, у мужчин-носителей генотипа G/G в сравнении с другими генотипами *NPC1L1* наблюдался наименьший уровень триглицеридов сыворотки крови (рецессивная модель влияния SNP, $P = 0.02$). У женщин нами не были обнаружены статистически значимые влияния изучаемых полиморфных вариантов генов транспортеров холестерина на показатели липидного спектра сыворотки крови. Однако у женщин полиморфные варианты rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STARD3* были ассоциированы с толщиной комплекса интима-медиа (рецессивная модель влияния SNPs). В частности, женщины-носители генотипов G/G rs217406 *NPC1L1* ($P = 0.04$) и C/C rs881844 *STARD3*

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов внутриклеточных транспортеров холестерина в группах больных ИБС и здоровых индивидов

Генотипы, аллель	Мужчины				Женщины			
	больные ИБС (N = 633)	контроль (N = 452)	OR (95% CI)	P	больные ИБС (N = 358)	контроль (N = 257)	OR (95% CI)	P
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
ABCA1 C>T (rs1883025)								
C/C	383 (60.8)	281 (62.2)			226 (63.1)	143 (55.6)		
C/T	211 (33.5)	149 (33.0)	1.03 (0.76–1.40)	0.84	116 (32.4)	100 (38.9)	0.65 (0.44–0.95)	0.02^{OD}
T/T	36 (5.7)	22 (4.9)			16 (4.5)	14 (5.5)		
T	283 (22.5)	193 (21.3)	1.07 (0.87–1.31)	0.54	148 (20.7)	128 (24.9)	0.79 (0.60–1.03)	0.08
NPC1L1 C>G (rs217406)								
C/C	391 (61.8)	291 (64.4)			213 (59.5)	161 (62.6)		
C/G	209 (33.0)	136 (30.1)	1.47 (0.99–2.17)	0.052 ^{OD}	136 (38.0)	89 (34.6)	1.15 (0.82–1.62)	0.42
G/G	33 (5.2)	25 (5.5)			9 (2.5)	7 (2.7)		
G	275 (21.7)	186 (20.6)	1.07 (0.87–1.32)	0.52	154 (21.5)	103 (19.4)	1.14 (0.86–1.50)	0.37
STAR1 G>C (rs881844)								
G/G	284 (45.0)	183 (40.9)			162 (45.4)	102 (39.7)		
G/C	267 (42.3)	232 (51.8)	0.67 (0.46–0.96)	0.02^{OD}	160 (44.8)	125 (48.6)	0.93 (0.70–1.22)	0.58
C/C	80 (12.7)	33 (7.4)			35 (9.8)	30 (11.7)		
C	427 (33.8)	298 (33.3)	1.03 (0.86–1.23)	0.78	230 (32.2)	185 (36.0)	0.85 (0.67–1.07)	0.17

Примечание. N – объем выборки. OR (95% CI) – отношение шансов и 95%-ный доверительный интервал ассоциации SNP с риском развития ИБС с поправкой на возраст и индекс массы тела, полужирным шрифтом выделены статистически значимые ассоциации (^{OD} – эффект сверхдоминирования SNP).

($P = 0.02$), в сравнении с носителями альтернативных генотипов соответствующих SNPs, имели наименьшую толщину комплекса интима-медиа. Напротив, у мужчин-носителей генотипа *T/T*, в сравнении с другими генотипами rs1883025 *ABCA1* обнаружена наибольшая ТИМ (рецессивная модель влияния SNP). Полиморфные варианты rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STARD3* не были ассоциированы с толщиной комплекса интима-медиа у мужчин.

