

УДК 630.945.4:575.113:[616.1/.153.915/.379-008.64]

# Геномное исследование коморбидности сердечно-сосудистого континуума

О. А. Макеева<sup>1,2\*</sup>, А. А. Слепцов<sup>1</sup>, Е. В. Кулиш<sup>1</sup>, О. Л. Барбараш<sup>2</sup>, А. М. Мазур<sup>3</sup>,  
Е. Б. Прохорчук<sup>3</sup>, Н. Н. Чеканов<sup>3</sup>, В. А. Степанов<sup>1</sup>, В. П. Пузырев<sup>1,4\*\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650000, Кемеровская обл., Кемерово, Сосновый бул., 6

<sup>3</sup>ЗАО «Геноаналитика», 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 77, оф. 102

<sup>4</sup>Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Томск, Московский тракт, 2

\*E-mail: oksana.makeeva@medgenetics.ru

\*\*E-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 14.01.2015

**РЕФЕРАТ** Коморбидность, или сочетание нескольких заболеваний у одного индивида, – явление распространенное и широко исследуемое. Однако генетические основы неслучайного сочетания болезней остаются недостаточно изученными. Современные технологии и методы анализа геномных данных делают возможным определение генетического профиля у больных, «обремененных» множеством болезней (полипатии, конгломераты болезней), и его сравнение с профилем больных отдельными формами патологии. Проведено ассоциативное исследование трех групп больных с различными сочетаниями сердечно-сосудистых заболеваний и контрольной группы. Выборки больных формировались по принципу только одного заболевания – ишемическая болезнь сердца (ИБС), сочетание двух заболеваний – ИБС и артериальная гипертензия (АГ), сочетание нескольких болезней – ИБС, АГ, сахарный диабет типа 2 (СД2) и гиперхолестеринемия (ГХ). Генотипирование проводили на платформе геномного сервиса «Мой ген» ([www.i-gene.ru](http://www.i-gene.ru)). Представлен анализ ассоциаций более 1400 генетических полиморфных вариантов с изучаемыми фенотипами. С фенотипом «только ИБС» ассоциировано 14 полиморфных вариантов, в том числе, относящихся к генам *APOB*, *CD226*, *NKX2-5*, *TLR2*, *DPP6*, *KLRB1*, *VDR*, *SCARB1*, *NEDD4L*, *SREBF2*, и варианты в межгенных промежутках rs12487066, rs7807268, rs10896449 и rs944289. С фенотипом «ИБС в сочетании с АГ» ассоциировано 13 генетических маркеров, в том числе в генах *BTNL2*, *EGFR*, *CNTNAP2*, *SCARB1*, *HNF1A* и межгенные полиморфные варианты rs801114, rs10499194, rs13207033, rs2398162, rs6501455, rs1160312. С сочетанием нескольких болезней сердечно-сосудистого континуума (ССК) ассоциировано 14 генетических маркеров, в том числе в генах *TAS2R38*, *SEZ6L*, *APOA2*, *KLF7*, *CETP*, *ITGA4*, *RAD54B*, *LDLR* и *MTAP* и варианты в межгенных промежутках rs1333048, rs1333049 и rs6501455. Для фенотипов «только ИБС» и «ИБС в сочетании с АГ» выявлен один общий генетический маркер – rs4765623 гена *SCARB1*; для «ИБС в сочетании с АГ» и сочетанием нескольких заболеваний (синтропией) выявлено два общих генетических маркера – rs663048 гена *SEZ6L* и rs6501455, находящийся в межгенном регионе; между «синтропией» и «только ИБС» не найдено общих генов из числа изученных. В результате классифицирующего анализа принадлежности ассоциированных генов к основным метаболическим путям организма установлено, что гены липидного обмена вовлечены в формирование всех трех вариантов течения болезней ССК, а гены иммунного ответа специфичны для «изолированной» формы ИБС. Показано также, что коморбидность представляет собой дополнительную сложность на пути использования данных ассоциативных генетических исследований в тестах наследственной предрасположенности к заболеваниям, так как генетический профиль сочетанных заболеваний может отличаться от профиля отдельных, не сочетанных форм патологии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ассоциативные исследования, генетический полиморфизм, коморбидность, многофакторные заболевания, сердечно-сосудистый континуум, синтропия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АГ – артериальная гипертензия; ГХ – гиперхолестеринемия; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ОКС – острый коронарный синдром; СД2 – сахарный диабет типа 2; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ССК – сердечно-сосудистый континуум.

## ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике давно обозначена проблема множественных сочетанных заболеваний [1, 2]. До 80% бюджета здравоохранения развитых стран расходуется на пациентов с четырьмя и более заболеваниями [3]. Наиболее распространенный термин для обозначения этого феномена – коморбидность [1]. Однако только та часть сочетанных болезней, которая имеет общую генетическую основу и сходный патогенез, относится к синтропиям, болезням «притяжения», «взаимной склонности» («attraction») [4]. Известно множество клинически доказанных синтропных заболеваний: иммунозависимые болезни (аллергические и аутоиммунные) [5, 6]; эндокринные заболевания, в том числе сочетание сахарного диабета (СД2), аутоиммунного тиреоидита и глютеновой энтеропатии [7], некоторые формы психических заболеваний [8]. Среди них – сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), объединяемые понятием сердечно-сосудистого континуума (ССК).

Термин сердечно-сосудистый континуум в начале 1990-х годов предложили Дзау и Браунвальд. Понятие ССК хорошо описывает развитие и прогрессирование заболеваний во времени, однако также отражает и суть взаимоотношений факторов риска (генетических и внешнесредовых), демонстрируя их общность [9–11]. Гипотеза ССК постулирует, что сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют собой определенную цепь событий, которая может запускаться многочисленными взаимосвязанными или независимыми факторами риска, прогрессирует в результате включения множественных сигнальных путей и физиологических процессов, что в итоге приводит к терминальной стадии болезни сердца. Сердечно-сосудистые факторы риска включают повышенный уровень холестерина, артериальную гипертензию, сахарный диабет, курение, ожирение и недостаточную физическую активность. В основе континуума ССЗ (континуум клинических фенотипов) лежит патофизиологический континуум, который включает прогрессирующие на молекулярном и клеточном уровне изменения, на клиническом уровне манифестирующие как болезнь. В основе таких процессов лежат окислительный стресс и эндотелиальная дисфункция, которые, в свою очередь, инициируют целый каскад событий, включая нарушения в системе вазоактивных медиаторов, неспецифический воспалительный ответ и ремоделирование сосудов. Все это приводит к поражению органов-мишеней.

Проблема коморбидности (сочетания заболеваний) создает дополнительную сложность при клиническом использовании геномных маркеров для прогнозирования риска заболеваний. Играют ли генетические

варианты, повышающие риск какого-либо одного заболевания, такую же патогенетическую роль и в случае комплексного фенотипа (сочетание нескольких заболеваний) или их вклад меняется? Как при разработке подходов к генетическому тестированию многофакторных заболеваний учитывать явление генетического плейотропизма и разнонаправленное действие некоторых генетических вариантов: в отношении одного заболевания вариант может быть рисковым, в отношении другого – протективным?

