

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА HSP70-2 И HSP70-HOM ГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА В АНАМНЕЗЕ

Шевченко А.В.¹, Голованова О.В.¹, Коненков В.И.¹,
Воевода М.И.², Максимов В.Н.²

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск

² Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск

Резюме. Мы провели анализ ассоциированности аллельного полиморфизма генов белков теплового шока HSP70-2 в позиции 1267A→G и HSP70-HOM гена в позиции 2437 T→C у пациентов европеоидного происхождения, перенесших острый инфаркт миокарда (ИМ) с классическими факторами риска его развития.

Частота HSP70-HOM*TC гетерозиготного варианта достоверно выше в группе с индексом массы тела (ИМТ) выше 25 относительно здоровых, а частота HSP70-HOM*CC гомозиготного варианта, напротив, достоверно снижена в группе пациентов с ИМТ выше 25 относительно здоровых. При сравнении частот генотипов между группами пациентов с ИМТ выше 25 и пациентов с нормальным индексом массы тела достоверные различия сохраняются как для частот HSP70-HOM*TC гетерозиготного варианта, так и для HSP70-HOM*CC гомозиготного варианта.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, гены белков теплового шока, полиморфизм генов, классические факторы риска ИМ

Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Konenkov V.I., Voevoda M.I., Maximov V.N.

FEATURES OF HSP70-2 AND HSP70-HOM GENE POLYMORPHISM IN THE PATIENTS WITH A HISTORY OF MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract. We have performed an analysis of associations between allelic polymorphisms of heat shock protein (HSP) genes, i.e., HSP70-2 1267A→G and HSP70-HOM 2437T→C in Caucasian patients with acute myocardial infarction (AMI) in anamnesis, along with evaluation of common risk factors for MI. Frequency of HSP70-HOM*TC heterozygous variant proved to be significantly higher in the group with Kettle body mass index (BMI) exceeding 25, as compared with a group of relatively healthy persons. By contrary, frequency of HSP70-HOM*CC homozygosity in the MI group with BMI > 25 was significantly lower, than among healthy persons. When comparing genotype frequencies among MI patients with BMI > 25 and those with BMI < 25, significance of the differences are retained, both for HSP70-HOM*TC heterozygosity and HSP70-HOM*CC homozygous state. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 87-92)

Keywords: myocardial infarction, heat shock proteins, gene polymorphism, conventional risk factors

Адрес для переписки:

Шевченко Алла Владимировна,
НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2.
Тел.: (383) 227-01-94.
Факс: (383) 227-01-96.
E-mail: shalla64@mail.ru

Введение

Корректность укладки, определяющая точность реализации генетической информации, зависит от функционирования белков теплового шока (hsp), выполняющих функцию молекулярных шаперонов в нормальной клеточной физиологии, а в стрессовых условиях обеспечивающих адаптационную и стрессовую толерантность [9].

Накопленные данные о высоком филогенетическом консерватизме белков теплового шока между видами сочетаются с данными о полиморфности кодирующих их генов. Полиморфизм может быть ассоциирован с различиями в клеточном ответе на стрессовую стимуляцию, включая инфекционные процессы и различные патологические состояния [13]. Hsp70 выделяют как один из основных кардиопротекторных стрессовых белков, участвующих в патогенезе гипертонии, атеросклероза, коронарной сердечной недостаточности [7, 8]. Кардиопротективный эффект экспрессии белков теплового шока достаточно хорошо описан в литературе при ишемическом инфаркте и инсульте [10, 14]. Hsp70 семейство кодируется 3 полиморфными генами: *HSP70-1*, *HSP70-2* и *HSP70-HOM*, причем *HSP70-1*, *HSP70-2* кодируют индуцибельные белки, а *HSP70-HOM* — конститутивный белок. Полиморфные сайты *HSP70-1*, *HSP70-2*, *HSP70-HOM* расположены в кодирующих регионах и влияют на структуру антиген-связывающих эпитопов [11].

