

На правах рукописи

БЛАГОДАТСКИХ КОНСТАНТИН АЛЕКСАНДРОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *CRP, IL6, IL10, TNF* И *LTA* С РАЗВИТИЕМ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА У БОЛЬНЫХ, ПЕРЕНЁСШИХ ОСТРЫЙ КОРОНАРНЫЙ СИНДРОМ

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
ФГУП «ГосНИИ генетика», г. Москва

Носиков Валерий Вячеславович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
Московская медицинская академия
им. И.М.Сеченова, г. Москва

Асанов Алий Юрьевич

доктор биологических наук, профессор,
Кафедра медицинской генетики ГОУ ДПО
РМАПО, г. Москва.

Немцова Марина Вячеславовна

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН, г.Москва

Защита состоится «__» мая 2011 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика».

Реферат разослан «__» апреля 2011 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Воюшина Т. Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются лидирующей причиной смертности во всём мире: ни по какой другой причине ежегодно не умирает столько людей, сколько от ССЗ. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2004 году от ССЗ умерло 17,1 миллиона человек, что составило 29% всех случаев смерти в мире. Согласно прогнозам, в 2030 году около 23,6 миллионов человек умрёт от ССЗ, главным образом, от болезней сердца и инсульта, которые останутся наиболее вероятными причинами смерти. Россия, к сожалению, по этому показателю не является исключением (Оганов и Масленникова, 2007).

Известно, что сердечно-сосудистые патологии – многофакторные заболевания с многочисленными звеньями патогенеза. Для таких заболеваний характерен сложный механизм формирования фенотипа, в основе которого лежит взаимодействие генетических факторов с факторами внешней среды. При этом для каждого конкретного заболевания можно выделить группу, так называемых, генов-кандидатов, продукты которых могут быть прямо или косвенно вовлечены в развитие данной патологии (Goldbourt et al., 1994).

Исследование молекулярно-генетических основ многофакторных заболеваний относится к одной из наиболее серьёзных задач современной генетики. Знание генетических факторов, предрасполагающих к развитию заболевания и его осложнений, имеет важное прогностическое значение и может использоваться при досимптоматической диагностике, то есть до появления каких-либо клинических или биохимических симптомов болезни. В нашей стране подобные исследования проводятся на протяжении многих лет (Сидоренко и др. 2009).

Обычно, для изучения генетической предрасположенности к тому или иному заболеванию используют подход «случай-контроль», однако для больных с различными формами атеросклероза крайне сложно подобрать правильную контрольную группу, поскольку нет возможности выявить доклинические формы атеросклероза, с одной стороны, и учесть умерших к моменту обследования, с другой. Другой подход – проведение длительного проспективного наблюдения за группой больных повышенного риска, с регистрацией, так называемых, «конечных точек» более сложен и трудоёмок, однако в этом случае возможен последующий анализ факторов, ассоциированных с неблагоприятными исходами.

Ранее преобладавшие представления об атеросклерозе как о заболевании, обусловленном преимущественно нарушением метаболизма отдельных фракций холестерина, в настоящее время претерпели существенные изменения. Прогрессирование атеросклероза, особенно патогенез его осложнённых форм, сегодня связывают не только с воздействием на сосудистый эндотелий липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), но и с

развитием воспалительного ответа в поражённой области сосудистой стенки. Роль воспаления, по-видимому, наиболее значима в развитии острых коронарных синдромов, в основе которых лежит формирование уязвимой атеросклеротической бляшки (Титов, 1999; Paoletti et al., 2004). При этом нарушения в системах воспалительного ответа могут усугубляться генетическими особенностями, влияющими на структуру и скорость формирования этих процессов. Гены, кодирующие эти факторы, можно рассматривать в качестве кандидатов для изучения наследственной предрасположенности к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца (ИБС) у больных, перенёсших острый коронарный синдром (ОКС).

Установление ассоциации гена с заболеванием и последующая оценка индивидуального генетического риска имеют большое значение для разработки дифференцированного подхода к профилактике и лечению данной патологии и её осложнений. Подобные исследования позволяют точнее и надёжнее оценивать генетический риск развития заболевания и прогнозировать его течение (Pratt and Dzau, 1999).

Цели и задачи работы. Целью данной работы было изучение ассоциации полиморфных маркеров ряда генов-кандидатов, продукты которых определяют развитие воспалительных процессов, с неблагоприятным исходом у больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Создать компьютерную программу для подбора оптимальных условий проведения анализа однонуклеотидных полиморфизмов методом полиморфизма длины рестриктазных фрагментов.
2. Определить аллели и генотипы полиморфных маркеров генов, кодирующих С-реактивный белок (*CRP*), интерлейкин 6 (*IL6*), интерлейкин 10 (*IL10*), фактор некроза опухоли (*TNF*) и лимфотоксин альфа (*LTA*).
3. Провести сравнительный анализ времени дожития до конечных точек у больных, перенёсших острый коронарный синдром, – носителей различных генотипов полиморфных маркеров выбранных генов-кандидатов в исследованной выборке больных для выявления вклада генетических факторов в развитие неблагоприятных исходов.

Научная новизна работы. Создана компьютерная программа для подбора оптимальных условий проведения анализа однонуклеотидных полиморфизмов методом полиморфизма длины рестриктазных фрагментов.

- Впервые исследована ассоциация полиморфных маркеров *G2667C*, *G3014A*, *C3872T* и *A5237G* гена *CRP*, *G(-174)C* гена *IL6*, *G(-1082)A* гена *IL10*, *G(-308)A* гена *TNF*, и *Thr26Asn* гена *LTA* с развитием острого коронарного синдрома.

- Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *A5237G* и комбинации генотипов полиморфных маркеров *G3014A*, *C3872T*, *A5237G* гена *CRP* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе больных, перенёвших острый коронарный синдром.
- Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *G(-1082)A* гена *IL10* и комбинации генотипов полиморфных маркеров *G(-174)C* гена *IL6* и *G(-1082)A* гена *IL10* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе больных, перенёвших острый коронарный синдром при краткосрочном прогнозе (18 мес.).
- Обнаружена выраженная ассоциация полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе больных, перенёвших острый коронарный синдром.