В настоящей работе приведены результаты сравнительного анализа генетической компоненты трех клинических фенотипов – одно заболевание, сочетание двух заболеваний и сочетание нескольких ССЗ – с использованием набора маркеров геномного сервиса «Мой ген» ([www.i-gene.ru](http://www.i-gene.ru)). Главная цель исследования состояла в поиске общих и специфических генетических маркеров и сравнительном анализе генетической компоненты разных сочетаний сердечно-сосудистых заболеваний.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование вошли три группы больных с разными сочетаниями ССЗ и контрольная выборка практически здоровых индивидов. Больных с различными сочетаниями заболеваний отбирали из одной общей выборки, включающей более 800 случаев госпитализации в специализированный кардиологический стационар по поводу острого коронарного синдрома (ОКС). Все пациенты прошли детальное клинико-лабораторное обследование в отношении как основного диагноза, так и сопутствующей патологии. Первую выборку отбирали по следующим критериям: больные с ИБС (инфаркт миокарда) без какой-либо сопутствующей патологии ( $n = 61$ ). Таким образом, у больных этой группы диагностирована только ИБС, а другие болезни, такие, как АГ, СД2, исключались. Вторая выборка включала пациентов с сочетанием двух заболеваний – ИБС и АГ ( $n = 180$ ), больные с какими-либо другими ССЗ исключались. Третья выборка включала больных с сочетанием ИБС, АГ, СД2 и ГХ ( $n = 68$ ). Выборка с сочетанием нескольких заболеваний обозначена далее как «синтропия ССК». У остальных пациентов ИБС сочеталась с другой патологией, их в данном исследовании не анализировали.

Контрольная группа относительно здоровых индивидов ( $n = 131$ ) была сформирована по критериям отсутствия ССЗ в анамнезе, нормальным показателям артериального давления, нормальным эхокардиологическим параметрам и показателям липидного спектра крови. Индивидов этой группы отбирали по указанным критериям из эпидемиологической выборки, сформированной для изучения факторов риска ИБС.

Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [12]. Генотипирование проводили на микрочипах Illumina Custom Genotyping Microarrays iSelectHD, изготовленных по заказу ЗАО «Геноаналитика» для геномного сервиса «Мой ген». Микрочип включал 4416 генетических вариантов, из которых 2121 представлены однонуклеотидными заменами в 98 генах моногенных заболеваний, и 1913 полиморфных вариантов ядерного и 382 – митохондриального генома.

С целью минимизации технологической погрешности генотипирования, полиморфные варианты и образцы ДНК отбирали в соответствии со следующими критериями:

- 1) доля генотипированных однонуклеотидных вариантов для одного образца должна составлять не менее 98%;
- 2) доля генотипированных образцов по каждому полиморфному варианту должна превышать 98%;
- 3) идентичность генотипов любых двух образцов должна быть меньше 98%;
- 4) соответствие генотипических данных половой принадлежности полу индивида;
- 5) соблюдение равновесия Харди–Вайнберга в объединенной выборке при уровне статистической значимости  $P > 10^{-8}$  и в контрольной группе при  $P > 0.05$ ;
- 6) частота редкого аллеля более 5%;
- 7) полиморфные варианты локализованы в аутосомах.

В результате контроля качества генотипирования с последующим исключением однонуклеотидных замен генов моногенных заболеваний и однонуклеотидных вариантов, локализованных в половых хромосомах и митохондриях, для дальнейшего анализа отобрали 407 образцов геномной ДНК и 1400 полиморфных вариантов.

Ассоциации анализировали с использованием программных пакетов GenABEL для статистической среды R версии 2.14.2. Уровень статистической значимости, рассчитанный методом случайных перестановок с репликацией 10000 раз (пермутационный тест), считали равным  $P < 0.05$ . Сетевой анализ межгенных взаимодействий проводили на платформе Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins [13]. Для аннотации метаболических и сигнальных путей использовали WEB-based Gene Set Analysis Toolkit [14]. Прогностическую эффективность полиморфных вариантов, показавших статистически значимые ассоциации с изучаемыми фенотипами, анализировали стандартными методами расчета AUC (Area Under Curve).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Основная задача исследования состояла в определении общих и специфических генов для исследуемых

фенотипов: отдельное заболевание (ИБС), сочетание двух заболеваний (ИБС и АГ) и комплексный фенотип «синтропия», представляющий собой сочетание нескольких сердечно-сосудистых патологических состояний. Для выявления генов, ассоциированных с тем или иным фенотипом (болезнью или сочетанием болезней), сравнивали частоты аллелей и генотипов у больных и в группе контроля (исследование «случай–контроль»), рассчитывали показатель отношения шансов (OR) и оценивали прогностическую значимость генетических маркеров, показавших статистически значимые ассоциации. Все генетические маркеры/гены классифицировали по принадлежности к тому или иному метаболическому пути или классу генов. Для аннотирования сигнальных и метаболических путей использовали сервис WebGestalt (WEB-based GENE SET ANALYSIS TOOLKIT).

В табл. 1–3 приведена номенклатура и основные статистики генетических вариантов, частоты аллелей которых отличались в группах больных и контроле: хромосомная локализация, rs-номер, частота редкого аллеля, расположение по отношению к близлежащим генам, показатель величины отношения шансов OR. В табл. 4 представлены показатели прогностической ценности полиморфных вариантов, ассоциированных с каким-либо фенотипом: болезнью или сочетанием болезней.

Далее рассмотрим результаты, полученные для каждой из изучаемых фенотипических групп.

### Генетические маркеры, ассоциированные с фенотипом ИБС

С фенотипом «только ИБС» ассоциировано 14 полиморфных вариантов (см. табл. 1). Среди них два варианта представлены миссенс-заменами: rs1367117 в гене APOB и rs763361 в гене CD226. Один вариант – rs3095870 – расположен вблизи 5'-конца гена NKX2-5. Семь вариантов находятся в интронных областях: rs1898830 в гене TLR2, rs10239794 в DPP6, rs4763655 в KLRB1, rs7975232 в VDR, rs4765623 в SCARB1, rs3865418 в NEDD4L и rs2267439 в SREBF2. Четыре генетических маркера локализованы в межгенных промежутках: rs12487066, rs7807268, rs10896449 и rs944289 (табл. 1). Прогностическая ценность маркеров, ассоциированных с данным фенотипом, варьировала от 0.62 у rs12487066 до 0.57 для rs1367117 (табл. 4).

С целью анализа структуры наследственной компоненты изучаемых фенотипов выделили несколько групп ассоциированных генов в соответствии с основной биологической функцией, выполняемой ими в организме. Так, гены, варианты которых показали ассоциацию с фенотипом «только ИБС», условно можно разделить на три группы: 1) гены, отвечаю-

Таблица 1. Полиморфные варианты, показавшие ассоциацию с фенотипом «только ИБС»