ОБСУЖДЕНИЕ

ABCA1 (ATP binding cassette subfamily A member 1) представляет собой АТФ-связывающий цАМФ-зависимый анионный транспортер, также известный как регуляторный белок оттока холестерина (СЕРР) [19], который является основным регулятором уровня клеточного холестерина и фосфолипидов, их транспорта на аполипопротеины с формированием ЛВП [20]. *Loss-of-function* мутации в кодирующей области гена *ABCA1* приводят к семейному дефициту ЛВП, связанному с нарушенным оттоком холестерина из клеток [21] и повышенным риском развития ИБС [22], тогда как полиморфные варианты, характеризующиеся эффектом *gain-of-function* (в частности, R219K rs2230806), наоборот, связаны с повышенным уровнем ЛВП, пониженным риском развития и прогрессирования коронарного атеросклероза [23]. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что генетически детерминированная пониженная активность *ABCA1* может являться важнейшим механизмом антиатерогенеза. В крупнейшем полногеномном исследовании липидов плазмы у европейцев, выполненном на выборке более 100000 индивидов, была выявлена ассоциация интронного SNP rs1883025 в гене *ABCA1* с пониженным уровнем ЛВП и повышенной концентрацией триглицеридов [8, 24]. Однако ассоциация уровня ХС ЛВП с SNP rs1883025 гена *ABCA1* не подтвердилась в нашем исследовании. Данная взаимосвязь также не была обнаружена в исследовании PAGE, выполненном на крупных популяционных выборках различного этноса [9]. Хотя нами не обнаружены корреляции SNP rs1883025 *ABCA1* с показателями липидного обмена, мы впервые установили связь данного локуса с толщиной интима-медиа сонных артерий, причем исключительно у мужчин. В частности, генотип *T/T* ассоциировался с большей ТИМ, чем носители других генотипов *ABCA1* у мужчин. В то же время генотип *C/T* был ассоциирован с пониженным риском развития ИБС у женщин, что может свидетельствовать, с одной стороны, о разнонаправленных фенотипических эффектах у носите-

лей различных генотипов, с другой, о существовании других факторов (в том числе средовых), которые могут указывать на связь данного генетического варианта с атеросклерозом.

NPC1L1 (NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1) – белок типа С1, мутация гена которого вызывает редкое наследственное лизосомное заболевание – болезнь Ниманна–Пика. Являясь холестерин-чувствительным рецептором, *NPC1L1* играет главную роль во внутриклеточном транспорте и гомеостазе холестерина и других липидов в качестве основного регулятора транспорта холестерина через клеточную мембрану апикальной поверхности энтероцитов кишечника [25]. Примечательно, что *NPC1L1* является молекулярной мишенью для гипохолестеринемического препарата Эзетимиба, подавляющего абсорбцию холестерина в кишечнике. Установлены как полиморфные варианты гена *NPC1L1*, ассоциированные с повышением уровня холестерина ЛПН и риском развития ИБС [26], так и генетические варианты, снижающие уровень холестерина ЛПН и риск развития ИБС [27]. В частности, аллель –762С SNP rs2073548 в промоторе гена *NPC1L1* связан с более высоким уровнем общего холестерина в сыворотке крови и холестерина ЛНП [28]. Напротив, инактивирующая мутация R406X (rs145297799) гена *NPC1L1* ассоциирована со значительным снижением уровня холестерина ЛНП и риском развития ИБС [29]. Показано, что полиморфный вариант rs217406 в интроне *NPC1L1* и ряд других SNPs, находящихся с ним в неравновесии по сцеплению, ассоциированы с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [30]. Ранее консорциумом Global Lipids Genetics Consortium была также обнаружена связь SNP rs217406 с уровнем холестерина ЛПН у европейцев [10]. Рецессивный эффект данного полиморфизма обнаружен как в отношении снижения уровня триглицеридов плазмы крови у мужчин, так и в отношении наименьшей толщины комплекса интима-медиа у женщин. Кроме того, у мужчин наблюдался отчетливый тренд в ассоциации генотипа *C/G* rs217406 с развитием ИБС, но на пограничном уровне значимости ($P = 0.052$). Согласно данным портала GTEx (<https://gtexportal.org>) SNP rs217406 имеет *cis*-eQTL: аллель *G* связан со статистически значимым увеличением ($P < 0.0001$) экспрессии гена *NPC1L1*, по крайней мере в подкожной жировой ткани, что может способствовать увеличенной абсорбции экзогенного холестерина в кишечнике. Однако механизмы, лежащие в основе выявленных ассоциаций данного SNP с уровнем триглицеридов и ТИМ у представителей разного пола, только предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Таблица 2. Связь полиморфных внутриклеточных транспортеров холестерина с липидами плазмы крови и ТИМ у больных ИБС