Практическая ценность работы. Выявление ассоциации полиморфных маркеров генов с развитием острого коронарного синдрома (ОКС) открывает новые перспективы в выделении групп пациентов с высоким риском развития патологии. Полученные данные об ассоциации полиморфных маркеров *G3014A*, *C3872T* и *A5237G* гена *CRP*, *G(-174)C* гена *IL6*, *G(-1082)A* гена *IL10* и *G(-308)A* гена *TNF* с развитием неблагоприятного исхода в группе больных, перенёвших ОКС, позволяют внедрить генетическое тестирование больных ИБС для выделения лиц, имеющих максимальную предрасположенность к развитию неблагоприятных исходов.

Апробация работы. Диссертационная работа была апробирована на заседании Секции молекулярной биологии Учёного Совета ФГУП «ГосНИИ генетика» 7 апреля 2011 г. Материалы работы были представлены на VI съезде Российского Общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, Россия, 14 – 19 мая 2010 г.); 78-ом съезде Европейского атеросклеротического Общества (г. Гамбург, Германия, 20 – 23 июня 2010 г.); X ежегодной международной молодёжной конференции ИБХФ РАН - ВУЗы «Биохимическая физика» (г. Москва, Россия, 8 – 10 ноября 2010 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, включая 3 статьи, а также материалы конференций.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 129 страницах машинописного текста и содержат 11 таблиц и 18 рисунков. В работе процитированы зарубежные (294) и отечественные (21) литературные источники.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Создание программы для подбора оптимальных условий проведения анализа однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) методом полиморфизма длины рестриктазных фрагментов (ПДРФ)

Несмотря на то, что метод ПДРФ является достаточно простой в понимании и реализации процедурой, ручной подбор условий для его успешного проведения может вызывать определенные трудности. Часто, для выбора рестриктазы, имеющей подходящий участок узнавания и приемлемую цену, требуется использование праймеров с заменами в области 3'-конца. Качество подобранных праймеров должно отвечать определённому набору характеристик: соответствие температур отжига, отсутствие димеров, шпилек и других вторичных структур, определённая длина получаемого продукта. Все эти условия можно учитывать и при ручном подборе, однако он требует больших затрат времени и значительного опыта в проведении анализа методом ПДРФ. Для упрощения такого подбора было разработано множество алгоритмов и программ, но большинство из них неудобны в использовании или позволяют проводить только часть операций: подбор праймеров или поиск рестриктаз для заданного участка узнавания.

Основной из используемых программ является Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000), для которой был создан расширенный веб-интерфейс Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). Primer Design Assistant (Chen et al., 2003) – программа с веб-интерфейсом, использующая термодинамическую теорию для оценки пригодности праймеров; WASP (Wangkumhang et al., 2007) – веб-интерфейс создания аллель-специфической ПЦР для анализа ОНП и мутаций; Primer Z (Tsai et al., 2007) – создание праймеров для промоторов, экзонов и ОНП человека; SNPbox (Weckx et al., 2005) – программа для широкомасштабных исследований ОНП; и, наконец, Prim-SNPing (Chang et al., 2009) – программа с веб-интерфейсом для создания мутагенных праймеров.

Только одна из этих программ – Prim-SNPing – предоставляет возможность поиска рестриктаз для ПДРФ-анализа, но и она ограничена по своим возможностям (отсутствие критериев для оценки вносимых в последовательность замен оснований и возможность только одной такой замены; отсутствие выбора используемых при анализе рестриктаз по производителям и цене; довольно низкая информативность получаемых результатов).

SNPicker (Niu and Hu, 2004) – ещё одна из программ для подбора условий генотипирования ОНП методом ПДРФ с возможностью создания мутагенных праймеров. Но, к сожалению, она не имеет веб-интерфейса и её развитие, по-видимому, давно приостановлено. Недостаток функциональности всех этих отдельных приложений привел нас к идее создания собственной интегрированной программы для подбора условий

генотипирования ОНП с использованием одного из самых распространённых и проверенных методов – ПДРФ.

Первоначально, при создании программы «FastRFLP» основной нашей целью была автоматизация создания замен оснований в нуклеотидной последовательности рядом с ОНП для применения более эффективных и/или дешёвых рестриктаз. Данный подход широко применяется в практике, но требует значительных затрат времени при «ручном» исполнении. Однако после проверки ряда созданных таким образом систем идентификации аллелей ОНП оказалось, что часть замен значительно затрудняет прохождение ПЦР или даже делает его полностью невозможным. Поэтому было решено разработать систему оценки замен на основе подхода, предложенного в работе Литтла (Little, 2001).

Для оценки затрат на покупку выбранной рестриктазы в нашей разработке используется фильтр по цене. Дополнительно приводится стоимость рестриктазы для генотипирования конкретного полиморфного маркера, что позволяет более точно оценивать затраты на проведение генотипирования больших выборок исследуемых образцов.

После выбора рестриктазы требуется подобрать праймеры, поэтому был разработан модуль для связи нашей программы с Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). Параметры подбора праймеров и формат вывода результатов соответствуют используемым в программе Primer3. Отличием является отображение участков узнавания для выбранной рестриктазы на нуклеотидной последовательности. Это сделано для того, чтобы сразу же увидеть дополнительно появившиеся нежелательные участки узнавания.

Таким образом, нами была разработана программа, веб-интерфейс которой позволяет подбирать праймеры и рестриктазы для идентификации аллелей ОНП методом ПДРФ. Существенными преимуществами программы являются возможность подбирать праймеры с заменами на 3'-конце и рассчитывать ориентировочную стоимость анализа с использованием выбранной рестриктазы.

2. Исследование ассоциации полиморфных маркеров ряда генов-кандидатов с острым коронарным синдромом (ОКС)

Исследование, в котором участвовало 16 медицинских центров из семи городов России (Москва, Казань, Пермь, Челябинск, Ставрополь, Ростов-на-Дону, Санкт-Петербург), проводилось с декабря 2004 г. по август 2010 г.

