

Genetisk betinget reduktion i antioxidativ beskyttelse og øget risiko for iskæmisk hjertesygdom – sekundærpublikation

Østerbroundersøgelsen

Reservelæge Klaus Juul, overlæge Anne Tybjærg-Hansen, professor Stefan Marklund, overlæge Niels H.H. Heegaard, overlæge Rolf Steffensen, overlæge Henrik H. Sillesen, overlæge Gorm B. Jensen & overlæge Børge Grønne Nordestgaard

Amtssygehuset i Herlev, Klinisk Biokemisk Afdeling, H:S Rigshospitalet, Klinisk Biokemisk Afdeling, Umeå Universitetssyghus, Klinisk Kemisk Afdeling, Sverige, Statens Serum Institut, Autoimmunafdelingen, Hillerød Sygehus, Kardiologisk Afdeling, Amtssygehuset i Gentofte, Karkirurgisk Afdeling, og H:S Bispebjerg Hospital, Østerbroundersøgelsen

Resumé

Introduktion: Ekstracellulær superoxiddismutase (EC-SOD) er et antioxidativt enzym, der findes i høj koncentration i arterievæggen. 2-3% af danskere bærer en R213G-substitution, der øger plasmakoncentrationen ti gange. Mutationen reducerer muligvis koncentrationen i arterievæggen, øger lavdensitetslipoprotein (LDL)-oxidationen og kan derfor accelerere aterosklerose. Vi testede hypoteserne, at EC-SOD-R213G disponerer for iskæmisk hjertesygdom (IHD), og at bestemmelse af EC-SOD-R213G-genotype bidrager til at prædikere IHD ud over måling af plasma EC-SOD-koncentrationen.

Materiale og metoder: Den primære hypotese blev testet i et prospektivt, populationsbaseret studie af 9.188 deltagere i Østerbroundersøgelsen med 956 incidente IHD-tilfælde i løbet af 23 års followup og blev retestet i to case-kontrol-studier, hvor 943 IHD-patienter og 617 patienter med iskæmisk cerebrovaskulær sygdom (ICVD) blev sammenlignet med 7.992 IHD/ICVD-frie kontrolpersoner fra Østerbroundersøgelsen. Den sekundære hypotese blev testet i et nestet IHD-case-kontrol-studie inden for Østerbroundersøgelsen (n = 956 + 956).

Resultater: Alders- og kønsjusteret relativ risiko for IHD for heterozygot (n = 221, 2,4%) versus ikkebærere (n = 8.965, 97,6%) var 1,5 (95% sikkerhedsinterval 1,1-2,1). Retestning bekræftede dette: odds-ratioer for IHD var 1,4 (1,0-2,0) og for ICVD 1,7 (1,1-2,7). Yderligere justering for plasma-EC-SOD resulterede i en odds-ratio på 9,2 (1,2-72).

Diskussion: Heterozygositet for EC-SOD-R213G er relateret til øget IHD-risiko. Bestemmelse af EC-SOD-R213G-genotype bidrager til at prædikere IHD ud over måling af plasma EC-SOD-koncentrationen.

Oxidative processer er involveret i aterosklerose [1], og superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) er et vigtigt prooxidativt molekyle.

Det mest betydningsfulde ekstracellulære enzym, der fjerner superoxidationer er ekstracellulær superoxiddismutase (EC-SOD) [2]. Mere end 90% af EC-SOD er lokaliseret i det ekstravaskulære rum bundet til heparansulfatproteoglykaner i glykokalyks på endotelcellernes overflade og i bindevævsmatrix, især i arterievæggen [3].

Vi undersøgte en relativt almindelig mutation (nukleotid 760G >C) i codon 213 i exon 3 af EC-SOD genen (EC-SOD-R213G). Heterozygot bærere af EC-SOD-R213G har ~10 gange højere plasmakoncentration af funktionel EC-SOD end ikkebærere [4]. Man forestiller sig, at denne forskel skyldes øget udvaskning af EC-SOD fra interstitial matrix til plasma [4, 5]. EC-SOD-koncentrationen i arterievæggen er derfor muligvis lav på trods af en høj plasmakoncentration. Arterievæggen mangler dermed antioxidativ kapacitet mod superoxidationer og mangler beskyttelse mod lavdensitetslipoprotein (LDL)-oxidation. Dette kunne medføre accelereret aterosklerose.