Хромосома	Символ гена	Локализация SNP	SNP	Аллель: MAF	Аллель: OR (95% ДИ)	Точный тест Фишера	Генотипы: OR (95% ДИ)	$P\chi^2$ perm. test
2p24	<i>APOB</i>	Миссенс	rs1367117	A:0.29	A:1.76 (1.08–2.88)	0.022	AA:3.59 (1.25–10.85)	0.01
3q13.1			rs12487066	G:0.23	A:0.47 (0.28–0.79)	0.0026	AA:0.37 (0.18–0.74)	0.0031
4q32	<i>TLR2</i>	Интрон	rs1898830	G:0.34	A:0.51 (0.31–0.82)	0.0038	AA:0.43 (0.19–0.9)	0.021
5q34	<i>NKX2-5</i>	5'-конец	rs3095870	A:0.39	G:1.83 (1.1–3.12)	0.017	GG:2.09 (1.06–4.17)	0.024
7q36.1			rs7807268	C:0.45	C:1.96 (1.22–3.17)	0.0045	CC:2.73 (1.29–5.82)	0.0065
7q36.2	<i>DPP6</i>	Интрон	rs10239794	A:0.37	A:1.99 (1.24–3.2)	0.0029	AA:3.35 (1.4–8.26)	0.0041
11q13			rs10896449	G:0.46	A:0.57 (0.35–0.92)	0.016	AA:2.36 (1.16–4.8)	0.011
12p13	<i>KLRB1</i>	Интрон	rs4763655	A:0.34	G:0.56 (0.35–0.91)	0.014	GG:0.45 (0.21–0.94)	0.031
12q13.11	<i>VDR</i>	Интрон	rs7975232	A:0.54	A:0.57 (0.35–0.91)	0.013	AA:0.32 (0.11–0.8)	0.009
12q24.31	<i>SCARB1</i>	Интрон	rs4765623	A:0.25	G:0.57 (0.35–0.95)	0.025	GG:0.4 (0.2–0.8)	0.0068
14q13.3			rs944289	G:0.38	A:0.55 (0.34–0.88)	0.012	AA:0.42 (0.18–0.9)	0.017
18q22.3	<i>CD226</i>	Миссенс	rs763361	A:0.39	A:1.79 (1.12–2.87)	0.012	AA:2.51 (1.11–5.7)	0.018
18q21	<i>NEDD4L</i>	Интрон	rs3865418	A:0.53	A:0.56 (0.35–0.91)	0.013	AA:0.36 (0.13–0.86)	0.017
22q13	<i>SREBF2</i>	Интрон	rs2267439	G:0.39	A:2.25 (1.33–3.92)	0.0018	AA:2.32 (1.17–4.67)	0.01

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 MAF – частота минорного (редкого) аллеля; ДИ – доверительный интервал; OR (95% ДИ) – отношение шансов (95% доверительный интервал);  $P\chi^2$  – уровень значимости по хи-квадрату для аллелей с одной степенью свободы;  $P\chi^2$  permutation test – уровень значимости по хи-квадрату для генотипов с двумя степенями свободы.

щие за метаболизм липидов, 2) гены, связанные с иммунитетом, и 3) специфические для функции сердца гены.

К группе генов, связанных с метаболизмом липидов, относятся *APOB*, *SREBF2* и *SCARB1*. Так продукт гена *APOB* является основным аполипопротеином хиломикрона и липопротеинов низкой плотности. Известно, что полиморфные варианты и некоторые мутации гена *APOB* связаны с ГХ и высоким риском ИБС [15, 16].

Продукт гена *SREBF2* – активатор транскрипции, необходимый для поддержания липидного гомеостаза. В частности, данный ген регулирует ген *LDLR*, который кодирует рецептор ЛПНП, а также влияет на уровень холестерина и синтез жирных кислот [17].

Ген *SCARB1* кодирует рецептор различных лигандов, участвующих в липидном обмене, таких, как фосфолипиды, эфиры холестерина, липопротеины и фосфатидилсерин. Предположительно, продукт данного гена также участвует в фагоцитозе апоптотных клеток посредством своей фосфатидилсеринсвязывающей активности и в процессах поглощения эфиров холестерина ЛПВП [18].

К группе генов, имеющих отношение к регуляции иммунитета, отнесены *TLR2*, *KLRB1*, *CD226* и *VDR*.

Ген *TLR2* взаимодействует с генами *LY96* и *TLR1* и играет важную роль в формировании врожденного иммунного ответа на бактериальные липопроотеины и другие компоненты микробной стенки. Он активируется факторами MYD88 и TRAF6, что приводит к активации цитокинов фактором NF- $\kappa$ B и воспалительной реакции. Продукт гена может также способствовать апоптозу [19]. Структурные полиморфизмы в этом гене ассоциированы с восприимчивостью к проказе и некоторым инфекционным заболеваниям [20].

Ген *KLRB1* играет роль ингибитора естественных киллерных клеток (клеток цитотоксичности). Он экспрессируется в Т-лимфоцитах периферической крови, преимущественно в Т-клетках с антигенной памятью [21].

Ген *CD226* кодирует рецептор, участвующий в процессах межклеточной адгезии, сигнализации лимфоцитов, цитотоксичности и секреции лимфокинов цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками [22].

Ген *VDR* кодирует ядерный рецептор витамина D3, однако известно, что этот белок функционирует и в качестве рецептора вторичной желчной кислоты – литохолевой кислоты. Рецептор витамина D3 участву-

Таблица 2. Полиморфные варианты, показавшие ассоциацию с фенотипом «ИБС в сочетании с АГ»

Хромосома	Символ гена	Локализация SNP	SNP	Аллель: MAF	Аллель: OR (95% ДИ)	Точный тест Фишера	Генотипы: OR (95% ДИ)	$P\chi^2$ perm. test
1q42			rs801114	C:0.39	C:0.66 (0.46–0.95)	0.025	CC:0.3 (0.12–0.7)	0.0018
2q35	<i>XRCC5</i>	3'-Конец	rs2440	A:0.33	A:1.57 (1.1–2.26)	0.012	AA:2.48 (1.12–5.93)	0.017
6p21.3	<i>BTNL2</i>	Миссенс	rs2076530	G:0.39	G:1.57 (1.1–2.23)	0.01	GG:1.96 (1.02–3.92)	0.034
6q23			rs10499194	A:0.35	G:1.52 (1.04–2.22)	0.026	GG:2.07 (1.25–3.44)	0.0037
6q23			rs13207033	A:0.35	G:1.49 (1.02–2.18)	0.033	GG:2.02 (1.22–3.36)	0.004
7p12	<i>EGFR</i>	Инtron	rs763317	A:0.42	G:0.67 (0.47–0.95)	0.022	GG:0.5 (0.29–0.88)	0.011
7q35	<i>CNTNAP2</i>	Инtron	rs7794745	T:0.36	A:0.69 (0.48–0.98)	0.032	AA:0.52 (0.31–0.87)	0.011
12q24.31	<i>SCARB1</i>	Инtron	rs4765623	A:0.25	A:0.63 (0.43–0.93)	0.017	AA:0.49 (0.3–0.82)	0.0038
15q26			rs2398162	G:0.4	A:0.68 (0.47–0.97)	0.033	AA:0.43 (0.19–0.93)	0.027
17cen–q21.3	<i>HNF1A</i>	Инtron	rs4430796	G:0.36	G:1.59 (1.12–2.28)	0.0077	GG:2.12 (1.09–4.3)	0.024
17q24.3			rs6501455	G:0.32	A:1.52 (1.05–2.19)	0.023	AA:2.4 (1.08–5.75)	0.024
20p11			rs1160312	G:0.42	G:1.56 (1.1–2.22)	0.011	GG:2.21 (1.16–4.38)	0.013
22q12.1	<i>SEZ6L</i>	Миссенс	rs663048	A:0.19	C:0.57 (0.38–0.87)	0.0082	CC:0.53 (0.31–0.88)	0.011

Примечание. См. примечание к табл. 1.

ет в минеральном обмене (обмен кальция), хотя может также регулировать целый ряд других метаболических путей, в частности иммунный ответ [23].

К третьей группе относятся гены, принадлежащие к различным метаболическим и сигнальным путям, но вовлеченные в специфические для сердца функции. Два из них связаны с трансмембранным транспортом электролитов и **проводящей системой сердца** (*NEDD4L* и *DPP6*), а третий – ген *NKX2-5* – кодирует специфичный для сердца **фактор транскрипции**.