Ген (SNPID)	Генотипы	ОХС, ммоль/л			ХС ЛНП, ммоль/л			ХС ЛВП, ммоль/л			ТГ, ммоль/л			ТИМ, мм		
		Me	Q1/Q3 ¹	P ²	Me	Q1/Q3 ¹	P ²	Me	Q1/Q3 ¹	P ²	Me	Q1/Q3 ¹	P ²	Me	Q1/Q3 ¹	P ²
Мужчины																
<i>ABCA1</i> C>T (rs1883025)	C/C	5.78	4.84/6.27		2.57	1.66/3.95		1.24	1.00/1.54		2.04	1.59/3.29		0.62	0.55/0.78	
	C/T	5.76	4.79/6.20	0.82	3.05	2.00/4.10	0.05^A	1.20	1.01/1.46	0.67	1.71	1.37/3.14	0.29	0.60	0.52/0.77	0.02^R
	T/T	5.80	5.40/6.27		3.51	1.89/4.10		1.19	1.00/1.54		1.96	1.23/3.82		0.73	0.60/0.90	
<i>NPC1L1</i> C>G (rs217406)	C/C	5.80	4.83/6.27		3.01	1.80/4.08		1.20	1.01/1.53		1.92	1.57/3.22		0.63	0.55/0.78	
	C/G	5.70	4.83/6.20	0.83	2.60	1.80/3.92	0.68	1.24	1.03/1.54	0.24	1.93	1.50/3.49	0.02^R	0.61	0.53/0.77	0.41
	G/G	5.55	4.68/6.10		2.84	1.95/4.06		1.09	0.85/1.52		1.77	1.34/3.07		0.55	0.50/0.78	
<i>STARD3</i> G>C (rs881844)	G/G	5.80	4.73/6.30		2.78	1.85/3.96		1.18	1.00/1.55		1.91	1.55/3.48		0.65	0.53/0.77	
	G/C	5.72	4.90/6.20	0.25	2.70	1.71/4.01	0.55	1.24	1.02/1.53	0.87	2.02	1.50/3.22	0.91	0.60	0.55/0.75	0.70
	C/C	5.75	4.80/6.13		3.55	2.00/4.33		1.10	1.00/1.37		1.68	1.48/2.45		0.58	0.53/0.85	
Женщины																
<i>ABCA1</i> C>T (rs1883025)	C/C	5.65	4.81/6.28		1.90	1.46/2.42		1.52	1.24/1.74		3.22	1.90/3.82		0.60	0.50/0.80	
	C/T	5.78	4.72/6.30	0.82	1.89	1.23/2.70	0.39	1.31	1.20/1.62	0.69	3.07	1.81/3.83	0.71	0.63	0.50/0.80	0.78
	T/T	5.35	4.90/5.95		1.36	0.90/2.10		1.54	1.27/1.74		3.08	1.41/3.53		0.61	0.55/0.78	
<i>NPC1L1</i> C>G (rs217406)	C/C	5.64	4.79/6.27		1.90	1.30/2.46		1.48	1.25/1.73		3.13	1.89/3.80		0.60	0.50/0.80	
	C/G	5.80	4.88/6.30	0.97	1.86	1.24/2.46	0.41	1.39	1.16/1.73	0.36	3.27	1.86/3.84	0.99	0.65	0.55/0.80	0.04^R
	G/G	5.21	5.12/6.00		1.68	1.10/1.99		1.54	1.41/1.97		3.20	2.52/3.48		0.42	0.41/0.48	
<i>STARD3</i> G>C (rs881844)	G/G	5.66	4.81/6.26		1.89	1.20/2.26		1.50	1.24/1.74		3.18	1.93/3.77		0.62	0.55/0.80	
	G/C	5.43	4.76/6.35	0.55	1.90	1.30/2.49	0.92	1.40	1.24/1.66	0.75	3.21	1.69/3.91	0.93	0.65	0.50/0.80	0.02^R
	C/C	5.99	5.26/6.23		1.79	1.20/2.24		1.48	1.24/1.80		2.79	2.19/3.80		0.55	0.50/0.63	

¹ Медианы (Me) липидных показателей у носителей различных генотипов (25%/76% квартили).

² Уровни статистической значимости влияния SPN на липидные показатели и толщину интима-медиа (трансформированные значения) с поправкой на возраст и индекс массы тела (линейный регрессионный анализ), полужирным шрифтом выделены статистически значимые уровни (^A – аддитивный эффект, ^R – рецессивный эффект SNP).