Formålet med dette studie var at teste følgende hypoteser: 1) EC-SOD-R213G heterozygositet er relateret til øget risiko for iskæmisk hjertesygdom (IHD); 2) EC-SOD-R213G-genotype bidrager til at prædikere IHD ud over måling af plasma EC-SOD-koncentrationen og autoantistoffer mod oxideret LDL (oxLDL); og 3) EC-SOD-R213G-heterozygositet og homozygositet er relateret til plasma-EC-SOD og autoantistoffer mod oxLDL.

Materiale og metoder

Studiedesign

Prospektivt studie

For at teste primærhypotesen blev 9.188 deltagere i Østerbroundersøgelsen fulgt prospektivt fra indgangen i studiet i 1976-1978, 1981-1983, eller 1991-1994 indtil 1999. Oplysninger om IHD- og iskæmisk cerebrovaskulær sygdom (ICVD)-diagnoser (World Health Organization, International Classification of Diseases, 8. udgave, koderne 410-414 og 432-435; 10. udgave I20-I25 og I63-I64) blev indhentet indtil 1999 fra Landspatientregistret, Dødsårsagsregistret og fra journaloplysninger fra praktiserende læger og hospitaler.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

Case-kontrol-studier

For at reteste primærhypotesen med uafhængige patientpopulationer blev 943 patienter med koronararteriestenose/IHD (verificeret ved koronararteriografi) og 617 patienter med carotis stenose/ICVD (ultralydverificeret) fra Rigshospitalet sammenlignet med 7.992 ikkematchedede kontrolpersoner fra Østerbrounderøgelsen, som hverken havde IHD eller ICVD.

Nestede case-kontrol-studier

For at teste sekundærhypotesen blev de 956 incidente IHD tilfælde i Østerbrounderøgelsen matchet 1:1 på alder og køn med kontrolpersoner uden IHD/ICVD fra Østerbrounderøgelsen. For at teste tertiærhypotesen blev alle EC-SOD-R213G-heterozygote og homozygote matchet 1:1 på alder, køn og IHD-status med ikkebærere.

Statistiske analyser

Vi anvendte statistikprogrammet Stata. Tosidede p-værdier <0,05 blev regnet for signifikante. Log-rank-test og Kaplan-Meier-kurver er vist for prospektive data. Relativ risiko (RR) for IHD blev estimeret ved hjælp af venstretrunkerede *Cox proportional hazard*-modeller (dvs. modeller med forsinket indgang) med alder som tidsskala; dette betyder, at der automatisk er justeret for alder. Ubetingede logistiske regressionsmodeller estimerede odds-ratioer (OR) for koronar aterosklerose/IHD og carotis aterosklerose/ICVD i ikkematchedede case-kontrol-studier. Betingede logistiske regressionsmodeller estimerede OR for IHD i de nestede case-kontrol-studier. RR og OR er udelukkende vist for heterozygote versus ikkebærere, idet der kun var to homozygote.

Resultater

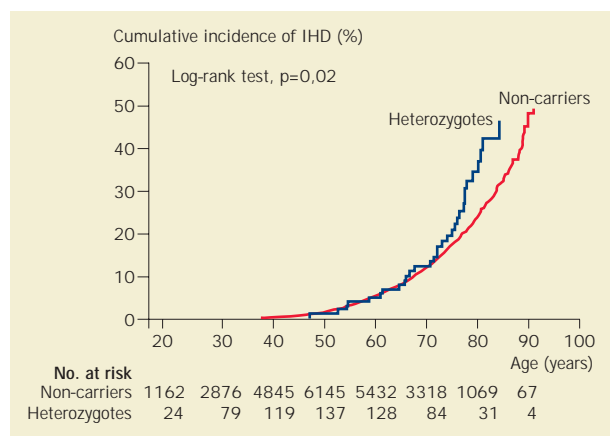
Blandt deltagerne i Østerbrounderøgelsen var 8.965 (97,6%), 221 (2,4%) og 2 (0,02%) henholdsvis ikkebærere, heterozygote og homozygote for EC-SOD-R213G.