В исследование включены больные (всего 1 145 человек, Табл. 1), поступившие в стационар в связи с развитием ОКС. Больные, у которых в результате ОКС не сформировался инфаркт миокарда (ИМ) с зубцом Q, должны были поступить в стационар не позднее 72 часов от момента начала заболевания и иметь, по крайней мере, один из следующих дополнительных критериев:

- депрессия сегмента ST, по крайней мере, на 1 мм в двух соседних отведениях

- инверсия зубца T не менее 3 мм
- транзиторный подъем сегмента ST
- повышение уровня кардиоспецифических ферментов в крови (сердечная креатининфосфокиназа, тропонины)

Срок наблюдения за больными составил 62,5 мес.

Анализ генотипов полиморфных маркеров проводился методом ПДРФ и гибридизационно-флуоресцентным анализом (TaqMan® анализ).

Таблица 1.

Характеристика группы больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Показатель	Группа больных
Пол (М/Ж)	717 / 428
Конечные точки	452
Возраст, лет*	61,36 ± 11,70
Курящие	467
Нестабильная стенокардия/инфаркт миокарда без зубца Q	663
Инфаркт миокарда с зубцом Q	550
Рецидив инфаркта во время госпитализации	21
Эпизоды тяжелой ишемии во время госпитализации	158
Новые ишемические изменения на электрокардиограмме во время госпитализации	46

* Средний возраст ± стандартное отклонение.

2.1. Исследование ассоциации полиморфных маркеров G2667C, G3014A, C3872T и A5237G гена CRP с ОКС

Частоты генотипов полиморфных маркеров G2667C, G3014A, C3872T, A5237G гена CRP были определены у всех пациентов (Табл. 2). Только у носителей аллеля G полиморфного маркера A5237G достоверно чаще наблюдался неблагоприятный исход – по сравнению с носителями генотипа AA (Рис. 1). Время дожития до конечной точки у носителей генотипов GA и GG составило 45,7 месяцев (95% CI 42,71–48,68) против 49,8 месяцев (95% CI 47,44–52,15) у носителей генотипа AA ($\chi^2 = 4,0$; $p = 0,046$). В случае полиморфных маркеров G2667C, G3014A, C3872T у больных – носителей разных генотипов – частоты развития неблагоприятного исхода значимо не отличались.

Несмотря на то, что не для всех изученных полиморфных маркеров была обнаружена значимая ассоциация с неблагоприятными исходами, нами была выявлена тенденция: носительство редких аллелей других полиморфных маркеров гена CRP увеличивает частоту неблагоприятных исходов. Поэтому для обнаружения совместного влияния полиморфных маркеров гена CRP нами была выделена группа больных – носителей редких аллелей полиморфных маркеров G3014A, C3872T, A5237G (комбинация генотипов AG и AA маркера

G3014A, генотипов *TC* и *TT* маркера *C3872T* и генотипов *AG* и *GG* маркера *A5237G*), представленная 41 человеком.

Таблица 2.

Частоты генотипов полиморфных маркеров *G2667C*, *C3014T*, *G3872A* и *A5237G* гена *CRP* у больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Полиморфный маркер	Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>G2667C</i> (rs1800947)	<i>GG</i>	954	83
	<i>GC</i>	183	16
	<i>CC</i>	8	<1
<i>G3014A</i> (rs1130864)	<i>GG</i>	550	48
	<i>GA</i>	481	42
	<i>AA</i>	114	10
<i>G3872A</i> (rs1205)	<i>GG</i>	344	30
	<i>GA</i>	595	52
	<i>AA</i>	206	18
<i>A5237G</i> (rs2808630)	<i>AA</i>	676	59
	<i>AG</i>	401	35
	<i>GG</i>	68	6

Полиморфный маркер *G2667C* был исключён из рассмотрения, так как больных – носителей комбинации редких аллелей по всем четырём полиморфным маркерам обнаружено не было, что возможно связано с низкой встречаемостью редкого аллеля данного полиморфного маркера или меньшей выживаемостью таких больных ещё на стадии первого случая инфаркта миокарда. На рис. 2 видно, что время дожития до конечной точки у пациентов из группы носителей редких аллелей полиморфных маркеров *G3014A*, *C3872T*, *A5237G* составило 33,5 месяцев (95% CI 23,98–43,02), тогда как у остальных пациентов – 47,0 месяцев (95% CI 45,26–48,73) ($\chi^2 = 7,4$; $p = 0,0064$). Это указывает на аддитивный эффект полиморфных маркеров и необходимость учитывать взаимное влияние маркеров в подобных исследованиях. Несмотря на половой диморфизм подверженности ИБС, при разделении исследуемой выборки на мужчин и женщин зависимости частоты неблагоприятных исходов от пола больного для полиморфных маркеров *G2667C*, *G3014A*, *C3872T*, *A5237G* гена *CRP* обнаружено не было. Возможно, это связано с уменьшением числа конечных точек в результате разделения на группы.

Повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) достоверно связано с риском развития ССЗ. Значимость этого параметра в прогнозе течения заболевания не уступает более традиционным факторам риска (повышение уровней общего холестерина, ЛПНП, липопротеина А, гомоцистеина и др.), а в ряде случаев превосходит их (Danesh et al., 2000; Ridker et al., 2000; Ridker et al., 2002; Buckley et al., 2009). Уровень СРБ повышается прямо

пропорционально тяжести коронарного стеноза (Memon et al., 2006), а риск ИМ, в свою очередь, повышается при увеличении СРБ.