Мы провели анализ ассоциированности аллельного полиморфизма генов белков теплового шока *HSP70-2* и *HSP70-HOM* у пациентов европеоидного происхождения, перенесших острый инфаркт миокарда с классическими факторами риска его развития.

Материалы и методы

Пациенты

Нами были обследованы 90 мужчин европеоидного происхождения, постоянно проживающих в сибирском регионе с ИМ в анамнезе в возрасте от 31 до 70 лет. Среди всех пациентов с инфарктом миокарда у 77,6% пациентов был диагностирован инфаркт миокарда с зубцом Q и у 22,4% — без зубца Q («ИМ с Q» — крупноочаговый или трансмуральный, «ИМ без Q» — мелкоочаговый или субэндокардиальный). Диагностика ИМ проводилась по стандартным показателям: ЭКГ, ЭхоКГ, АСТ, АЛТ, лейкоциты, СОЭ, ЛДГ, КФК.

Контрольную группу составили 95 практически здоровых лиц, этнически и географически соответствующих исследуемой группе пациентов. Кроме того, учитывая, что фактор профессиональной вредности значим для развития ССЗ, контрольная группа была набрана из работников этих же предприятий, ежегодно проходящих профилактический медицинский осмотр, сопоставимых по полу и возрасту, не имеющих заболева-

ний сердечно-сосудистой системы и каких-либо хронических заболеваний.

Методы

Индекс массы тела (ИМТ) вычисляли по формуле: $\text{ИМТ (кг/м}^2\text{)} = \text{вес (кг)}/\text{рост}^2 \text{ (м}^2\text{)}$. Масса тела считалась избыточной при превышении ИМТ 25 кг/м², ожирение — ИМТ > 30 кг/м².

SNP полиморфизм кодирующего региона *HSP70-2* гена исследовался в позиции 1267A→G и *HSP70-HOM* гена в позиции 2437T→C. Генотипирование аллельных вариантов HSP70 генов осуществляли методом рестриктоного анализа продуктов амплификации (RFLP-анализ). Полиморфные участки амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров [12], затем продукты амплификации подвергались гидролизу эндонуклеазами рестрикции *PstI* и *NcoI* соответственно («СибЭнзим», Новосибирск).

Статистическая обработка результатов включала расчет частот генотипов и тестирование их распределения на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (PXB) с использованием критерия хи-квадрат. Относительный риск (OR — odds ratio) заболевания по конкретному генотипу вычисляли как отношение шансов [2]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН.

Результаты

Частоты генотипов *HSP70-2* гена и *HSP70-HOM* в группе здоровых и пациентов с ИМ находятся в равновесии Харди–Вайнберга. Анализ частот гаплотипов не выявил достоверных различий анализируемых полиморфных позиций двух генов (табл. 1).

Учитывая, что на развитие патологии существенное влияние оказывает целый ряд регулируемых и нерегулируемых факторов, мы провели анализ полиморфизма анализируемых генов у пациентов с учетом ИМТ (табл. 2), как регулируемого фактора и возраста (табл. 3), в качестве не регулируемого фактора риска ИМ.

Нами не выявлено достоверных различий в распределении частот генотипов *HSP70-2* между группой пациентов с разным индексом массы тела и здоровыми. Частота *HSP70-HOM* гетерозиготного варианта достоверно выше в группе с ИМТ выше 25 относительно здоровых (OR = 3,07 p 0,039), а частота *HSP70-HOM*CC* гомозиготного варианта, напротив, достоверно снижена в группе пациентов с ИМТ выше 25 относительно здоровых (OR = 0,29 p 0,020). При

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ *HSP70-2* И *HSP70-НОМ* У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ИНФАРКТ МИОКАРДА И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Полиморфизм	ИМ (%)	Здоровые (%)	95% CI < OR >	X ² , df, P
<i>HSP70-2</i>	N = 90	N = 95		
A/A	40,00	41,05	0,51 < 0,96 > 1,80	X ² = 0,06 Df 2 P 0,969
A/G	52,22	50,53	0,58 < 1,07 > 1,99	
G/G	7,78	8,42	0,28 < 0,92 > 2,94	
<i>HSP70-НОМ</i>	N = 55	N = 91		
T/T	7,27	5,50	0,29 < 1,35 > 6,14	X ² = 1,48 Df 2 P 0,477
T/C	34,54	26,37	0,67 < 1,47 > 3,24	
C/C	58,19	68,13	0,31 < 0,65 > 1,38	

