

Ассоциация полиморфизма гена аннексина A2 с особенностями коронарной анатомии у больных с острым коронарным синдромом

**А.О. Аверкова¹, В.А. Бражник^{1,2}, Г.И. Спешилов^{3,4}, А.А. Рогожина¹,
О.С. Королева¹, Е.А. Зубова², Д.А. Затейщиков^{1,2}**

¹ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УД Президента РФ, Москва,

²ГБУЗ «Городская клиническая больница №51» Департамента здравоохранения г. Москвы,

³ФГУН «Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича» Российской академии наук, Москва,

⁴ООО «Ридсенс» Троицкого наноцентра Фонда инфраструктурных и образовательных программ «Роснано», Москва

Association of annexin A2 gene polymorphism with features of coronary anatomy in patients with acute coronary syndrome

**А.О. Averkova¹, V.A. Brazhnik^{1,2}, G.I. Speshilov^{3,4}, A.A. Rogozhina¹,
O.S. Koroleva¹, E.A. Zubova², D.A. Zateyshchikov^{1,2}**

¹Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russia,

²City Clinical Hospital №51, Moscow, Russia, ³IITP RAS, Moscow, Russia,

⁴«Readsens» Troitsk nanocenter FIEP «Rosnano», Moscow, Russia

Аннотация

Участие PCSK9 в развитии атеросклероза в настоящее время активно изучается. Аннексин A2 – внутренний белок-ингибитор PCSK9. Полиморфизм rs17845226 гена ANXA2 ассоциирован с высоким уровнем липопротеидов низкой плотности (ЛНП) у здоровых добровольцев. Целью работы стало изучение возможности влияния данного полиморфизма на течение острого коронарного синдрома (ОКС).

Из 1034 пациентов с ОКС, включенных в исследование, анализ полиморфизма rs17845226 гена ANXA2 проведен у 235 больных (мужчины ≤55 лет, женщины ≤60 лет). Анализ данных коронароангиографии (КАГ) выполнен у 222 пациентов. Генотипирование проводилось с помощью аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Частота аллелей и генотипов полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2: 1 больной был носителем генотипа AA (0,4%), 32 больных – генотипа AC (13,6%), 202 больных – CC (86,0%); $\chi^2=0,05$, $p=0,82$. Доля пациентов мужского пола оказалась меньше среди носителей аллеля A (60,6% против 76,7%; $p=0,049$). XCH в анамнезе встречалась чаще у носителей минорного аллеля A (38,7% против 21,8%; $p=0,034$). Среди носителей минорного аллеля A полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2 была значимо больше доля больных с кальцинозом коронарных артерий (39,3% против 19,6%, $p=0,019$).

Носительство аллеля A в генотипе полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2 у больных ОКС ассоциировано с наличием коронарного кальциноза по данным КАГ и XCH в анамнезе, что может быть обусловлено тем, что аннексин A2 играет важную роль в раннем развитии осложнений атеросклероза за счет как своего влияния на уровень ЛНП, так и других функций, таких как участие в альтернативном пути фибринолиза и обмене кальция.

Ключевые слова: аннексин A2, PCSK9, острый коронарный синдром, коронарный кальциноз.

Abstract

Aim: PCSK9 has become one of the most promising targets in cholesterol and cardiovascular diseases. Annexin A2 is an endogenous protein inhibiting PCSK9 activity. AA genotype of ANXA2 gene SNP rs17845226 is associated with higher LDL levels. The aim of this research was to study the SNP influence on acute coronary syndrome (ACS) development.

Methods: 1034 pts with ACS were enrolled. Genotyping was performed in 235 pts (men ≤55, women ≤60 years of age) by RT-PCR with allele-specific primers. Coronary angiography (CAG) was performed and analyzed in 222 pts.

Results: The genotype distribution (CC/AC/A) compared with that expected in the Hardy–Weinberg model: 202 (86%)/ 32 (13,6%)/ 1 (0,4%); $\chi^2=0,05$, $p=0,82$. There were fewer male than female pts among allele A carriers (60,6% vs 76,7%; $p=0,049$). More pts with allele A suffered from chronic heart failure (38,7% vs 21,8%; $p=0,034$). Coronary calcification was identified in 39,3% pts with AC and AA genotypes and 19,6% pts with CC genotype ($p=0,019$).