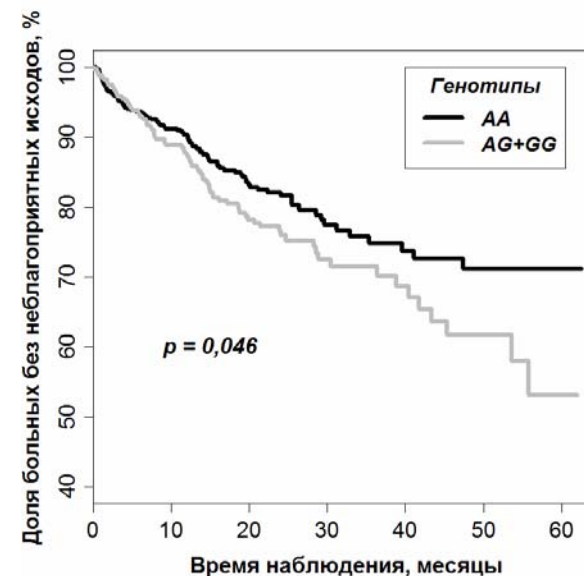


Рис. 1. График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей генотипов *AA* и *AG+GG* полиморфного маркера *A5237G* гена *CRP* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

В настоящее время интенсивно изучается связь полиморфных маркеров гена *CRP* с уровнем СРБ. Ассоциация полиморфных маркеров с уровнем экспрессии генов может быть объяснена прямой или непрямой связью, например, сцеплением с иной, непосредственно влияющей на экспрессию белка, областью гена. Выбранные нами полиморфные маркеры *G3014A*, *C3872T* и *A5237G* расположены в 3'-нетранслируемой области гена *CRP*. Эти полиморфные маркеры не находятся в эволюционно консервативной области, таким образом, их функциональная значимость остаётся неясной.

Одно из возможных объяснений влияния этих полиморфных маркеров на экспрессию гена *CRP* – это изменение стабильности мРНК, подобно описанному влиянию функционально важного маркера в 3'-нетранслируемой области гена протромбина (Gehring et al., 2001). Регуляция стабильности мРНК – потенциально важный этап в биосинтезе СРБ, так как известно, что мРНК гена *CRP* имеет достаточно короткое время полураспада – приблизительно 2,5 часа (Lozanski et al., 1996). В противоположность описанным выше полиморфным маркерам, маркер *G2667C* находится в эволюционно консервативной области экзона 2 гена *CRP*. Полиморфизму *G/C* в кодоне 184 соответствует два синонимичных

кодона *CTC* и *CTG*, которые кодируют одну аминокислоту – лейцин. Однако наличие разных нуклеотидов в этом положении может изменять уровень экспрессии гена в связи с разным количеством соответствующих кодону тРНК (Post et al., 1979), а также влиять на вторичную структуру мРНК (Shen et al., 1999) и, как следствие, на количество белка. К сожалению, в рамках нашего исследования отсутствие достоверной ассоциации полиморфного маркера *G2667C* с неблагоприятными исходами не позволяет подтвердить или опровергнуть такие предположения.

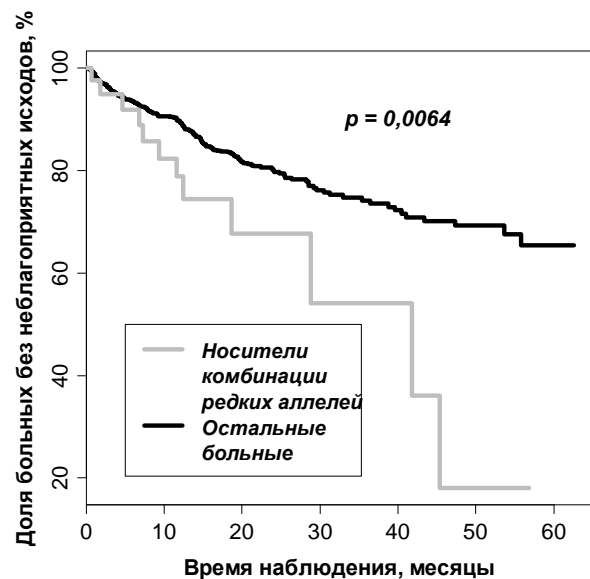


Рис. 2. График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей редких аллелей полиморфных маркеров *G3014A*, *C3872T*, *A5237G* (комбинация генотипов *AG* и *AA* маркера *G3014A*, генотипов *TC* и *TT* маркера *C3872T*, и генотипов *AG* и *GG* маркера *A5237G*) гена *CRP* и остальных пациентов в зависимости от времени, прошедшего после обострения ИБС.

Таким образом, носительство генотипов *AG* и *AA* маркера *G3014A*, генотипов *TC* и *TT* маркера *C3872T*, и генотипов *AG* и *GG* маркера *A5237G*, вероятно, связано с повышенным уровнем СРБ и, следовательно, риском неблагоприятных исходов у больных, перенёсших ОКС.

2.2. Исследование ассоциации полиморфного маркера *G(-174)C* гена *IL6* с ОКС

Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-174)C* гена *IL6* были определены у всех пациентов (Табл. 3). Ассоциации с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенёсших ОКС, обнаружено не было. Однако оказалось, что при рассмотрении данного

полиморфного маркера совместно с полиморфным маркером *G(-1082)A* гена *IL10* у носителей генотипа *GG* полиморфного маркера *G(-174)C* риск неблагоприятного течения ИБС повышен (см. раздел 2.3.). Такой результат можно объяснить, принимая во внимание данные проведённых ранее исследований. В ранее проведённых исследованиях ассоциации полиморфного маркера *G(-174)C* гена *IL6* с ССЗ обнаружено, что носители генотипа *GG* имеют повышенный риск развития ССЗ (Basso et al., 2002; Antonicelli et al., 2005; Myśliwska et al., 2006). В условиях *in vitro* секреция интерлейкина 6 значимо более высокая у носителей генотипа *GG*, чем у носителей генотипов *GC* или *CC* (Myśliwska et al., 2006). Повышение уровня интерлейкина 6 приводит к гиперреактивности у носителей генотипа *GG*. Показано, что для экспрессии гена *IL6* необходимо формирование комплекса совместно действующих транскрипционных факторов, в состав которого входят факторы NF-κB, NF-IL6, C-JUN/AP-1. Наличие в положении -174 промоторной области гена остатка *G* формирует участок связывания фактора NF-1 (Fishman et al., 1998; Terry et al., 2000; Rivera-Chavez et al., 2003). При исследовании трансфицированных геном *IL6* клеток (Fishman et al., 1998) и при исследовании культур клеток крови (Rivera-Chavez et al., 2003) было обнаружено, что при наличии аллеля *G* уровень экспрессии гена *IL6* выше, чем при наличии аллеля *C* в положении -174.