ТАБЛИЦА 2. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ *HSP70-2* И *HSP70-НОМ* У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ИНФАРКТ МИОКАРДА И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ С УЧЕТОМ ИНДЕКСА МАССЫ ТЕЛА

Поли-морфизм <i>HSP70</i>	Паци-енты ИМТ ≤ 25	Паци-енты ИМТ 25-30	Паци-енты ИМТ > 30	Здо-ровые лица	95% CI < OR > ИМТ ≤ 25 / здо-ровые	95% CI < OR > ИМТ 25-30 / здоровые	95% CI < OR > ИМТ > 30 / здоровые	95% CI < OR > ИМТ > 30 / ИМТ ≤ 25
<i>HSP70-2</i>	N = 34	N = 36	N = 18	N = 95				
A/A	41,18	36,11	44,44	41,05	0,42 < 1,01 < 2,39	0,34 < 0,81 < 1,92	0,37 < 1,15 < 3,53	0,28 < 0,81 < 2,36
A/G	50	58,33	44,44	50,53	0,42 < 0,98 < 2,30	0,59 < 1,37 < 3,20	0,25 < 0,78 < 2,39	0,49 < 1,40 < 4,02
G/G	8,82	5,56	11,12	8,42	0,21 < 1,05 < 4,77	0,09 < 0,64 < 3,52	0,18 < 1,36 < 8,00	0,07 < 0,61 < 4,92
<i>HSP70-НОМ</i>	N = 23	N = 21	N = 10	N = 91				
T/T	8,70	9,53	0	5,50	0,20 < 1,64 < 10,61	0,22 < 1,81 < 11,8	0,01 < 0,001 < 1,98	0,10 < 1,11 < 12,56
T/C	17,39	52,38	40	26,37	0,15 < 0,59 < 2,10	1,05 < 3,07 < 9,09 P 0,039	0,40 < 1,86 < 8,39	1,11 < 5,22 < 26,48 P 0,033
C/C	73,91	38,09	60	68,13	0,35 < 0,99 < 2,86	0,10 < 0,29 < 0,85 P 0,020	0,16 < 0,70 < 3,25	0,05 < 0,22 < 0,92 P 0,036

сравнении частот генотипов между группами пациентов с ИМТ выше 25 и пациентов с нормальным индексом массы тела достоверные различия сохраняются как для частот гетерозиготного

варианта (OR = 5,22 p 0,033), так и для *HSP70-НОМ*CC* гомозиготного варианта (OR = 0,22 p 0,036). При делении пациентов с ИМ на группы по возрасту случая острого инфаркта миокарда

ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ *HSP70-2* И *HSP70-HOM* У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ИНФАРКТ МИОКАРДА С УЧЕТОМ ВОЗРАСТА И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Полиморфизм	ИМ до 60 лет	ИМ после 60 лет	Здоровые лица	95% CI < OR > ИМ до 60 лет / здоровые	95% CI < OR > ИМ после 60 лет / здоровые	95% CI < OR > ИМ до 60 лет / ИМ после 60 лет
<i>HSP70-2</i>	N = 50	N = 40	N = 95			
A/A	34	47,5	41,05	0,34 < 0,74 < 1,60	0,58 < 1,30 < 2,92	0,22 < 0,57 < 1,45
A/G	60	42,5	50,53	0,69 < 1,47 < 3,12	0,32 < 0,72 < 1,62	0,72 < 1,85 < 4,77
G/G	6	10	8,42	0,14 < 0,69 < 3,07	0,28 < 1,21 < 4,82	0,17 < 0,57 < 1,93
<i>HSP70-HOM</i>	N = 34	N = 21	N = 95			
T/T	8,82	4,76	5,50	0,29 < 1,66 < 8,68	0,12 < 0,86 < 4,44	0,33 < 1,94 < 14,67
T/C	38,24	28,57	26,37	0,69 < 1,73 < 4,31	0,34 < 1,12 < 3,55	0,42 < 1,55 < 5,90
C/C	52,94	66,67	68,13	0,22 < 0,53 < 1,27	0,31 < 0,94 < 2,89	0,16 < 0,56 < 2,00