Ген *NEDD4L* играет важную роль в транспорте натрия в эпителии, регулируя экспрессию натриевых каналов на поверхности эпителиальных клеток. Было показано, что продукт этого гена участвует в формировании мембранного потенциала и передаче импульса по проводящей системе сердца [24]. Дунн с соавт. [25] показали ассоциацию некоторых полиморфных вариантов гена *NEDD4L* с эссенциальной гипертензией. Аллель А полиморфного варианта rs3865418 ассоциирован с высоким диастолическим давлением у китайцев ( $OR = 1.31 (1.04–1.67)$ ,  $P = 0.025$ ) [26]. В настоящем исследовании аллель А и ге-

нотип АА оказывали протективный эффект в отношении ИБС (табл. 2).

Ген *DPP6* кодирует мембранный белок (белок 6, подобный дипептидиламинопептидазе), член семейства S9В сериновых протеаз. Он способен связываться со специфическими потенциал-зависимыми калиевыми каналами, влияя таким образом на их экспрессию, биофизические свойства и активность канала [27]. Дефекты гена *DPP6* приводят к развитию семейной пароксизмальной фибрилляции желудочков типа 2 [28].

Ген *NKX2-5*, экспрессируемый исключительно в сердце, кодирует гомеобоксодержащий фактор транскрипции. Этот фактор непосредственно участвует в формировании и развитии сердца во внутриутробном периоде [29]. Мутации в гене *NKX2-5* вызывают различные пороки сердца – от малых аномалий до тетрады Фалло (MIM:108900,187500).

#### Генетические маркеры, ассоциированные с фенотипом «ИБС в сочетании с АГ»

С фенотипом «ИБС в сочетании с АГ» ассоциировано 13 генетических маркеров из числа из-

Таблица 3. Полиморфные варианты, показавшие ассоциацию с группой «синтропия ССК»

Хромосома	Символ гена	Локализация	SNP	Аллель: MAF	Аллель: OR (95% ДИ)	Точный тест Фишера	Генотипы: OR (95% ДИ)	$P\chi^2$ perm. test
1q21	<i>APOA2</i>	5'-Конец	rs5082	G:0.47	A:1.83 (1.15–2.93)	0.0082	AA:2.42 (1.22–4.82)	0.007
2q31.3	<i>ITGA4</i>	Синонимичная замена	rs1143674	A:0.39	A:1.76 (1.12–2.78)	0.011	AA:2.84 (1.27–6.47)	0.0069
2q32	<i>KLF7</i>	5'-Конец	rs7568369	A:0.28	C:0.45 (0.28–0.73)	0.00084	CC:0.34 (0.16–0.68)	0.0007
7q34	<i>TAS2R38</i>	Миссенс	rs1726866	G:0.48	A:1.65 (1.04–2.63)	0.028	AA:2.42 (1.22–4.82)	0.0073
		Миссенс	rs10246939	G:0.48	A:1.65 (1.04–2.63)	0.028	AA:2.42 (1.22–4.82)	0.0073
8q22.1	<i>RAD54B</i>	Синонимичная замена	rs2291439	G:0.42	G:0.6 (0.37–0.97)	0.032	GG:0.25 (0.06–0.77)	0.011
9p21	<i>MTAP</i>	Интрон	rs7023329	G:0.52	A:1.95 (1.23–3.11)	0.0031	AA:2.38 (1.2–4.76)	0.0079
9p21.3			rs1333048	C:0.45	A:0.6 (0.38–0.94)	0.022	AA:0.37 (0.15–0.87)	0.018
9p21.3			rs1333049	G:0.44	C:0.61 (0.38–0.95)	0.028	CC:0.39 (0.16–0.88)	0.022
16q21	<i>CETP</i>	5'-Конец	rs183130	A:0.35	G:2.04 (1.21–3.51)	0.006	GG:2.19 (1.13–4.32)	0.013
17q24.3			rs6501455	G:0.32	G:2.06 (1.3–3.29)	0.0015	GG:3.91 (1.56–10.33)	0.0016
19p13.2	<i>LDLR</i>	Интрон	rs2738446	G:0.34	C:0.61 (0.38–0.97)	0.032	CC:0.38 (0.18–0.77)	0.0045
		Синонимичная замена	rs688	A:0.34	G:0.61 (0.38–0.97)	0.032	GG:0.38 (0.18–0.77)	0.0048
22q12.1	<i>SEZ6L</i>	Миссенс	rs663048	A:0.19	C:0.52 (0.31–0.88)	0.01	CC:0.49 (0.25–0.95)	0.027

Примечание. См. примечание к табл. 1.

ученных (табл. 2). Два из них – миссенс-замены (rs2076530 в гене *BTNL2* и rs663048 в гене *SEZ6L*), четыре – варианты в интронах (rs763317 *EGFR*, rs7794745 *CNTNAP2*, rs4765623 *SCARB1*, rs4430796 *HNF1A*), и шесть – в межгенных областях (rs801114, rs10499194, rs13207033, rs2398162, rs6501455 и rs1160312).

Прогностическая ценность генетических маркеров, оцененная по показателю AUC (площадь под ROC-кривой), варьировала от 0.59 до 0.55 (табл. 4).

Интересно, что данный набор генов трудно связать с каким-либо определенным метаболическим путем и классифицировать подобно генам, ассоциированным с фенотипом «только ИБС». Внимания, несомненно, заслуживает тот факт, что несколько генов связаны с **иммунитетом, предрасположенностью к раку и радиочувствительностью**.

Так ген *BTNL2* относится к регуляторам иммунитета: его продукт – бутирофиллино-подобный белок типа 2, принадлежит к семейству рецепторов В7, которые функционируют как молекулы, стимулирую-

щие Т-клетки: влияют на продукцию цитокинов и регулируют пролиферацию Т-клеток. Полиморфные варианты этого гена ассоциированы с повышенным риском развития рака предстательной железы, болезнью Кавасаки, а также с повреждением коронарных артерий при этом заболевании [30]. Показана связь вариантов этого гена с подверженностью к туберкулезу [31]. Варианты в *BTNL2* связаны с развитием коронарного атеросклероза согласно данным полногеномного исследования [32].

К генам, так или иначе ассоциированным с онкогенезом и иммунной системой, относятся *XRCC5*, *EGFR*, *HNF1A* и *SEZ6L*. Ген *XRCC5* кодирует субъединицу белка Ku размером 80 кДа. Гетеродимерный белок Ku – это АТР-зависимая ДНК-геликаза II, которая участвует в репарации ДНК путем негомологического соединения концов. Белок Ku участвует в рекомбинации, необходимой для создания разнообразия антигенсвязывающих центров антител у млекопитающих. Кроме того, Ku-белки вовлечены в поддержание длины теломер и сайленсинг прите-

Таблица 4. Прогностическая эффективность полиморфных вариантов, ассоциированных с фенотипами «только ИБС», «ИБС в сочетании с АГ» и «синтропия ССК»

«Только ИБС»		«ИБС в сочетании с АГ»		«Синтропия ССК»	
SNP	AUC	SNP	AUC	SNP	AUC
rs1367117	0.57	rs801114	0.56	rs5082	0.60
rs12487066	0.62	rs2440	0.55	rs1143674	0.59
rs1898830	0.59	rs2076530	0.55	rs7568369	0.63
rs3095870	0.59	rs10499194	0.59	rs1726866	0.60
rs7807268	0.60	rs13207033	0.59	rs10246939	0.60
rs10239794	0.59	rs763317	0.57	rs2291439	0.57
rs10896449	0.60	rs7794745	0.58	rs7023329	0.60
rs4763655	0.61	<b>rs4765623</b>	0.59	rs1333048	0.58
rs7975232	0.59	rs2398162	0.55	rs1333049	0.58
<b>rs4765623</b>	0.61	rs4430796	0.56	rs183130	0.60
rs944289	0.59	<b>rs6501455</b>	0.58	<b>rs6501455</b>	0.59
rs763361	0.58	rs1160312	0.56	rs2738446	0.60
rs3865418	0.59	rs3843763	0.58	rs688	0.60
rs2267439	0.60	<b>rs663048</b>	0.58	<b>rs663048</b>	0.59

Примечание. AUC – area under curve (область под кривой).