Prospektivt studie

I løbet af 23 års followup (162.071 personår) forekom der i kohorten 956 IHD-tilfælde svarende til incidensrater blandt ikkebærere, heterozygote og homozygote på henholdsvis 58, 90 og 323 tilfælde pr. 10.000 personår (**Figur 1**) (log-rank-heterozygote versus ikkebærere: $p = 0,02$). Alders- og kønjusteret RR for IHD hos heterozygote versus ikkebærere var 1,5 (95% sikkerhedsinterval, 1,1-2,1). Yderligere justering for totalcholesterol, HDL-kolesterol, triglycerider, *body mass index*, hypertension, rygning og diabetes mellitus resulterede i en RR på 1,5 (1,0-2,1).

Casekontrolstudier

Alders- og kønjusteret OR for IHD hos heterozygote versus ikkebærere var 1,4 (1,0-2,1) (**Tabel 1**). Multifaktoriel justering for de samme kovariater som nævnt ovenfor resulterede i en OR på 1,4 (0,9-2,2). Alders- og kønjusteret og multifaktorielt



Figur 1. Kumulativ incidens af iskæmisk hjertesygdom (IHD) som funktion af EC-SOD-R213G-genotype. Antal deltagere under risiko i hver tiårsperiode er vist under grafen.

justeret OR for ICVD hos heterozygote versus ikkebærere var 1,7 (1,1-2,7) og 1,9 (1,2-3,0).

Nestede case-kontrol-studier

Den ikkejusterede OR for IHD hos heterozygote versus ikkebærere i dette køns- og aldersmatchede studie var 2,1 (1,1-4,5). Multifaktoriel justering resulterede i en OR på 2,3 (1,2-4,5) (**Figur 2**). Yderligere justering for plasma-EC-SOD resulterede i en OR hos heterozygote versus ikkebærere på 9,2 (1,2-72). Justering for autoantistoffer mod oxLDL resulterede i en OR på 2,5 (1,2-5,3).

Blandt EC-SOD-R213G ikkebærere havde deltagere med en plasma-EC-SOD-koncentration på 150-300 og >300 ng pr. ml en multifaktorielt justeret OR for IHD på 0,9 (0,7-1,2) og 0,5 (0,2-1,6) i forhold til deltagere med en koncentration <150 ng pr. ml (**Figur 2**). Endvidere havde deltagere med autoanti-

Tabel 1. Risiko for iskæmisk hjertesygdom (IHD) og iskæmisk cerebrovaskulær sygdom (ICVD) i case-kontrol-studierne.