Таблица 3.

Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-174)C* гена *IL6* у больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Полиморфный маркер	Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>IL6</i> <i>G(-174)C</i> (rs1800795)	<i>CC</i>	196	17,1
	<i>CG</i>	592	51,7
	<i>GG</i>	357	31,2

Интерлейкин 6, являясь важным звеном воспалительной реакции, может вызывать как новые повреждения тканей, так и расширять повреждение существующих областей. Этот эффект может быть опосредован активированными моноцитами (Adams and Shaw, 1994) и за счёт ускоренного размножения Т-хелперов (Zhou et al., 1996). Такое допущение можно сделать, отталкиваясь от экспериментов на животных. У мышей, предрасположенных к атеросклерозу, инъекция интерлейкина 6 вызывает более сильные повреждения тканей (Huber et al., 1999). Интерлейкин 6 может усиливать коагуляцию и тромбоз из-за стимуляции агрегации тромбоцитов, экспрессии тканевых факторов и синтеза фибриногена (Paoletti et al., 2004). Считается, что переход атеросклеротической бляшки из стабильной формы в нестабильную, также как и дальнейшее развитие ОКС, зависят от наличия интерлейкина 6 (Fishman et al., 1998). Одна из его функций – это повышение уровня белков острой фазы,

таких как СРБ (Heinisch et al., 2005), что, в свою очередь, увеличивает риск развития ССЗ (Pai et al., 2008).

Всё описанное выше позволяет сделать вывод: у носителей генотипа *GG* полиморфного маркера *G(-174)C* гена *IL6* имеет место повышенная экспрессия гена *IL6*, что может приводить к большей интенсивности воспалительного процесса и последующему неблагоприятному течению ИБС.

2.3. Исследование ассоциации полиморфного маркера *G(-1082)A* гена *IL10* с ОКС

Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-174)C* гена *IL10* были определены у всех пациентов (Табл. 4). При наблюдении за больными в течение 62,5 мес. ассоциации с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенёсших ОКС, обнаружено не было. Однако при определении краткосрочного прогноза (срок наблюдения за больными – 18 мес.) носители генотипов *AA* и *AG* полиморфного маркера *G(-1082)A* гена *IL10* чаще имели неблагоприятный исход, по сравнению с носителями генотипа *GG* (Рис. 3). Время дожития до конечной точки составило 11,70 месяцев (95% CI 10,99–12,41) против 12,60 месяцев (95% CI 11,94–13,26) у носителей генотипа *GG* ($\chi^2 = 4,13$; $p = 0,042$), что говорит об ассоциации генотипов *AA* и *AG* с повышенным риском развития ИБС.

Таблица 4.

Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-1082)A* гена *IL10* у больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Полиморфный маркер	Генотип	Число пациентов	Частота встречаемости, %
<i>IL10</i> <i>G(-1082)A</i> (rs1800896)	<i>GG</i>	608	53,1
	<i>GA</i>	429	37,5
	<i>AA</i>	108	9,4

На основании литературных и полученных нами данных, для дальнейшего исследования совместного влияния полиморфных маркеров гена *IL6* и гена *IL10* больных разделили на четыре группы (Табл. 5). Минимальное время дожития до конечной точки оказалось у пациентов из группы Г4 (Рис. 4) и составило 11,09 месяцев (95% CI 9,81–12,37), максимальное – у пациентов из группы Г1 и составило 13,10 месяцев (95% CI 12,30–13,90) ($\chi^2 = 10,23$; $p = 0,017$).

Интерлейкин 10 выполняет множество противовоспалительных функций, в том числе, подавляет действие предшественника воспалительного транскрипционного фактора NF-κB. При этом снижается уровень синтеза цитокинов (Wang et al., 1995), экспрессируются гены тканевых факторов, а также угнетается апоптоз макрофагов и моноцитов после инфекции. Множество исследований показало, что системное или локальное изменение уровня интерлейкина 10 не только смягчает развитие атеросклероза (Mallat et al., 1999; Pinderski et al., 1999; Von Der Thüsen et al., 2001), но и снижает повреждение тканей (Pinderski et al., 2002).

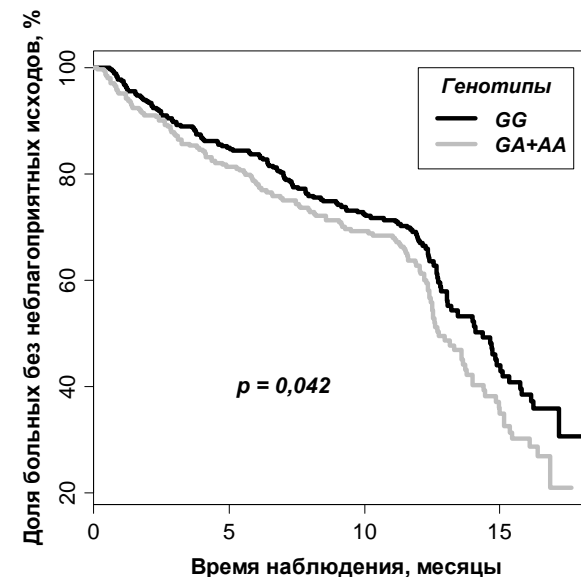


Рис. 3. График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей генотипов *GG* и *GA+AA* полиморфного маркера *G(-1082)A* гена *IL10* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

Полиморфный маркер *G(-1082)A* гена *IL10*, по-видимому, ассоциирован с регуляцией экспрессии гена *IL10*, так как нуклеотид в положении –1082 входит в состав участка связывания фактора PU.1, который является репрессором транскрипции гена *IL10*. При этом у носителей аллеля *A* уровень связывания фактора PU.1 выше, чем у носителей аллеля *G* (Smith et al., 2001).