ломерных генов [33]. Известно, что редкий микросателлитный полиморфизм данного гена ассоциирован с онкопатологией и радиочувствительностью.

Белок, кодируемый геном *EGFR*, представляет собой трансмембранный гликопротеин, рецептор эпидермального фактора роста [34]. Дефекты данного гена приводят к нарушению апоптоза, активно изучается связь этого гена с канцерогенезом [35]. Аллель А rs763317, считающийся аллелем риска рака легкого, относится к неблагоприятным в отношении фенотипа «ИБС в сочетании с АГ».

Продукт гена *HNF1A* – активатор транскрипции, регулирующий тканеспецифичную экспрессию некоторых генов, особенно в клетках поджелудочной железы и печени [36]. Дефект гена приводит к семейной форме аденомы печени (MIM:142330), сахарному диабету типа MODY3 (MIM:600496) и к инсулинзависимому сахарному диабету типа 2 (MIM:612520). Нами показано, что аллель G, являющийся фактором риска СД2, неблагоприятен в отношении развития сочетанной патологии ИБС и АГ.

Функция гена *SEZ6L* изучена недостаточно. Предполагается, что он связан со специфическими функциями эндоплазматического ретикулума. Ген экспрессируется в тканях головного мозга и легких и не экспрессируется в клетках рака легкого, поэтому активно изучается [37]. Опубликованы данные

о связи полиморфных вариантов гена *SEZ6L* с ИБС [38], однако механизм такой связи не известен. Нами получены данные о том, что аллель риска развития рака легкого является неблагоприятным фактором и для ИБС в сочетании с АГ.

Нами установлено, что ген *CNTNAP2* ассоциирован с сердечно-сосудистым фенотипом (что необычно, учитывая известные функции этого гена). Ген *CNTNAP2* кодирует трансмембранный белок, входящий в семейство нейрексинов, которые функционируют в нервной системе в качестве молекул клеточной адгезии и рецепторов. Белок *CNTNAP2* осуществляет свои основные функции в миелинизированных аксонах, обеспечивая взаимодействие между нейронами и глией. Он также отвечает за локализацию калиевых каналов и дифференциацию аксонов на отдельные функциональные субдомены. Варианты гена *CNTNAP2* связаны с широким спектром психических заболеваний, включая аутизм, шизофрению, умственную отсталость, дислексию и нарушение языковых функций [39]. Аллель А – рискованный в отношении развития шизофрении, протективный в отношении фенотипа «ИБС в сочетании с АГ».

Ген *SCARB1* связан с липидным обменом как описано нами. Это ген, «общий» для фенотипов «ИБС» и сочетания «ИБС и АГ».

Функции нескольких генетических вариантов, находящихся в межгенных областях, требуют дальнейшего анализа. Ассоциация с заболеванием может объясняться неравновесием по сцеплению с некоторыми другими генами/вариантами, непосредственно влияющими на формирование заболевания или самостоятельным регуляторным значением. Межгенный вариант rs1160312A по данным некоторых исследований связан с облысением, в то же время он протективный в случае ИБС в сочетании с АГ. По данным масштабного исследования консорциума Wellcome Trust, выполненного методом «случай–контроль», аллель А rs2398162 этого гена является фактором риска эссенциальной гипертензии, в нашей работе аллель А – протективный.

### Генетические маркеры, ассоциированные с фенотипом «синтропия ССК»

С синтропией ССК ассоциированы 14 маркеров (табл. 3). Из них три представлены миссенс-заменами: rs1726866 и rs10246939 в гене *TAS2R38* и rs66048 в гене *SEZ6L*; три – локализованы вблизи 5'-области генов: rs5082 гена *APOA2*, rs7568369 в 5'-области гена *KLF7* и rs183130 в 5'-области гена *CETP*; три варианта представляли собой синонимичные замены: rs1143674 в гене *ITGA4*, rs2291439 в гене *RAD54B* и rs688 в гене *LDLR*; два варианта находились в интронных областях: rs2738446 в гене *LDLR* и rs7023329 в гене *MTAP*; три маркера располагались в межгенных промежутках: rs1333048 и rs1333049 в области 9p21.3 и rs6501455, локализованный в 17q24.3 между генами *KCNJ2* и *SOX9*, примерно на одинаковом расстоянии (1 млн п. н.).

Гены, ассоциированные с фенотипом «синтропия ССК», можно отнести к одной из следующих групп: а) отвечающие за нарушение липидного метаболизма, б) гены иммунитета и воспаления, в) гены с разными функциями.

Гены *CETP*, *LDLR* и *APOA2* связаны с липидным метаболизмом. Ген *CETP* кодирует переносчик нерастворимых эфиров холестерина. Полиморфные варианты гена *CETP* влияют на уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). В частности, при мутациях данного гена развивается гипер- $\alpha$ -липопротеинемия, сопровождающаяся высоким уровнем ЛПВП (MIM:143470). Аллель G rs183130 ассоциирован с низким уровнем холестерина в составе ЛПВП [40]. Нами показано его участие в формировании фенотипа синтропии ССК.

Ген *LDLR* кодирует белок, функционирующий в качестве посредника эндоцитоза ЛПНП, богатых холестерином [41]. Варианты гена *LDLR* rs2738446 и rs688 находятся в неравновесии по сцеплению. Во Фрамингемском исследовании rs688 ассоциирован

с ИБС, но не связан непосредственно с таким важным эндофенотипом, как уровень липопротеинов [42]. По некоторым данным rs688 в гене *LDLR* может быть связан с формированием ИБС посредством модуляции активности фактора свертывания VIII [43].

Ген *APOA2* кодирует белковую частицу ЛПВП. Мутации в *APOA2* приводят к семейной ГХ [44]. По некоторым данным генотип AA rs5082 гена *APOA2* ассоциирован с высоким риском развития ИБС у мужчин. В нашей работе генотип AA был ассоциирован с высоким риском развития фенотипа «синтропия ССК».

Гены *ITGA4*, *MTAP* и *CDKN2B* согласно их основным функциям могут быть отнесены к группе генов иммунитета и воспаления. Ген *ITGA4* кодирует белок  $\alpha$ -цепи интегрина. Интегрины – важнейшие молекулы межклеточной адгезии. Они представляют собой гетеродимерные мембранные рецепторы, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей и функционирующие как клеточно-субстратные и межклеточные рецепторы адгезии. Известно, что повышение адгезии имеет большое значение в дисфункции эндотелия при воспалении, атеросклерозе и других патологических процессах [45, 46]. Данные об ассоциации rs1143674 гена *ITGA4* с сердечно-сосудистыми фенотипами отсутствуют, однако известно, что этот вариант связан с альтернативным сплайсингом. Аллель А rs1143674 ассоциирован с повышенным риском аутизма [47].