до 60 лет и от 60 лет и старше, не выявлено достоверных различий в распределении частот генотипов ни между двумя возрастными группами, ни при сравнении двух возрастных групп со здоровыми.

Обсуждение

Участие белков теплового шока в процессах атерогенеза и его последствий в настоящее время не подвергается сомнению. Показан высокий уровень hsp70 в атеросклеротических бляшках, причем наибольшая концентрация наблюдается в центральной, более утолщенной части атеромы, вокруг участков некроза, сывороточные титры анти-hsp антител положительно связаны с риском ИБС [1, 4]. В ряде исследований анализировалась ассоциация полиморфизма *HSP70-1* с сердечно-сосудистыми патологиями, включая инфаркт миокарда [3, 6], выявлена ассоциация *HSP70-2* полиморфизма с ишемией у пациентов пожилого возраста [5], *HSP70-2* и *HSP70-HOM* генотипов у пациентов с повышенным риском высокогорной болезни сердца [15]. Известно, что этиология ИМ сложна и связана с взаимодействием большого количества внешних и внутренних факторов. Однако большинство взаимодействий, включая цитопротективное взаимодействие hsp70 со многими эффекторными молекулами, не известно. Имеет ли полиморфизм *HSP70* генов какое-либо биологическое или функциональное значение, неясно.

В проведенном нами исследовании полиморфизма кодирующих регионов генов *HSP70-2* и *HSP70-HOM* в группах пациентов с инфарктом миокарда в анамнезе относительно здоровых не выявлено каких-либо значимых различий. Нами обнаружены достоверные различия между пациентами с индексом массы тела выше 25 и здоровыми, между пациентами с индексом массы тела выше 25 и пациентами с нормальным индексом массы тела по частотам генотипов *HSP70-HOM*. Полиморфизм *HSP70-HOM* в позиции 2437 соответствует замене Thr аминокислоты в позиции 493 на Met [11]. Согласно теории Pociot [12], замена Thr остатка (T-аллельный вариант) может затрагивать эффективность hsp70-hom белка как молекулярного шаперона, снижая силу гидрофобного взаимодействия между шапероном и целевым белком. Показано, что пептид-связывающие домены hsp70 белков имеют структуру, очень схожую с молекулой I класса HLA, и гипотетическая модель пептид связывающего домена hsp70 была предложена исходя из этой модели. В предложенной структурной модели пептид-связывающего домена hsp70-hom, аминокислота в позиции 493 единственная из β-цепи, которая формирует дно пептид-связывающей бороздки. Если в структурной модели заменить полярный и нейтральный Thr на неполярный и гидрофильный Met, такая замена может влиять на дальнейшие hsp70 взаимодействия и, следовательно, изменять его спо-

способность связывания и транспортировки некоторых вновь синтезируемых белков внутри клетки, а также утилизировать денатурированные белки, которые могут формироваться в результате повреждения при остром инфаркте миокарда. С другой стороны, *HSP70-HOM* ген, расположенный в регионе III класса HLA комплекса, может находиться в неравновесном сцеплении с генами HLA I и II или III класса, хотя на сегодняшний день о таких взаимодействиях, влияющих на ИМ, не известно.

В заключение хочется отметить, что основываясь на индивидуальных генетических особенностях структуры кодирующих последовательностей генов *HSP70* в этиологии и патогенезе таких мультифакториальных заболеваний человека, как сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, можно не только расширить понимание механизмов развития этих патологий, но и прогнозировать степень риска развития их осложнений, таких как острые коронарные события, и на основе прогноза проводить ранние профилактические мероприятия. Поэтому анализ прогностического значения полиморфизма комплекса генов-кандидатов совместно со стандартными факторами риска заболеваемости и смертности является актуальным.