Conclusion: The analysis showed that carrying of allele A in the genotype of ANXA2 gene SNP rs17845226 might be an accelerating factor of coronary atherosclerosis, which is confirmed by the association with coronary calcification and heart failure.

Key words: annexin A2, PCSK9, acute coronary syndrome, coronary calcification.

На сегодняшний день одним из самых новых и безопасных классов препаратов, направленных на коррекцию уровня липидов, являются ингибиторы пропротеиновой конвертазы субти-

лизин кексинового типа 9 (PCSK9) [1], в связи с чем представляет особый интерес изучение белка и гена аннексина A2, который является эндогенным ингибитором PCSK9.

Максимальная экспрессия аннексина A2 наблюдается в тканях легких, аорты, сердца и тонкого кишечника. Белок может существовать в форме мономера и гетеротетрамерного комплекса с p11. Он может располагаться в клеточном ядре, цитозоле и на мембране. В организме аннексин A2 отвечает за широкий спектр биологических функций, ассоциированных в первую очередь с процессами фибринолиза и гомеостаза эндотелиальных клеток [2]. На поверхности клетки он формирует гетеротетramer, который усиливает зависящую от активатора плазминогена активацию плазмина. При антифосфолипидном синдроме формирование антител к аннексину A2 ассоциировано с тромбозом, в то время как при острой промиелоцитарной лейкемии гиперэкспрессия аннексина A2 может способствовать гиперфибринолитическому кровотечению [3]. На сегодняшний день наиболее изучена связь аннексина A2 с прогрессированием онкологических заболеваний, ассоциация же с обменом липидов остается областью для дальнейшего активного исследования [4].

R1 домен аннексина A2 связывается с PCSK9, блокируя его возможность стимулировать разрушение рецепторов липопротеидов низкой плотности (ЛНПР) и, таким образом, регулируя уровень холестерина ЛНП [5].

Ген *ANXA2* расположен в хромосоме 15q22.2 и содержит 16 экзонов [6]. Однонуклеотидный полиморфизм домена R1 гена *ANXA2* rs17845226 (V98L) оказался ассоциирован с уровнем холестерина ЛНП, а именно у гомозигот по минорному аллелю уровень холестерина ЛНП на 18,8% выше, а также больше риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [7]. Целью данной работы стало изучение связи данного полиморфизма с острым коронарным синдромом (ОКС).

Характеристика больных и методы исследования

В работе использованы данные больных, отобранных из 1034 участников многоцентрового наблюдательного исследования больных ОКС, включение в которое проходило с 2014 по 2016 г. Протокол исследования подробно описан ранее [8]. Определение полиморфизма гена аннексина A2 (*ANXA2*) rs17845226 выполнено у 235 больных с «ранним» развитием ОКС (в возрасте ≤55 лет у мужчин и ≤60 лет у женщин).

Для исследования полиморфизма гена *ANXA2* rs17845226 в работе использовали готовую смесь 5x реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR, предназначенную для ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I (ЗАО “Евроген”, Москва). Олигонукле-

отидные праймеры синтезированы ЗАО “Евроген” (Москва). Геномную ДНК выделяли из цельной крови больных методом экстракции смесью фенола и хлороформа после инкубации образцов крови с протеиназой K в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Идентификацию аллелей полиморфных маркеров проводили с помощью аллель-специфической ПЦР на амплификаторе в режиме реального времени CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR, по 2.5 пкмоль каждого праймера, 25 нг геномной ДНК.

Условия амплификации фрагмента ДНК: предварительная денатурация 95°C/1 мин, 95°C /30 с, 59°C /30 с, 72°C /30 с – 35 циклов. Состав праймеров представлен в табл. 1.

Таблица 1
Праймеры для проведения исследования полиморфизма гена *ANXA2* rs17845226

Праймер	Аллель	Последовательность
Прямой А	A	TGTCTTCAATAGGCCAAATCAA
Прямой С	C	TGTCTTCAATAGGCCAAATCAC
Обратный	-	CCGGAGTGTCAAAGACTCA