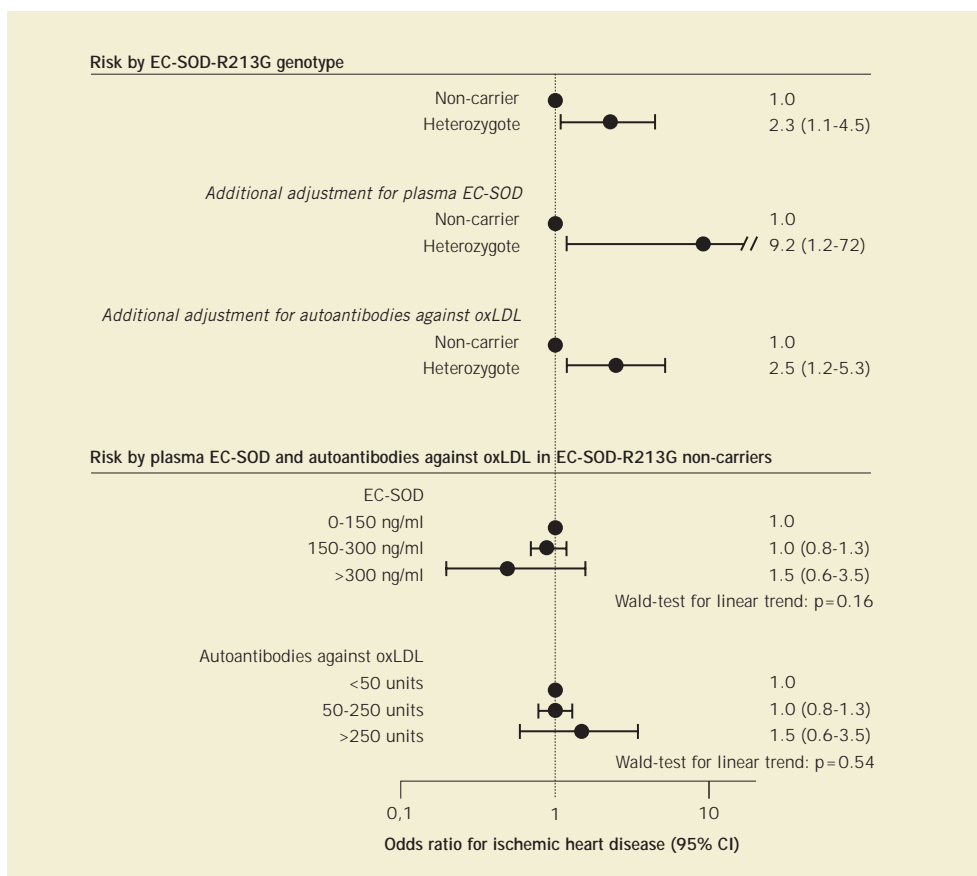
	IHD		ICVD	
	ikke-bærere	heterozygote	ikke-bærere	heterozygote
Antal (cases/kontrolpersoner)	913/7.809	30/182	594/7.699	23/183
Odds-ratio*				
justeret for køn og alder	1,0	1,4 (1,0-2,1)	1,00	1,7 (1,1-2,7)
justeret multifaktorielt ^a	1,0	1,4 (0,9-2,2)	1,00	1,9 (1,2-3,1)

* 95% sikkerhedsinterval.

^a Odds-ratioer for IHD og ICVD for de kovariater, der er inkluderet i de to modeller: mandligt køn: 3,2 (2,6-3,8) og 2,3 (1,9-2,8), alder (>50 versus ≤50 år): 1,4 (1,1-1,7) og 5,7 (4,0-8,0), totalcholesterol (>5 versus ≤5 mmol pr. l): 1,7 (1,3-2,1) og 1,4 (1,0-1,8), HDL-kolesterol (>1 versus ≤1 mmol pr. l): 0,3 (0,2-0,3) og 0,5 (0,4-0,6), triglycerid (>2 versus ≤2 mmol pr. l): 0,9 (0,8-1,1) og 1,0 (0,8-1,3), *body mass index* (>25 versus ≤25 kg pr. m²): 0,9 (0,8-1,1) og 0,6 (0,5-0,7), hypertension (behandlet): 4,2 (3,5-5,1) og 1,3 (1,1-1,6), rygning (nævrende og tidligere versus aldrig): 1,3 (1,0-1,6) og 0,8 (0,6-1,0), diabetes mellitus: 2,1 (1,6-2,9) og 3,6 (2,7-5,0). Der var ingen homozygote i de to patientpopulationer.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

Figur 2. Odds-ratioer for iskæmisk hjertesygdom (IHD) som funktion af EC-SOD-R213G-genotype, plasma-EC-SOD og autoantistoffer mod oxideret lavdensitetslipoprotein (LDL) hos EC-SOD-R213G-ikkebærere. Alle odds-ratioer er multifaktorielt justerede som i Tabel 1.



stoffer mod oxLDL på 50-250 U og >250 U en multifaktorielt justeret OR for IHD på 1,0 (0,8-1,3) og 1,5 (0,6-3,5) i forhold til deltagere med en koncentration på <50 U (Figur 2). Plasma-EC-SOD-koncentrationer blandt heterozygote og homozygote var 1.278 ± 27 ng pr. ml (gennemsnit \pm SEM) og 4.148 ± 266 ng pr. ml sammenlignet med 142 ± 1 ng pr. ml blandt alders-, køns- og IHD-status-matchedede ikkebærere ($p < 0,001$) (Figur 3). I modsætning hertil var EC-SOD-R213G-genotype ikke relateret til autoantistoffer mod oxLDL ($p = 0,38$).