STARD3 (StAR related lipid transfer domain containing 3) – белок, связывающий стерол и обеспечивающий транспорт холестерина и других липидов из эндоплазматического ретикулума в эндосомы [31]. Также он опосредует транспорт холестерина через митохондриальную мембрану [32]. Генетико-эпидемиологических и функциональных исследований полиморфного варианта rs881844 в интроне гена *STARD3* в опубликованной литературе нами не обнаружено. В единственном исследовании, проведенном международным консорциумом Global Lipids Genetics, установлена связь SNP rs217406 с уровнем холестерина ЛПН у европейцев [10]. Кроме того, известно, что полиморфизм rs881844 ассоциирован с пониженным риском рака желудка [33]. По данным портала GTEx SNP rs881844 характеризуется функциональным эффектом на экспрессию гена *STARD3*: аллель G ассоциирован со статистически значимым ($P < 0.0001$) снижением экспрессии гена в трансформированных фибробластах. Нами обнаружен протективный эффект генотипа G/C в отношении риска развития ИБС у мужчин, а также меньшая толщина комплекса интима-медиа у женщин-носителей генотипа C/C. При этом нами не выявлено взаимосвязи данного SNP с показателями липидного обмена. Можно предположить, что аллель C, ассоциированный с повышенной экспрессией гена *STARD3*, реализует свои антиатерогенные влияния на сосудистую стенку посредством других, пока неизвестных, механизмов.

Таким образом, в рамках проведенного исследования впервые установлена связь полиморфных вариантов генов внутриклеточных транспортеров холестерина rs1883025 *ABCA1*, rs217406 *NPC1L1* и rs881844 *STARD3* G>C с толщиной интима-медиа сонных артерий. Впервые выявлены ассоциации rs1883025 гена *ABCA1* и rs881844 гена *STARD3* с пониженным риском развития ИБС. Хотя нами не установлены связи данных генов с атерогенными изменениями липидного обмена у больных ИБС, тем не менее исследованные полиморфные варианты генов внутриклеточных транспортеров холестерина могут быть вовлечены в формирование атеросклеротического процесса в артериях посредством других механизмов, не связанных с нарушениями обмена холестерина и ЛНП, на что также указывает влияние этих локусов на толщину комплекса интима-медиа. Кроме того, выявленные ассоциации обнаруживают отчетливую связь показателей липидного обмена с полом – особенность, обнаруженная нами впервые для данных SNP. Дальнейшие исследования в других популяциях мира позволят уточнить установленные нами закономерности и раскрыть их биохимическую и молекулярную основу.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keenan T.E., Rader D.J. Genetics of lipid traits and relationship to coronary artery disease // *Curr. Cardiol. Rep.* 2013. V. 15. № 9. P. 396. <https://doi.org/10.1007/s11886-013-0396-9>
2. Khera A.V., Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation // *Nat. Rev. Genet.* 2017. V. 18. № 6. P. 331. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.160>
3. Eklund C., Friberg P., Gan L.M. High-resolution radial artery intima-media thickness and cardiovascular risk factors in patients with suspected coronary artery disease. Comparison with common carotid artery intima-media thickness // *Atherosclerosis.* 2012. V. 221. № 1. P. 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.035>
4. Лопина Н.А., Журавлёва Л.В. Значение толщины комплекса интима-медиа сонных артерий в прогнозировании атеросклеротического поражения коронарных сосудов // *Науч. результат. Медицина и Фармация.* 2017. Т. 3. № 10. С. 41–50. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2017-3-3-41-50>
5. Nikpay M., Stewart A.F., McPherson R. et al. A comprehensive 1000 genomes–based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. № 10. P. 1121. <https://doi.org/10.1038/ng.3396>
6. McPherson R., Tybjaerg-Hansen A. Genetics of coronary artery disease // *Circulation Res.* 2016. V. 118. № 4. P. 564–578. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306566>
7. Kathiresan S., Willer C., Peloso G. et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 1. P. 56. <https://doi.org/10.1038/ng.291>
8. Teslovich T.M., Musunuru K., Smith A.V. et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids // *Nature.* 2010. V. 466. № 7307. P. 707. <https://doi.org/10.1038/nature09270>
9. Dumitrescu L., Cara L., Taylor K. et al. Genetic determinants of lipid traits in diverse populations from the population architecture using genomics and epidemiol-