При анализе данных ангиографии коронарных артерий, выполненной на аппарате Toshiba Infinix VF-i E6C1232026, оценивались количество пораженных артерий; артерия, кровоснабжающая инфарктную зону; тип поражения [выделялись стеноз, тромбоз (тромботическая окклюзия) и окклюзия (стеноз 100% просвета сосуда); в случае отсутствия артерии, кровоснабжающей инфарктную зону, а также при наличии признаков вазоспазма или миокардиальной компрессии тип поражения расценивался как неопределенный]; локализация поражения (могла бытьproxимальной, средней, дистальной; в случае поражения двух и более сегментов локализация расценивалась как комбинированная); наличие кальциноза (считалось определенным при наличии его выраженных или умеренных проявлений, определяемых как регистрация радиопотенциалов в области сосудистой стенки до инъекции контрастного вещества независимо от движения сердца или во время сердечного цикла соответственно) [9]; выполненная процедура – транслюминальная баллонная ангиопластика (ТЛБАП), механическая реканализация (МР), тромбэкстракция (ТЭ), стентирование артерии, кровоснабжающей инфарктную зону. Артерией, кровоснабжающей инфарктную зону, могли считаться передняя нисходящая артерия (ПНА),

правая коронарная артерия (ПКА), огибающая артерия (ОА), ствол левой коронарной артерии (ЛКА), в некоторых случаях имелись две и более артерии, кровоснабжающие инфарктную зону. У больных с ОКС без подъема ST и итоговым диагнозом «нестабильная стенокардия» артерия, кровоснабжающая инфарктную зону, определена не была, ситуация расценивалась как отсутствие значимой артерии. Оценка коронарного кальциноза проводилась качественно (компьютерная томография, являющаяся верифицированным методом количественной оценки кальциноза, в данном исследовании не выполнялась).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью стандартного статистического пакета программ IBM SPSS Statistics Version 23 для Windows. Для всех видов анализа статистически значимыми считали значения $p < 0,05$. Правильность распределения ча-

стот генотипов определялась соответствием равновесию Харди–Вайнберга ($p_i^2 + 2p_ip_j + p_j^2 = 1$) и рассчитывалась с помощью программного калькулятора Ген Эксперт.

Результаты и обсуждение

Частота аллелей и генотипов полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2 изучена у 235 больных. 1 больной был носителем генотипа AA (0,4%), 32 больных – генотипа AC (13,6%), 202 больных – CC (86,0%). Распределение частот генотипов не отличается от ожидаемого согласно уравнению Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,05$, $p = 0,82$). Были проанализированы клинические характеристики у 235 носителей разных генотипов гена ANXA2 (табл. 2).

Доля пациентов мужского пола оказалась меньше среди носителей аллеля A (60,6% против 76,7%; $p = 0,049$). Доля больных с ХСН в анамнезе оказа-

Таблица 2

Клинические и ангиографические характеристики у носителей разных генотипов полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2 (n=235)

Показатель	Носители генотипа AA и AC (n=33)	Носители генотипа CC (n=202)	p
Пол, мужчины	20 (60,6%)	155 (76,7%)	0,049
Возраст, годы	51,48±6,06	49,71±6,20	0,128
ИБС	25 (75,8%)	134 (66,3%)	0,283
АГ	28 (84,8%)	162 (80,2%)	0,615
СД	7 (21,2%)	34 (16,8%)	0,539
ХСН	13 (39,4%)	45 (22,3%)	0,034
Инсульт	3 (9,1%)	11 (5,4%)	0,412
Отягощенная наследственность	20 (60,6%)	97 (48,0%)	0,250
ННЛО	2 (6,1%)	26 (12,9%)	0,263
Курение	15 (45,5%)	121 (59,9%)	0,272
Алкоголь Злоупотребление алкоголем	18 (54,5%) 1 (3,0%)	137 (67,8%) 7 (3,5%)	0,094 0,421
ОКСбпST	15 (45,5%)	105 (52,0%)	0,487
ИМТ, кг/м ² ИМТ≥30 кг/м ²	29,92±6,80 12 (37,5%)	28,89±5,15 67 (33,3%)	0,314 0,644
Общий холестерин, ммоль/л	5,46±1,32	5,82±1,51	0,192
Холестерин ЛНП, ммоль/л	3,29±1,42	2,92±0,88	0,534
Холестерин ЛВП, ммоль/л	0,94±0,33	1,03±0,53	0,416
Триглицериды, ммоль/л	2,12±1,24	2,21±1,49	0,744
Глюкоза≥11,1 ммоль/л	4 (12,1%)	28 (14,0%)	0,779
Креатинин, мкмоль/л	95,52±21,89	96,52±37,47	0,884
ClCr, мл/мин/1,73м ²	102,50±33,33	101,79±27,68	0,898
Мочевая кислота, ммоль/л	415,11±146,15	421,21±136,88	0,861

Примечание: ANXA2 – аннексин A2; ИБС – ишемическая болезнь сердца; АГ – артериальная гипертензия; СД – сахарный диабет; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ННЛО – наследственные нарушения липидного обмена; ОКСбпST – острый коронарный синдром без подъема ST; ИМТ – индекс массы тела; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ЛВП – липопротеиды высокой плотности; ClCr – клиренс креатинина.