Ген *MTAP* расположен в непосредственной близости от *CDKN2A/2B* [48]. Показано, что гены *MTAP* и *CDKN2B* экспрессируются в клетках и тканях, вовлеченных в развитие атеросклероза, таких, как эндотелиоциты, макрофаги и гладкомышечные клетки коронарных артерий [49]. Сообщается, что ген *MTAP* может выступать в качестве супрессора опухолевого роста [50].

Другие четыре гена – *RAD54B*, *SEZ6L*, *TAS2R38* и *KLF7* – это гены с разнообразными функциями. Продукт гена *RAD54B* участвует в репарации ДНК и митотической рекомбинации. Мутации в нем могут быть причиной рака прямой кишки и лимфом [51]. Данных о функциональной роли варианта rs2291439 мало, а сведения об ассоциации этого маркера с заболеваниями сердечно-сосудистой системы отсутствуют.

Ген *TAS2R38* кодирует рецептор, определяющий восприятие чувства горечи [52]. Гаплотипы гена *TAS2R38* определяют до 85% вариативности различий в ощущении оттенков вкуса – от горького до сладкого [53]. Носительство отдельных вариантов *TAS2R38* влияет на пищевые предпочтения, например, пищи с большим количеством углеводов или липидов, что считается фактором риска развития метаболических нарушений и ССЗ. Аллели этого гена,

ассоциированные с фенотипом синтропии, входят в состав гаплотипа, определяющего неспособность ощущать горький вкус; эти же аллели связаны с развитием СД2.

Продукт гена *KLF7* принадлежит к активаторам транскрипции и экспрессируется во многих тканях организма. Изучение модельных животных показало, что *Klf7* специфически регулирует экспрессию гена *TrkA*, кодирующего нейротрофическую рецепторную тирозинкиназу типа 1. Нонсенс-мутация гена *KLF7* приводит к нарушению развития множества ноцицептивных сенсорных рецепторов [54]. Изучение полиморфных вариантов гена *KLF7* выявило ассоциацию с риском развития СД2 в японской популяции и протективный эффект в отношении ожирения в датской популяции [55, 56].

Характеристика гена *SEZ6L* приведена выше, так как этот ген ассоциирован с фенотипом «ИБС и АГ».

Функциональная значимость полиморфизмов, ассоциированных с изучаемым фенотипом и расположенных в межгенных регионах, остается неизвестной. По данным [57], rs6501455 ассоциирован с раком предстательной железы, однако этот аллель протективный для синтропии ССК. Этот ген располагается на хромосоме 17 на расстоянии около 1 млн п. н. от генов *SOX9* и *CALM2P1*, причем в этом же регионе обнаружено еще около 40000 однонуклеотидных полиморфизмов. Важно, что почти все представленные в базе данных PubMed полиморфизмы в этом геномном регионе имели отношение к тому или иному ССЗ.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Задача исследования заключалась в идентификации общих и специфических генов для трех фенотипов – отдельное заболевание, сочетание двух болезней и сочетание нескольких ССЗ. На рис. 1 приведены данные о количестве генов, общих и специфических для трех фенотипов. Так, в случае синтропии (сочетание нескольких заболеваний – в нашем случае ИБС, АГ, СД2 и ГХ) и сочетания двух заболеваний (ИБС и АГ) выявлены **два общих гена**; между фенотипами «ИБС и АГ» и изолированной «ИБС» – **один общий ген**, а между синтропией и ИБС **нет общих генов** из числа изученных. Выявлено 14 специфических генетических вариантов, характерных только для ИБС, 12 – для синтропии ССК, 10 – для сочетания ИБС и АГ.

В случае сочетающихся заболеваний важно знать не только долю общих и специфических генов, но и профиль ассоциированных вариантов (физиологическую роль, выполняемую в организме), так как профиль может указывать на наиболее

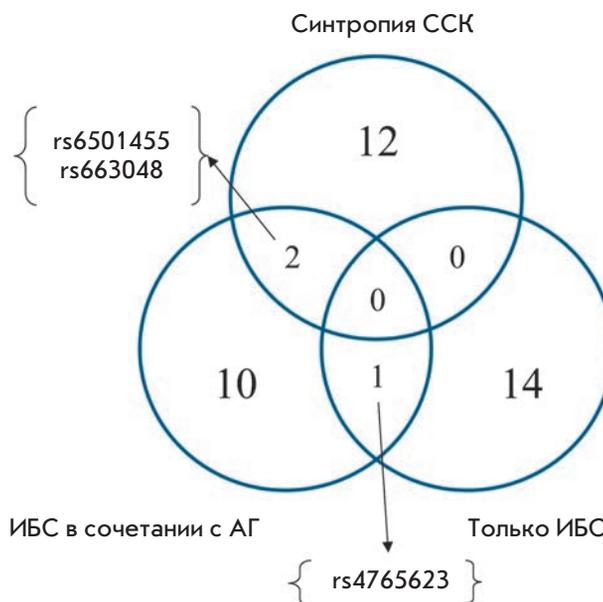


Рис. 1. Венн-диаграмма ассоциированных генетических маркеров с изучаемыми фенотипами: общие и специфические варианты

важные метаболические пути, вовлеченные в формирование патологии и подходы к лечению. Как следует из представленного ассоциативного профиля по каждому изучаемому фенотипу, для ИБС, не сочетающейся с другими ССЗ, характерны гены, регулирующие метаболизм липидов, гены, связанные с иммунитетом, и специфические для функции сердца гены, такие, как гены, контролирующие проводящую систему сердца.

При рассмотрении профиля сочетания двух заболеваний, одно из которых ИБС, картина значительно отличается, и варианты генов, ассоциированные с данным фенотипом, кажутся скорее неожиданными: набор генов трудно связать с каким-либо метаболическим путем и классифицировать подобно генам, ассоциированным с «только ИБС». Отмечено, что с фенотипом сочетания двух болезней связано несколько генов иммунитета и предрасположенности к раку.

Генетический профиль синтропии ССК в целом выглядит закономерным – это гены, отвечающие за нарушение липидного метаболизма, гены, контролирующие иммунитет и реакцию воспаления (и гены с разными функциями).

Необходимо отметить, что выполненный нами анализ обширной панели маркеров (1400), связанных, согласно опубликованным данным, с широко распространенными заболеваниями, позволил выявить неизвестные ранее взаимосвязи, как это часто бывает