Таблица 5.

Характеристика групп больных, перенёсших острый коронарный синдром, при исследовании совместного влияния полиморфных маркеров генов *IL6* и *IL10* ($\chi^2 = 10,23$, $p = 0,017$).

Название группы	Генотипы полиморфных маркеров		Число пациентов (%)	Время дожития, месяцы (95% CI)
	<i>G(-174)C</i> гена <i>IL6</i>	<i>G(-1082)A</i> гена <i>IL10</i>		
Г1	<i>CC</i> и <i>CG</i>	<i>GG</i>	437 (38,2)	13,10 (12,30–13,90)
Г2	<i>CC</i> и <i>CG</i>	<i>GA</i> и <i>AA</i>	347 (30,3)	11,80 (10,84–12,76)
Г3	<i>GG</i>	<i>GG</i>	200 (17,5)	12,10 (10,83–13,37)
Г4	<i>GG</i>	<i>GA</i> и <i>AA</i>	161 (14,0)	11,09 (9,81–12,37)

Таким образом, у носителей аллеля *A* синтез интерлейкина 10, возможно, понижен. Это приводит к более выраженной воспалительной реакции, которая, в свою очередь, повышает риск неблагоприятного течения ИБС (Malarstig et al., 2008).

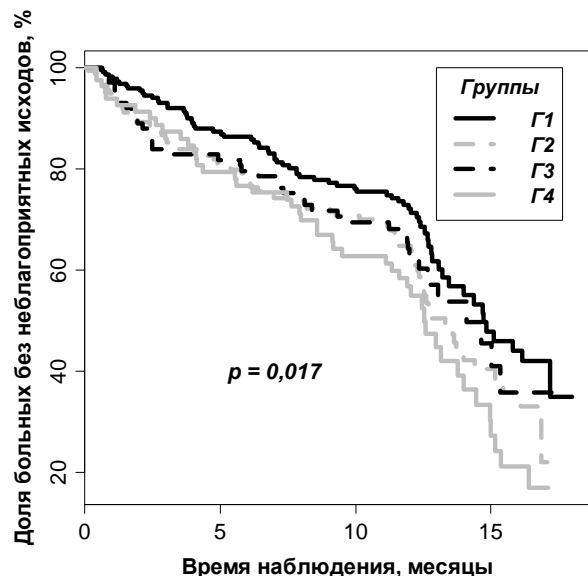


Рис. 4. График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов в группах носителей генотипов Г1, Г2, Г3 и Г4 (Табл. 5) в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

2.4. Исследование ассоциации полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* с ОКС

Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* были определены у всех пациентов (Табл. 6). У носителей аллеля *A* полиморфного маркера *G(-308)A* чаще наблюдался неблагоприятный исход – по сравнению с носителями генотипа *GG*. Время дожития до конечной точки у носителей генотипов *GA* и *AA* составило 43,30 месяцев (95% CI 40,04–46,56) против 49,6 месяцев (95% CI 47,38–51,82) у носителей генотипа *GG* ($\chi^2 = 15,4$; $p < 0,001$) (Рис. 5).

Полученные нами данные соответствуют результатам проведённого в 2011 году мета-анализа, в котором европеоиды – носители аллеля *A* имели в 1,5 раза больший риск развития ССЗ, по сравнению с носителями генотипа *GG* (*AG+AA* против *GG*, OR=1,50, 95% CI: 1,23–1,77) (Zhang et al., 2011).

Уровень фактора некроза опухоли (ФНО) в плазме крови повышен у пациентов с ССЗ и может увеличивать риск сердечных патологий через воздействие на эндотелий сосудов (Plutzky, 2001). У носителей аллеля *A* выше уровень транскрипции гена *TNF* (Wilson et al., 1997; Allen, 1999).

Таблица 6.

Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* у больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Полиморфный маркер	Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>TNF</i> <i>G(-308)A</i> (rs1800629)	<i>GG</i>	721	63,1
	<i>GA</i>	412	35,8
	<i>AA</i>	12	1,1

Молекулярный механизм такого изменения не до конца ясен, так как различий в силе взаимодействия факторов транскрипции с двумя аллельными вариантами полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* обнаружено не было, по крайней мере, для клеточной линии *Raji*. Возможно в результате различий в укладке ДНК в полиморфной области, взаимодействие транскрипционных факторов с этим участком различается у носителей разных аллелей, что приводит к усилению трансактивации гена *TNF*. Несмотря на то, что полиморфный маркер лежит в последовательности связывания транскрипционного фактора AP2, повышения уровня связывания AP2 в условиях *in vitro* с полиморфной областью обнаружено не было (Wilson et al., 1997).

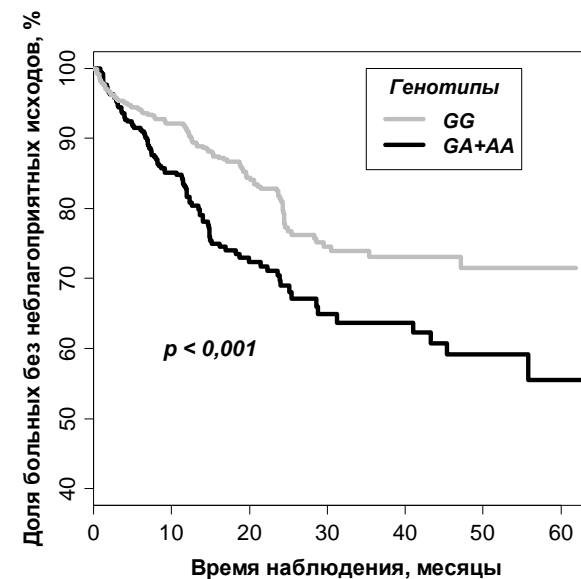


Рис. 5. График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей генотипов *GG* и *GA+AA* полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

Таким образом, нами показан высокий уровень ассоциации полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* с частотой неблагоприятных исходов у больных, перенёсших ОКС, однако молекулярный механизм, приводящий к такому результату, не до конца ясен.