Таблица 3

Ангиографические характеристики в зависимости от генотипа полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2 (n=222)

	Носители генотипа AA и AC (n=28)	Носители генотипа CC (n=194)	p
Количество пораженных артерий:			
0	3 (10,7%)	12 (6,2%)	
1	4 (14,3%)	48 (24,7%)	
2	8 (28,6%)	57 (29,4%)	
3	9 (32,1%)	67 (34,5%)	
4	4 (14,3%)	10 (5,2%)	
Двух-, трехсосудистое + ствол	21 (75,0%)	134 (69,1%)	0,523
Трехсосудистое + ствол	15 (53,6%)	117 (60,3%)	0,497
Артерия, кровоснабжающая инфарктную зону:			
ПНА	10 (35,7%)	84 (43,3%)	
ПКА	8 (28,6%)	49 (25,3%)	
ОА	3 (10,7%)	30 (15,5%)	
Ствол ЛКА	1 (3,6%)	3 (1,5%)	
Два и более	0	3 (1,5%)	
Нет значимой	6 (21,4%)	25 (12,9%)	
Тип поражения:			
Стеноз	12 (42,9%)	77 (39,7%)	
Тромбоз	10 (35,7%)	87 (44,8%)	
Окклюзия	0	4 (2,1%)	
Неопределенное	6 (21,4%)	26 (13,4%)	
Локализация поражения:			
Проксимальная	6 (21,4%)	66 (34,0%)	
Средняя	12 (42,9%)	73 (37,6%)	
Дистальная	2 (7,1%)	16 (8,2%)	
Комбинированная	2 (7,1%)	15 (7,7%)	
Нет значимого	6 (21,4%)	24 (12,4%)	
Процедура:			
КАГ	8 (28,6%)	30 (15,5%)	
ТЛБАП	1 (3,6%)	1 (0,5%)	
ТЛБАП+стент	7 (25,0%)	73 (37,6%)	
МР+ТЛБАП+стент	10 (35,7%)	71 (36,6%)	
МР+ТЭ+ТЛБАП+стент	2 (7,1%)	19 (9,8%)	
Кальциноз	11 (39,3%)	38 (19,6%)	0,019

Примечание: ПНА — передняя нисходящая артерия; ПКА — правая коронарная артерия; ОА — огибающая артерия; ЛКА — левая коронарная артерия; КАГ — коронарная ангиография; ТЛБАП — транслюминальная баллонная ангиопластика; МР — механическая реканализация; ТЭ — тромбэкстракция.

лась больше среди носителей минорного аллеля *A* (38,7% против 21,8%; *p*=0,034). Различий по уровню липидов и другим биохимическим показателям, а также наличию отягощенной наследственности, клинически диагностированным наследственным нарушениям липидного обмена и таким факторам риска, как курение и злоупотребление алкоголем, между носителями различных генотипов полиморфизма rs17845226 гена *ANXA2* не обнаружено.

Из 225 больных, у которых проанализированы данные коронароангиографии, информация о генотипе полиморфного маркера гена *ANXA2* доступна у 222 пациентов.

Среди носителей минорного аллеля *A* полиморфного маркера rs17845226 гена *ANXA2* была значимо больше доля больных с кальцинозом коронарных артерий (39,3% против 19,6%, *p*=0,019). Отличий по количеству пораженных артерий, артерии, кровоснабжающей инфарктную зону, типу

поражения, локализации поражения, проведенной процедуре не показано (табл. 3).

В результате работы было выявлено, что у большой доли носителей минорного аллеля *A* полиморфного маркера rs17845226 гена *ANXA2* в анамнезе имеется хроническая сердечная недостаточность. Известно, что аннексины имеют в своей структуре участок для связывания с ионами Ca^{2+} и в зависимости от концентрации Ca^{2+} в кардиомиоцитах могут участвовать в изменении их сократительной активности [10]. Ранее данная ассоциация в источниках литературы описана не была.