Список литературы

1. Berberian P.A., Myers W., Tytell M., Challa V., Bond M.G. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries // *American Journal of Pathology*. — 1990. — Vol. 136 (1). — P. 71-80.
2. Bland J. M., Altman D.G. Education and debate. The odds ratio // *BMJ*. — 2000. — Vol. 320. — P. 1468.
3. Bolla M.K., Miller G.J., Yellon D.M., Evans A., Luc G., Cambou J.P., Arveiler D., Cambien F., Latchman D.S., Humphries S.E., Day I.N. Analysis of the association of a heat shock protein70-1 gene promoter polymorphism with myocardial infarction and coronary risk traits // *Dis Markers*. — 1998. — Vol. 13. — P. 227-235.
4. Giacconi R., Caruso C., Lio D., Muti E., Cipriano C., Saba V., Boccoli G., Gasparini N., Malavolta M., Mocchegiani E. 1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor of statins on adhesion molecule expression in endothelial cells for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients // *Mech Ageing Dev*. — 2005. — Vol. 126. — P. 866-873.
5. Giacconi R., Cipriano C., Muti E., Costarelli L., Malavolta M., Caruso C., Lio D., Mocchegiani E. Involvement of -308 TNF- α and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients // *Biogerontology*. — 2006. — Vol. 7 (5-6). — P. 347-356.
6. He M., Guo H., Yang X., Zhang X., Zhou L., Cheng L., Zeng H., Hu F.B., Tanguay R.M., Wu T. Functional SNPs in HSPA1AGene Predict Risk of Coronary Heart Diseases // *PLoS ONE* — 2009. — Vol. 4 (3). — P. 4851.
7. Jayakumar J., Suzuki K., Khan M., Smolenski R.T., Farrell A., Latif N., Raisky O., Abunasra H., Sammut I.A., Murtuza B., Amrani M., Yacoub M.H. Gene transfer for myocardial protection: transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury // *Circulation*. — 2000. — Vol. 102 (3). — P. 302-306.
8. Jong P.R., Schadenberg A.W.L., Jansen N.J.G., Prakken B.J. Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effect // *Cell Stress and Chaperones*. — 2009. — Vol. 14. — P. 117-131.
9. Macario A. J. L., de Macario E. C. Molecular chaperones: Multiple functions, pathologies, and potential application // *Frontiers in Bioscience*. — 2007. — Vol. 12 (1). — P. 2588-2600.
10. Meng X., Harken A.H. The interaction between HSP70 and TNF- α expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression // *Shock*. — 2002. — Vol. 17 (5). — P. 345-353.
11. Milner C.M., Champell R.D. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes // *Immunogenetics*. — 1990. — Vol. 32. — P. 242-251.
12. Pociot F., Ronningen K.S., Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) // *Scand. J. Immunol*. — 1993. — Vol. 38. — P. 491-495.
13. Robitaille J., Pérusse L., Bouchard C., Vohl M.-C. Risk Factors and Chronic Disease. Genes, Fat Intake, and Cardiovascular Disease Risk Factors in the Quebec Family Stud // *Obesity*. — 2007. — Vol. 15 (9). — P. 2336-2347.
14. Suzuki K., Sawa Y., Kagisaki K., Taketani S., Ichikawa H., Kaneda Y., Matsuda H. Reduction in

myocardial apoptosis associated with over expression of heat shock protein 70 // Basic Res Cardiol. — 2000. — Vol. 95. — P. 397-403.

15. Zhou F., Wang F., Li F., Yuan J., Zeng H., Wei Q., Tanguay R.M, Wu T. Association of *hsp70-2* and *hsp-hom* gene polymorphisms with risk of acute

high-altitude illness in a Chinese populatio // Cell Stress Chaperones. — 2005. — Vol. 10 (4). — P. 349-356.

поступила в редакцию 09.06.2010

отправлена на доработку 16.06.2010

принята к печати 21.06.2010