2.5. Исследование ассоциации полиморфного маркера *Thr26Asn* гена *LTA* с ОКС

Частоты генотипов полиморфного маркера *Thr26Asn* гена *LTA* были определены у всех пациентов (Табл. 7). Ассоциации с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенёсших ОКС (Рис. 6), обнаружено не было ($p > 0,05$). При разделении исследуемой выборки на мужчин и женщин значимая ассоциация также не была обнаружена.

Таблица 7.

Частоты генотипов полиморфного маркера *Thr26Asn* гена *LTA* у больных, перенёсших острый коронарный синдром.

Полиморфный маркер	Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>LTA</i> <i>Thr26Asn</i> (rs1041981)	<i>ThrThr</i>	557	53,3
	<i>ThrAsn</i>	407	38,9
	<i>AsnAsn</i>	81	7,8

Наши результаты совпадают с рядом исследований. Так при изучении связи полиморфных маркеров гена *LTA* с ИМ в нескольких работах значимой ассоциации получено не было (Koch et al., 2001; Yamada et al., 2004). Также при проведении мета-анализа, учитывающего результаты нескольких независимых исследований, ассоциации с ССЗ получено не было (Clarke et al., 2006).

Возможно с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенёсших ОКС, ассоциированы другие полиморфные маркеры гена *LTA*, например, такие маркеры, как *Cys804Ala* или *Gly10Ala*. Поэтому для окончательных выводов об отсутствии связи гена *LTA* с частотой неблагоприятных исходов требуется проведение дополнительных исследований.

3. Заключение

В настоящее время, представления об атеросклерозе (основной причине ИБС и ОКС), как о процессе накопления липидных частиц в сосудистой стенке в течение всей жизни, претерпели значительные изменения. Современные наблюдения выводят на первый план воспалительный процесс во всех фазах развития атеросклероза: раннем атерогенезе, прогрессировании повреждений и, наконец, формировании тромботических осложнений. Клинические исследования подтверждают корреляцию циркулирующих маркеров воспаления с предрасположенностью к ишемическим нарушениям и прогнозом течения ОКС.

Воспаление внутри атеросклеротического повреждения или вне его может ускорить развитие атеромы и привести к состоянию острого течения заболевания. Циркулирующие

реагенты острой фазы, привлечённые во время воспалительного процесса, могут являться не только маркерами повышенного риска сосудистых нарушений, но и в некоторых случаях участвовать в их патогенезе.

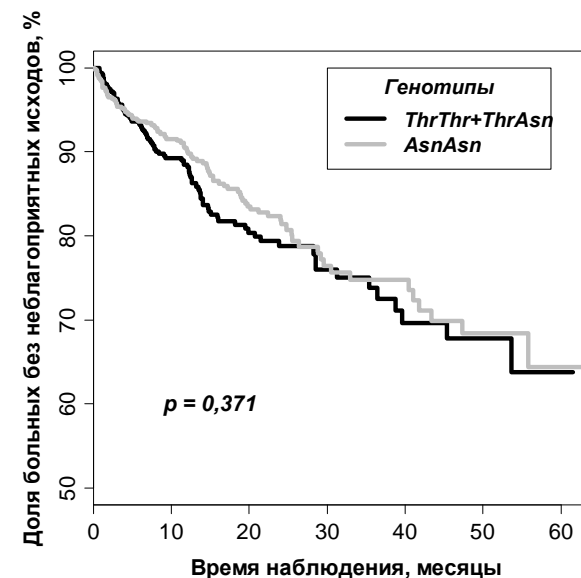


Рис. 6. График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей генотипов *ThrThr+ThrAsn* и *AsnAsn* полиморфного маркера *Thr26Asn* гена *LTA* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

Большинство случаев ССЗ возникает при взаимодействии различных условий среды и генетических факторов, однако ни одно из этих условий не может вызвать заболевание само по себе. Факторы внешней среды для данной группы заболеваний известны давно и довольно хорошо исследованы, тогда как в изучении генетических основ ССЗ мы находимся только в начале пути. Проведено множество исследований по типу «случай-контроль», в которых получены данные об ассоциации ряда генов с возникновением или течением ССЗ.

К сожалению, невозможность подобрать адекватную группу контроля и отсутствие возможности рассматривать процесс в динамике при проведении таких исследований резко снижает практическую значимость полученных результатов. Недостатков исследований по типу «случай-контроль» лишены, так называемые, «проспективные» исследования, примером которого и является данная работа. При этом изучаются не две группы больных: с наличием заболевания и «условно здоровые» (отсутствие заболевания тяжело подтвердить вследствие латентности атеросклеротического повреждения, смазанности клинической картины, широких границ возраста возникновения заболевания), а только достоверно больные люди. В таком случае изучается не наличие или отсутствие заболевания, а скорость

его развития и тяжесть процесса, то есть дожитие до выбранных исследователем «конечных точек».

Для проспективных исследований требуется большой объём выборок больных, длительный процесс наблюдения за течением заболевания (в течение нескольких лет), точное и своевременное фиксирование изменения состояния и лечения больных, что затрудняет возможность проведения таких работ. К счастью, в нашем случае, все эти трудности, с помощью коллег из «клинической» группы (врачей из 16 медицинских центров семи городов России), удалось преодолеть.

Таким образом, нами получены данные об ассоциации ряда генов, вовлечённых в процесс воспаления, с неблагоприятными исходами в группе больных, перенёвших острый коронарный синдром. Непосредственно эти данные невозможно использовать для «предсказания» заболеваний, требуется привлечение большого количества не только генетических (работы в данном направлении активно продолжаются в нашей лаборатории), но и биохимических, эпидемиологических, а также других факторов. После привлечения максимально возможного спектра данных такие оценки могут быть получены при использовании специализированных вероятностных моделей – «байесовских сетей доверия», которые позволяют вычислять условных вероятности развития неблагоприятных исходов без выделения отдельных компонентов. Однако даже на данном этапе, полученные нами результаты свидетельствуют в пользу необходимости внедрения генетического тестирования больных ИБС для выделения лиц, имеющих максимальную предрасположенность к развитию неблагоприятных исходов.