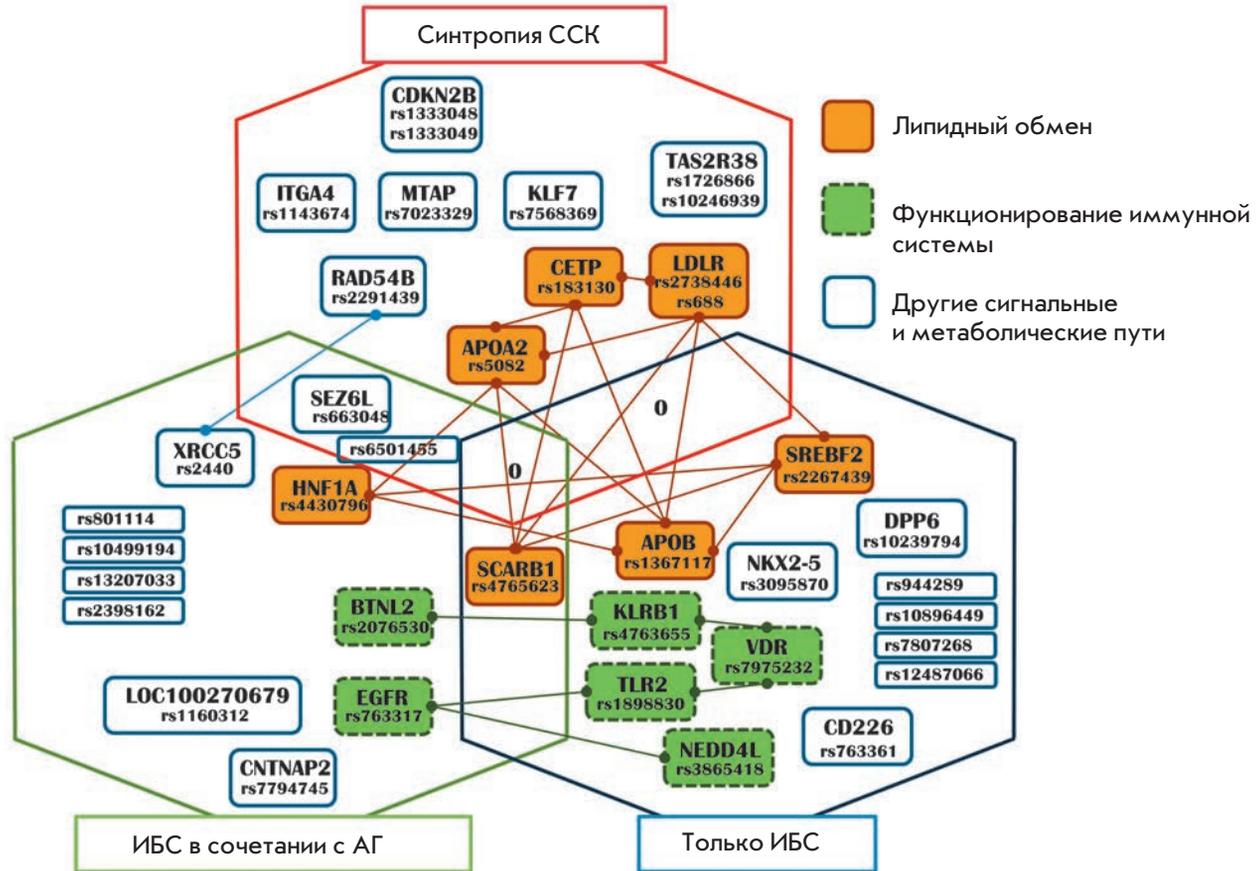


Рис. 2. Венн-диаграмма взаимоотношений всех ассоциированных с изучаемыми фенотипами генов и полиморфных вариантов с учетом их принадлежности к функциональному классу. Межгенные взаимосвязи разработаны на основе данных онлайн сервиса Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)

при широкогеномных исследованиях, например, ассоциацию генов рака, неврологических и психических заболеваний с сердечно-сосудистыми фенотипами.

Описательный анализ функций ассоциированных генов дополнен классифицирующим сетевым анализом межгенных взаимодействий, который позволяет проследить цепочки взаимодействий некоторого списка генов – STRING-анализ (рис. 2). Данный анализ позволяет формально отнести тот или иной ген к наиболее важным метаболическим путям. Такой формализованный анализ показал, что среди генов ИБС преобладают гены, связанные с функцией иммунной системы, и гены липидного обмена. В случае фенотипа ИБС в сочетании с АГ два гена относятся к иммунной системе и два к липидному метаболизму. Именно ген липидного метаболизма *SCARB1* является общим для этих двух форм патологии. Среди генов, ассоциированных с синтропией ССК, три гена были классифицированы как имеющие отношение

к метаболизму липидов. Остальные гены в рамках анализа STRING не были отнесены к какому-либо метаболическому пути.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что гены липидного обмена вовлечены в формирование всех вариантов течения (в том числе различных сочетаний) болезней сердечно-сосудистого континуума, тогда как гены-регуляторы иммунной системы специфичны для ИБС и не участвуют в формировании синтропии ССК.

Возвращаясь к рассуждению о роли синтропии (неслучайное сочетание заболеваний) и распространенного явления коморбидности, можно сказать, что нами установлена дополнительная сложность в использовании данных ассоциативных генетических исследований в прикладных (диагностических) аспектах тестирования предрасположенности к распространенным заболеваниям. Генетический

профиль сочетания нескольких заболеваний может значительно отличаться от профиля изолированных форм. Выявление синтропных генов (влияющих на развитие сложного фенотипа синтропии) представляет интерес не только с диагностических позиций, но и, в первую очередь, для прогнозирования (или объяснения уже существующих фактов) эф-