Diskussion

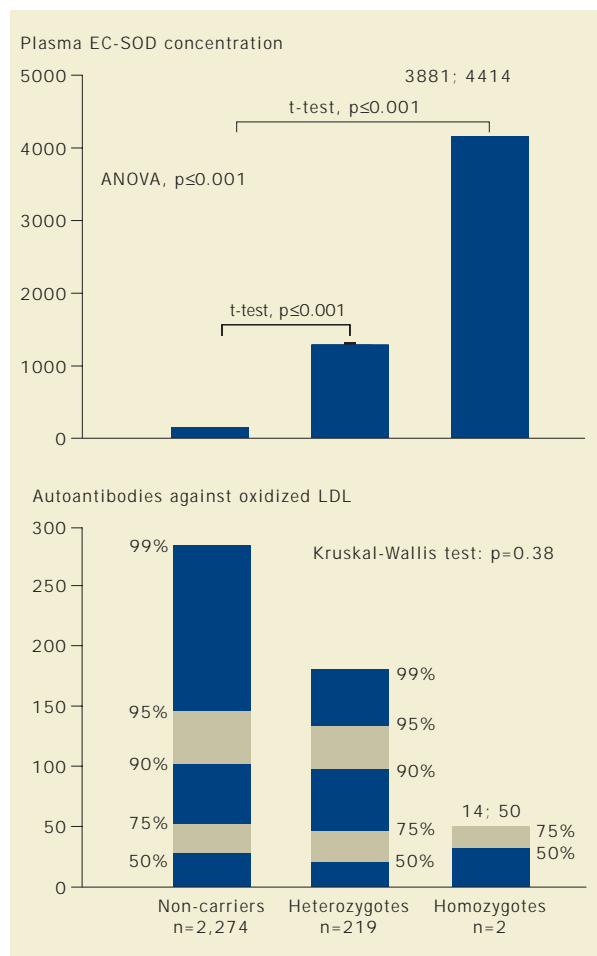
I dette studie vises for første gang, at EC-SOD-R213G er relateret til øget risiko for IHD i den generelle befolkning, og at EC-SOD-R213G bidrager med prædiktiv information, ud over hvad der ligger i måling af EC-SOD-plasma-koncentration og auto-antistoffer mod oxLDL. EC-SOD-R213G heterozygositet og homozygositet var relateret til nifold og 31-fold plasmakoncentration af EC-SOD i forhold til hos ikkebærere. Imidlertid var EC-SOD-niveaue hos ikkebærere ikke relateret til IHD-risiko. Endvidere var EC-SOD-R213G-genotype ikke relateret til auto-antistoffer mod oxLDL, og disse autoantistoffer var ikke relateret til IHD-risiko.

Vi mener, at vores observation af en øget IHD-risiko blandt EC-SOD-R213G-heterozygote giver biologisk mening. R213G-substitutionen i EC-SOD er lokaliseret i en gruppe af

seks positivt ladede aminosyrer, der er årsag til interaktionen mellem EC-SOD og negativt ladede sulfaterede glukosaminoglykaner. En EC-SOD-variant med en heparinaffinitet svarende til den, der ses ved EC-SOD-R213G, tabes fire gange hurtigere fra bindingen til heparansulfat i interstitial matrix end det normale enzym [6]. Man har derfor forestillet sig, at nedsat binding af EC-SOD i interstitial matrix kunne medføre en nedsat EC-SOD-koncentration i arterievæggen, selv om dette aldrig har været vist. Antager man, at denne sammenhæng er rigtig, vil en genotype, der er relateret til lokal reduktion i antioxidant kapacitet kunne øge LDL-oxidationen i karvæggen, hvilket kunne fremme aterosklerose og IHD-udvikling. Ydermere, fordi både EC-SOD og autoantistoffer mod oxLDL er plasmamålinger, som formentlig ikke afspejler forholdene lokalt i arterievæggen hos EC-SOD-R213G-bærere, kunne denne mekanisme forklare, hvorfor relationen mellem EC-SOD-R213G og IHD er uafhængig af plasma-EC-SOD og autoantistoffer mod oxLDL.