Нами впервые в нашей стране и в мире установлена ассоциация носительства минорного аллеля *A* полиморфного маркера rs17845226 гена *ANXA2* и кальциноза коронарных артерий, что подтверждает важность участия аннексина *A2* в раннем развитии таких осложнений атеро-

склероза, как коронарный кальциноз, что может быть обусловлено не только влиянием аннексина A2 на уровень холестерина ЛНП, но и другими его функциями, в том числе участием в альтернативном пути фибринолиза [11]. Отсутствие отличий в уровне холестерина ЛНП в нашем исследовании у носителей генотипов AA и AC данного полиморфного маркера, которое было выявлено в исследовании Fairoozy и соавт. [7], включавшем более 30 000 обследуемых, может быть обусловлено малым размером выборки для получения статистически значимых различий.

Таким образом, впервые описана связь носительства минорного аллеля А полиморфного маркера rs17845226 гена ANXA2 с хронической сердечной недостаточностью в анамнезе и кальцинозом коронарных артерий по данным ангиографии у больных ОКС, что может указывать на вероятно стимулирующее воздействие носительства данного полиморфизма в отношении коронарного атеросклероза и прогрессирования сердечной недостаточности.

Литература

1. Ito M.K., Santos R.D. PCSK9 Inhibition With Monoclonal Antibodies: Modern Management of Hypercholesterolemia. *J. Clin. Pharmacol.* 2017; 57(1): 7-32. doi: 10.1002/jcph.766.
2. Ly K., Saavedra Y.G., Canuel M. et al. Annexin A2 reduces PCSK9 protein levels via a translational mechanism and interacts with the M1 and M2 domains of PCSK9. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(25): 17732-17746. doi: 10.1074/jbc.M113.541094.
3. Luo M., Hajjar K.A. Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Seminars Thrombos. Hemostas.* 2013; 39(4): 338-346. doi: 10.1055/s-0033-1334143.
4. Christensen M.V., Hogdall C.K., Jochumsen K.M., Hogdall E.V.S. Annexin A2 and cancer: A systematic review. *Int. J. Oncol.* 2018; 52(1): 5-18. doi: 10.3892/ijo.2017.4197.
5. Seidah N.G., Poirier S., Denis M. et al. Annexin A2 Is a Natural Extrahepatic Inhibitor of the PCSK9-Induced LDL Receptor Degradation. *PLOS ONE* 2012;7(7):e41865. doi: 10.1371/journal.pone.0041865
6. Moss S.E., Morgan R.O. The annexins. *Genome Biology.* 2004; 5(4): 219. doi: 10.1186/gb-2004-5-4-219.
7. Fairoozy R.H., Cooper J., White J. et al. Identifying low density lipoprotein cholesterol associated variants in the Annexin A2 (ANXA2) gene. *Atherosclerosis.* 2017; 261(Suppl. C): 60-68. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.010.
8. Затейщиков Д.А., Волкова Э.Г., Гузь И.О., Евдокимова М.А., Аseyчева О.Ю., Галявиц А.С. и др. Лечение больных, перенесших острый коронарный синдром, по данным Российского многоцентрового проспективного наблюдательного исследования. *Фарматека* 2009; (12): 109-113 [Zateyshchikov D.A., Volkova E.G., Guz I.O., Evdokimova M.A., Aseycheva O.Y., Galyavich A.S. et al. Treatment of patients with acute coronary syndrome bases on the results of Russian multicenter prospective observational trial. Farmateka. 2009; (12): 109-113. In Russian].
9. Madhavan M.V., Tarigopula M., Mintz G.S. et al. Coronary Artery Calcification: Pathogenesis and Prognostic Implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63(17): 1703-1714. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.017.
10. Camors E., Monceau V., Charlemagne D. Annexins and Ca²⁺ handling in the heart. *Cardiovascular research.* 2005; 65(4): 793-802. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.11.010.
11. Hajjar K.A. The Biology of Annexin A2: From Vascular Fibrinolysis to Innate Immunity. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* 2015; 126: 144-155. ISSN: 0065-7778.

Для корреспонденции/Corresponding author

Аверкова Анастасия Олеговна/ Averkova Anastasia
avek@mail.ru

Конфликт интересов отсутствует