- ogy (PAGE) study // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 6. P. e1002138.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002138>
10. *Willer C.J., Schmidt E.M., Sengupta S. et al.* Discovery and refinement of loci associated with lipid levels // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 11. P. 1274.
<https://doi.org/10.1038/ng.2797>
 11. *Breslow J.L.* Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary heart disease susceptibility // *Ann. Rev. Genet.* 2000. V. 34. № 1. P. 233–254.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.233>
 12. *Боринская С.А., Кальпина Н.Р., Санина Е.Д. и др.* Полиморфизм гена аполипопротеина Е (АРОЕ) в популяциях России и сопредельных стран // *Генетика.* 2007. Т. 43. № 10. С. 1434–1440.
 13. *Воевода М.И., Куликов И.В., Шахтштейн Е.В. и др.* Спектр мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности в российской популяции // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 10. С. 1374–1378.
 14. *Bushueva O.Y., Bulgakova I.V., Ivanov V.P., Polonikov A.V. et al.* Association of flavin monooxygenase gene E158K polymorphism with chronic heart disease risk // *Bull. Experim. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 6. P. 776.
<https://doi.org/10.1007/s10517-015-3073-8>
 15. *Звягина М.В., Маль Г.С., Бушуева О.Ю. и др.* Оценка эффективности гиполипидемической терапии розувастатином у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от генотипов липопротеин-липазы // *Эксперим. клинич. фармакология.* 2016. Т. 79. № 1. С. 15–19.
 16. *Polonikov A., Kharchenko A., Bykanova M. et al.* Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population // *Gene.* 2017. V. 627. P. 451–459.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004>
 17. *Sirotna S., Ponomarenko I., Kharchenko A. et al.* A novel polymorphism in the promoter of the CYP4A11 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease // *Disease Markers.* 2018. V. 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/5812802>
 18. *Solé X., Guinó E., Valls J. et al.* SNPStats: a web tool for the analysis of association studies // *Bioinformatics.* 2006. V. 22. № 15. P. 1928–1929.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
 19. *Luciani M.F., Denizot F., Savary S. et al.* Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9 // *Genomics.* 1994. V. 21. № 1. P. 150–159.
<https://doi.org/10.1006/geno.1994.1237>
 20. *Krimbou L., Denis M., Haidar B. et al.* Molecular interactions between apoE and ABCA1 impact on apoE lipoproteins // *J. Lipid Res.* 2004. V. 45. № 5. P. 839–848.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M300418-JLR200>
 21. *Marcil M., Brooks-Wilson A., Clee S. et al.* Mutations in the ABCA1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux // *The Lancet.* 1999. V. 354. № 9187. P. 1341–1346.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)07026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)07026-9)
 22. *Frikke-Schmidt R., Sethi A.A., Remaley A.T. et al.* Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease // *Jama.* 2008. V. 299. № 21. P. 2524–2532.
<https://doi.org/10.1001/jama.299.21.2524>
 23. *Clee S.M., Zwinderman A.H., Engert J.C. et al.* Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease // *Circulation.* 2001. V. 103. № 9. P. 1198–1205.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.9.1198>
 24. *Wang K., Haitao Z., Frank D.M. et al.* Examination of genetic variants influencing lipid traits in pediatric populations // *J. Pediatric Genet.* 2012. V. 1. № 2. P. 85–98.
<https://doi.org/10.3233/PGE-2012-016>
 25. *Garcia-Calvo M., Lisnock J.M., Bull H.G. et al.* The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 23. P. 8132–8137.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0500269102>
 26. *Polisecki E., Peter I., Simon J.S. et al.* Genetic variation at the NPC1L1 gene locus, plasma lipoproteins, and heart disease risk in the elderly // *J. Lipid Res.* 2010. V. 51. № 5. P. 1201–1207.
<https://doi.org/10.1194/jlr.P001172>
 27. *Lauridsen B.K., Stender S., Frikke-Schmidt R. et al.* Genetic variation in the cholesterol transporter NPC1L1, ischaemic vascular disease, and gallstone disease // *Eur. Heart J.* 2015. V. 36. № 25. P. 1601–1608.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv108>
 28. *Chen C.W., Hwang J.J., Tsai C.T. et al.* The g. 762T>C polymorphism of the NPC1L1 gene is common in Chinese and contributes to a higher promoter activity and higher serum cholesterol levels // *J. Hum. Genet.* 2009. V. 54. № 4. P. 242.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2009.18>
 29. *Myocardial Infarction Genetics Consortium Investigators.* Inactivating mutations in NPC1L1 and protection from coronary heart disease // *New England J. Med.* 2014. V. 371. № 22. P. 2072–2082.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405386>
 30. *Muendlein A., Leiberer A., Saely Ch.H. et al.* Common single nucleotide polymorphisms at the NPC1L1 gene locus significantly predict cardiovascular risk in coronary patients // *Atherosclerosis.* 2015. V. 242. № 1. P. 340–345.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.011>
 31. *Wilhelm L.P., Wendling C., Védie B. et al.* STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites // *EMBO J.* 2017. V. 36. № 10. P. 1412–1433.
<https://doi.org/10.15252/embj.201695917>
 32. *Zhang M., Liu P., Dwyer N.K. et al.* MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 36. P. 33300–33310.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M200003200>
 33. *Qiu Y., Zhang Z.Y., Du W.D. et al.* Association analysis of ERBB2 amplicon genetic polymorphisms and STARD3 expression with risk of gastric cancer in the Chinese population // *Gene.* 2014. V. 535. № 2. P. 225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.030>