ВЫВОДЫ

1. Создана компьютерная программа для подбора оптимальных условий проведения анализа однонуклеотидных полиморфизмов методом полиморфизм длины рестриктазных фрагментов.

2. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *A5237G* и комбинации генотипов полиморфных маркеров *G3014A*, *C3872T*, *A5237G* гена *CRP* с неблагоприятными исходами (нефатальный и фатальный инфаркт миокарда, нефатальный и фатальный инсульт) в группе больных, перенёвших острый коронарный синдром. В случае полиморфного маркера *A5237G* носители генотипов *GG* и *AG* имеют повышенный риск – по сравнению с носителями генотипа *AA*. При рассмотрении комбинаций генотипов полиморфных маркеров гена *CRP* было обнаружено, что в случае группы больных – носителей генотипов *AG* и *AA* маркера *G3014A*, генотипов *TC* и *TT* маркера *C3872T*, и генотипов *AG* и *GG* маркера *A5237G*, чаще наблюдался неблагоприятный исход – по сравнению с группой носителей других комбинаций генотипов.

3. При определении краткосрочного прогноза (18 мес.) носители генотипов *AA* и *AG* полиморфного маркера *G(-1082)A* гена *IL10* чаще имели неблагоприятный исход – по сравнению с носителями генотипа *GG*. При исследовании совместного влияния полиморфных маркеров *G(-174)C* гена *IL6* и *G(-1082)A* гена *IL10* неблагоприятные исходы наблюдались чаще в группе носителей генотипов *GG* маркера *G(-174)C* гена *IL6* и генотипов *AA* и *AG* маркера *G(-1082)A* гена *IL10* – по сравнению с другими больными.

4. Обнаружена выраженная ассоциация полиморфного маркера *G(-308)A* гена *TNF* с неблагоприятными исходами в группе больных, перенёвших острый коронарный синдром. У носителей генотипов *AA* и *AG* данного полиморфного маркера чаще наблюдался неблагоприятный исход по сравнению с носителями генотипа *GG*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **К.А. Благодатских**, М.А. Евдокимова, Ю.В. Агапкина, А.Г. Никитин, А.Н. Бровкин, А.А. Пушков, Е.Г. Благодатских, О.Ю. Кудряшова, В.С. Осмоловская, Л.О. Минушкина, М.С. Кочкина, Н.Д. Селезнева, Е.Н. Данковцева, О.С. Чумакова, Т.Н. Бакланова, П.А. Тальзин, Н.Е. Резниченко, О.П. Донецкая, С.Н. Терещенко, Е.С. Красильникова, Н.А. Джаиани, Е.В. Акатова, М.Г. Глезер, А.С. Галявич, В.Б. Закирова, Н.А. Казилова, И.В. Тимофеева, М.А. Ягода, О.И. Боева, Л.И. Кательницкая, Е.В. Хоролец, С.В. Шлык, Э.Г. Волкова, М.П. Маргарян, И.О. Гузь, В.О. Константинов, А.Н. Тимофеев, Б.А. Сидоренко, Д.А. Затейщиков, В.В. Носиков. *Полиморфные маркеры G(-174)C гена IL6 и G(-1082)A гена IL10 и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром*. Молекулярная биология. – 2010. – том 44, №5. – стр. 839–846.
2. **К.А. Благодатских**, А.Г. Никитин, Е.Г. Благодатских, В.В. Носиков. *FastRFLP: сетевая программа для подбора условий проведения анализа однонуклеотидных полиморфизмов методом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов*. Биотехнология. – 2011. – №1. – стр. 60–66.
3. **К.А. Благодатских**, А.Г. Никитин, А.А. Пушков, Е.Г. Благодатских, В.С. Осмоловская, О.Ю. Асейчева, Т.Н. Бакланова, П.А. Тальзин, С.Н. Терещенко, Н.А. Джаиани, Е.В. Акатова, М.Г. Глезер, А.С. Галявич, В.Б. Закирова, Н.А. Казилова, Е.А. Полянская, А.В. Ягода, О.И. Боева, Е.В. Хоролец, С.В. Шлык, Э.Г. Волкова, М.П. Маргарян, И.О. Гузь, В.О. Константинов, Н.Б. Калишевич, Д.А. Затейщиков, В.В. Носиков. *Полиморфные маркеры G2667C, G3014A, C3872T, A5237G гена CRP и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших обострение ишемической болезни сердца*. Медицинская генетика. – 2011. – №4. – стр. 3–9.
4. **К.А. Благодатских**, Ю.В. Агапкина, А.Г. Никитин, А.Н. Бровкин, М.А. Евдокимова, В.С. Осмоловская, Д.А. Затейщиков, В.В. Носиков. *Полиморфные маркеры G(-174)C гена IL6 и G(-1082)A гена IL10 и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром*. Материалы VI съезда Российского Общества Медицинских Генетиков. – 2010. – стр. 25, г. Ростов-на-Дону, Россия (14 – 19 мая 2010 г.)
5. **К. Blagodatskikh**, J. Agapkina, A. Nikitin, M. Evdokimova, V. Osmolovskaya, V. Nosikov, D. Zateyshchikov. *IL6 and IL10 genes are associated with unfavourable outcomes in patients with acute coronary syndrome*. 78th EAS Congress. Atherosclerosis Supplements. – 2010. – Vol.11, №2. – P. 153, Hamburg, Germany (20 – 23 июня 2010 г.)
6. **К.А. Благодатских**, А.Г. Никитин, А.А. Пушков, М.А. Евдокимова, В.С. Осмоловская, Д.А. Затейщиков, В.В. Носиков. *Полиморфные маркеры G2667C, G3014A, G3872A и A5237G гена CRP и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром*. Материалы X-ой ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН - ВУЗы «Биохимическая физика», стр. 32, г. Москва, Россия (8 – 10 ноября 2010 г.).