фекта некоторых лекарственных препаратов в случае нескольких заболеваний. ●

*Работа поддержана ЗАО «Геноаналитика»,  
РФФИ (грант № 13-04-02162) и грантом  
Президента РФ для ведущих научных школ  
(НШ-5096.2014.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feinstein A.R. // *J. Chronic Disease*. 1970. V. 23. № 7. P. 455–468.
2. Valderas J.M. // *J. Comorbidity*. 2013. V. 3. № 2. P. 41–44.
3. Valderas J.M., Starfield B., Sibbald B., Salisbury C., Roland M. // *Ann. Fam. Med*. 2009. № 7. P. 357–363.
4. Puzyrev V.P., Makeeva O.A., Freidin M.B. // *Pers. Med*. 2010. V. 7. P. 399–405.
5. Cookson W. // *Nat. Rev. Immunol*. 2004. V. 4. P. 978–988.
6. Zhernakova A., van Diemen C.C., Wiyemenda C. // *Nat. Rev. Genet*. 2009. V. 10. № 1. P. 43–55.
7. Doolan A., Donaghue K., Fairchild J., Wong M., Williams A.J. // *Diabetes Care*. 2005. V. 28. P. 806–809.
8. Harvey M., Belleau P., Barden N. // *Trends Genet*. 2007. V. 23. P. 547–556.
9. Dzau V., Braunwald E. // *Am. Heart J*. 1991. V. 121. P. 1244–1262.
10. Dzau V.J., Antman E.M., Black H.R., Hayes D.L., Manson J.E., Plutzky J., Popma J.J., Stevenson W. // *Circulation*. 2006. V. 114. P. 2850–2870.
11. Пузырев В.П., Макеева О.А., Голубенко М.В. // *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 3. С. 479–491.
12. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
13. <http://string-db.org/>
14. <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>
15. Pullinger C.R., Hennessy L.K., Chatterton J.E., Liu W., Love J.A., Mendel C.M., Frost P.H., Malloy M.J., Schumaker V.N., Kane J.P. // *J. Clin. Invest*. 1995. V. 95. P. 1225–1234.
16. Soria L., Ludwig E., Clarke H., Vega G., Grundy S., McCarthy B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 587–591.
17. Irisawa M., Inoue J., Ozawa N., Mori K., Sato R. // *J. Biol. Chem*. 2009. V. 284. № 42. P. 28995–29004.
18. Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A. // *EMBO J*. 2002. V. 21. № 19. P. 5017–5025.
19. Yang R.B., Mark M.R., Gray A., Huang A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W.I., Gurney A.L., Godowski P.J. // *Nature*. 1998. V. 395. № 6699. P. 284–288.
20. Bochud P.Y., Magaret A.S., Koelle D.M., Aderem A., Wald A. // *J. Infect. Dis*. 2007. V. 196. № 4. P. 505–509.
21. Lanier L.L., Chang C., Phillips J.H. // *J. Immunol*. 1994. V. 153. № 6. P. 2417–2428.
22. Shibuya A., Campbell D., Hannum C., Yssel H., Franz-Bacon K., McClanahan T., Kitamura T., Nicholl J., Sutherland G.R., Lanier L.L., et al. // *Immunity*. 1996. V. 4. № 6. P. 573–581.
23. Rochel N., Wurtz J.M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D. // *Mol. Cell*. 2000. V. 5. № 1. P. 173–179.
24. van Bemmelen M.X., Rougier J.S., Gavillet B., Apothéoz F., Daidié D., Tateyama M., Rivolta I., Thomas M.A., Kass R.S., Staub O., et al. // *Circ. Res*. 2004. V. 95. № 3. P. 284–291.
25. Dunn D.M., Ishigami T., Pankow J., von Niederhausern A., Alder J., Hunt S.C., Leppert M.F., Lalouel J.M., Weiss R.B. // *J. Hum. Genet*. 2002. V. 47. № 12. P. 665–676.
26. Wen H., Lin R., Jiao Y., Wang F., Wang S., Lu D., Qian J., Jin L., Wang X. // *Clin. Exp. Hypertens*. 2008. V. 30. № 2. P. 87–94.
27. Strop P., Bankovich A.J., Hansen K.C., Garcia K.C., Brunger A.T. // *J. Mol. Biol*. 2004. V. 343. № 4. P. 1055–1065.
28. Alders M., Koopmann T.T., Christiaans I., Postema P.G., Beekman L., Tanck M.W., Zeppenfeld K., Loh P., Koch K.T., Demolombe S., et al. // *Am. J. Hum. Genet*. 2009. V. 84. № 4. P. 468–476.
29. Turbay D., Wechsler S.B., Blanchard K.M., Izumo S. // *Mol. Med*. 1996. V. 2. № 1. P. 86–96.
30. Hsueh K.C., Lin Y.J., Chang J.S., Wan L., Tsai F.J. // *Eur. J. Pediatr*. 2010. V. 169. № 6. P. 713–719.
31. Lian Y., Yue J., Han M., Liu J., Liu L. // *Infect. Genet. Evol*. 2010. V. 10. № 4. P. 517–521.
32. Lu X., Wang L., Chen S., He L., Yang X., Shi Y., Cheng J., Zhang L., Gu C.C. Huang J., et al. // *Nat. Genet*. 2012. V. 44. № 8. P. 890–894.
33. Boulton S.J., Jackson S.P. // *EMBO J*. 2008. V. 17. № 6. P. 1819–1828.
34. Galisteo M.L., Dikic I., Batzer A.G., Langdon W.Y., Schlessinger J. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. № 35. P. 20242–20245.
35. Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack H., Nardone J., Lee K., Reeves C., Li Y., et al. // *Cell*. 2007. V. 14. № 131 (6). P. 1190–1203.
36. Chi Y.I., Frantz J.D., Oh B.C., Hansen L., Dhe-Paganon S., Shoelson S.E. // *Mol. Cell*. 2002. V. 10. № 5. P. 1129–1137.
37. Suzuki H., Gabrielson E., Chen W., Anbazhagan R., van Engeland M., Weijnenberg M.P., Herman J.G., Baylin S.B. // *Nat. Genet*. 2002. V. 31. № 2. P. 141–149.
38. Bressler J., Folsom A.R., Couper D.J., Volcik K.A., Boerwinkle E. // *Am. J. Epidemiol*. 2010. V. 171. № 1. P. 14–23.
39. Rodenas-Cuadrado P., Ho J., Vernes S.C. // *Eur. J. Hum. Genet*. 2014. V. 22. P. 171–178.
40. Spirin V., Schmidt S., Pertsemliadis A., Cooper R.S., Cohen J.C., Sunyaev S.R. // *Am. J. Hum. Genet*. 2007. V. 81. № 6. P. 1298–1303.
41. Francke U., Brown M.S., Goldstein J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 9. P. 2826–2830.
42. Zhu H., Tucker H.M., Grear K.E., Simpson J.F., Manning A.K., Cupples L.A., Estus S. // *Hum. Mol. Genet*. 2007. V. 16. № 14. P. 1765–1772.
43. Martinelli N., Girelli D., Lunghi B., Pinotti M., Marchetti G., Malerba G., Pignatti P.F., Corrocher R., Olivieri O., Bernardi F. // *Blood*. 2010. V. 116. № 25. P. 5688–5697.
44. Takada D., Emi M., Ezura Y., Nobe Y., Kawamura K., Iino Y., Katayama Y., Xin Y., Wu L.L., Larringa-Shum S., et al. // *J. Hum. Genet*. 2002. V. 47. P. 656–664.
45. Vassiliadis E., Barascuk N., Didangelos A., Karsdal M.A. // *Biomark. Insights*. 2012. № 7. P. 45–57.
46. Brachtl G., Sahakyan K., Denk U., Girbl T., Alinger B., Hofbauer S.W., Neureiter D., Hofbauer J.P., Egle A., Greil R., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 8. e23758.
47. Conroy J., Cochrane L., Anney R.J., Sutcliffe J.S., Carthy P,

- Dunlop A., Mullarkey M., O'hici B., Green A.J., Ennis S., et al. // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2009. V. 150B. № 4. P. 535–544.
48. Pasmant E., Laurendeau I., Heron D., Vidaud M., Vidaud D., Bieche I. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 3963–3969.
49. Broadbent H.M., Peden J.F., Lorkowski S., Goel A., Ongen H., Green F., Clarke R., Collins R., Franzosi M.G., Tognoni G., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. P. 806–814.
50. Behrmann I., Wallner S., Komyod W., Heinrich P.C., Schuierer M., Buettner R., Bosserhoff A.K. // *Am. J. Pathol.* 2003. V. 163. P. 683–690.
51. Miyagawa K., Tsuruga T., Kinomura A., Usui K., Katsura M., Tashiro S., Mishima H., Tanaka K. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 1–2. P. 175–180.
52. Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., Wu D., Zuker C.S., Ryba N.J. // *Cell.* 2003. V. 112. № 3. P. 293–301.
53. Kim U.K., Jorgenson E., Coon H., Leppert M., Risch N., Drayna D. // *Science.* 2003. V. 299(5610). P. 1221–1225.
54. Lei L., Laub F., Lush M., Romero M., Zhou J., Luikart B., Klesse L., Ramirez F., Parada L.F. // *Genes. Dev.* 2005. V. 19. № 11. P. 1354–1364.
55. Kanazawa A., Kawamura Y., Sekine A., Iida A., Tsunoda T., Kashiwagi A., Tanaka Y., Babazono T., Matsuda M., Kawai K., et al. // *Diabetologia.* 2005. V. 48. № 7. P. 1315–1322.
56. Zobel D.P., Andreasen C.H., Burgdorf K.S., Andersson E.A., Sandbaek A., Lauritzen T., Borch-Johnsen K., Jorgensen T., Maeda S., Nakamura Y., et al. // *Eur. J. Endocrinol.* 2009. V. 160. № 4. P. 603–609.
57. Gudmundsson J., Sulem P., Steinthorsdottir V., Bergthorsson J.T., Thorleifsson G., Manolescu A., Rafnar T., Gudbjartsson D., Agnarsson B.A., Baker A., et al. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 8. P. 977–983.