Polymorphisms of Intracellular Cholesterol Transporters Genes: Relationship with Blood Lipid Levels, Carotid Intima-Media Thickness and the Development of Coronary Heart Disease

M. I. Churilin^{a,*}, S. I. Kononov^a, Yu. V. Luneva^a, V. A. Kazanov^a, Yu. E. Azarova^{a,b}, E. Yu. Klyosova^b, M. A. Bykanova^b, G. Paschoalini^a, A. V. Kharchenko^a, S. N. Zhabin^a, O. Yu. Bushueva^{a,b}, S. V. Povetkin^a, G. S. Mal^a, A. P. Kovalev^c, M. A. Solodilova^a, and A. V. Polonikov^{a,b}

^aKursk State Medical University, Kursk, 305041 Russia

^bKursk State Medical University, Research Institute of Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk, 305041 Russia

^cKursk Regional Clinical Blood Transfusion Station, Kursk, 305035 Russia

*e-mail: mpmi2@yandex.ru

The aim of this study was to investigate the effects of single nucleotide polymorphisms (SNP) of genes encoding intracellular cholesterol transporters, such as rs1883025 of *ABCA1*, rs217406 of *NPC1L1* and rs881844 of *STARD3*, on blood lipid levels, carotid intima-media thickness (CIMT), and the risk of coronary heart disease (CHD). The study included 1700 unrelated individuals of Slavic origin (991 patients with CHD and 709 healthy volunteers). SNP genotyping was performed using the MassARRAY 4 system. The effects of polymorphic genes on transformed values of blood lipids and CIMT were evaluated by linear regression analysis separately in men and women, and adjusted for age and body mass index. SNP rs881844 of the *STARD3* gene was associated with decreased risk of CHD in men (OR = 0.67, 95% CI 0.46–0.96, $P = 0.02$). In women, SNP rs1883025 of *ABCA1* showed an association with decreased risk of CHD (OR = 0.65, 95% CI 0.44–0.95, $P = 0.02$). In men, SNP rs1883025 of the *ABCA1* gene was associated with the levels of low density lipoprotein cholesterol ($P = 0.05$), whereas SNP rs217406 was associated with triglyceride levels ($P = 0.02$). Polymorphisms such as rs217406 *NPC1L1* and rs881844 *STARD3* in women and rs1883025 *ABCA1* in men were associated with CIMT. The present study has identified for the first time that rs1883025 of *ABCA1* and rs881844 of *STARD3* are associated with susceptibility to coronary heart disease and showed clear sex-specific differences in the associations between the genes and the studied phenotypes. Thus, polymorphic variants of genes encoding intracellular cholesterol transporters are potentially involved in the formation of the atherosclerotic process through the mechanisms that seem to be not directly related to the metabolism of cholesterol and cholesterol of low density lipoproteins.

Keywords: ischemic heart disease, blood lipids, cholesterol metabolism, carotid intima-media thickness, intracellular cholesterol transporters, single nucleotide polymorphism (SNP).