For at undersøge, om kendskab til EC-SOD-R213G-genotype bidrager med prædiktiv information om IHD, ud over den information der ligger i måling af plasmakoncentrationen af EC-SOD, bestemte vi OR for IHD hos heterozygote i forhold til ikkebærere efter justering for EC-SOD. En sådan justering sikrer, at en direkte sammenhæng mellem plasmakoncentration og IHD ikke maskerer en sammenhæng mellem

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION



Figur 3. Plasma-EC-SOD og autoantistoffer mod oxideret lavdensitetslipoprotein (LDL) som funktion af EC-SOD-R213G-genotype. Søjler i den øverste figur repræsenterer gennemsnit (+ SEM). Søjler i den nederste figur er percentiler, idet disse data ikke var normalfordelt.

EC-SOD-R213G-genotype og IHD, især hvis gentypen ikke virker via ændringer i plasmakoncentrationen, som det er sandsynligt for EC-SOD-R213G. Hvis EC-SOD-R213G-genotype indeholdt den samme information som en plasmakoncentrationsmåling, ville justering for plasmakoncentration af EC-SOD have resulteret i en OR tæt på 1. Det faktum, at OR øgedes fra 2,3 til 9,2, støtter imidlertid den hypotese, at EC-SOD-R213G-heterozygote, trods en høj plasma-EC-SOD-koncentration, har EC-SOD-mangel i arterievæggen og derfor har en øget IHD-risiko.

Implikationer

Selv om der findes en stor mængde data fra interventionsstudier med hyperkolesterolemiske dyremodeller og antioxidanter, som støtter den hypotese, at oxidative processer er af betydning i aterosengenese, har en sådan intervention hos mennesker været skuffende [1]. Ikke desto mindre er det muligt, at en subgruppe af mennesker med øget »oxidativt stress« vil have gavn af antioxidativ intervention. Interessant er det, at man i et studie, der i særlig grad understøtter oxidationshypo-

tesen, viste, at E-vitamin reducerede forekomsten af klinisk koronarsygdom hos patienter i hæmodialyse – en tilstand, der bl.a. er kendetegnet ved øget oxidativt stress [7]. Et studie som vores, hvori der defineres en subgruppe, der på genetisk baggrund har en reduktion i et relevant antioxidativt enzym, er derfor potentielt vigtigt.

Vi konkluderer, at EC-SOD-R213G-heterozygositet øger risikoen for IHD i den generelle befolkning. Ydermere bidrager bestemmelse af EC-SOD-R213G-genotype med prædiktiv information, ud over hvad der ligger i måling af plasmakoncentrationen af EC-SOD og auto-antistoffer mod oxLDL.

Korrespondance: *Børge G. Nordestgaard*, Klinisk Biokemisk Afdeling, Amtssygehuset i Herlev, DK-2730 Herlev. E-mail: brno@herlevhosp.kbhamt.dk

Antaget: 27. august 2004

Acknowledgement: This study was supported by the Danish Heart Foundation, Chief Physician Johan Boserup and Lise Boserup's Fund, Lykfeldt's Fund, Dagmar Marshall's Fund, Wedelborg's Fund, Lily Bentline Lund's Fund, the Beckett Fund, and P. Carl Petersen's Fund. The skillful technical assistance of biotechnicians Nina Dahl, Karin Hjertkvist, and Ewa Kogutowska is gratefully acknowledged.

This article is based on a study first reported in the *Circulation* 2004;109:59-65.