

На правах рукописи

Жейкова Татьяна Владимировна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА: СВЯЗЬ С ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ И
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения РАМН, г. Томск

Научный руководитель:

Пузырев Валерий Павлович, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Назаренко Людмила Павловна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории наследственной патологии ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН

Ковалев Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением детской кардиологии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск

Защита состоится «11» апреля 2013 года в ___ час. ___ мин. на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «НИИ медицинской генетики» СО РАМН по адресу: г. Томск, Московский тракт, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ медицинской генетики» СО РАМН (634050 г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10)

Автореферат разослан «___» марта 2013 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Хитринская И.Ю.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы: На протяжении последних десятилетий неуклонно растет количество исследований, посвященных генетике многофакторных заболеваний. Изучение генетических факторов наследования таких болезней осложняется наличием большого количества генов с малыми эффектами, вовлеченных в формирование предрасположенности к болезни [Бочков, 2001; McKusik, 2001; McCarthy, 2008; Torkamani, 2008; Пузырев, 2009, 2011].

Наряду с широко распространенным в настоящее время полногеномным анализом ассоциаций важным остается исследование кандидатных генов, т.е. генов, продукты которых потенциально вовлечены в патогенез заболевания. При этом важную роль играет выбор генов – компонентов определенной геномной сети, контролирующей и регулирующей жизненно важные функции организма, а также генов, участвующих в отдельных биохимических и патофизиологических путях и механизмах [Колчанов, 2000; Varabasi, 2011].

Одним из патофизиологических механизмов, задействованных в развитии широкого спектра заболеваний, является окислительный стресс, который играет важную роль в патогенезе ишемической болезни сердца (ИБС), атеросклероза, сахарного диабета, нарушений мозгового кровообращения, онкологических и нейродегенеративных заболеваний и т.д. [Болдырев, 1995; Владимиров, 1998; Зенков, 2001; Воробьева, 2005; Меньщикова, 2006; Diaz, 1997; Ray, 2012], а также задействован в механизме старения организма и апоптоза [Анисимов, 2003; Ляхович, 2005; Скулачев, 2007, 2009; Тодоров, 2007]. Окислительный стресс является следствием нарушения баланса между продукцией активных форм кислорода прооксидантной системой и их детоксикацией системой антиоксидантной защиты в направлении повышения уровня активных форм кислорода (АФК): супероксидного анион-радикала, перекиси водорода, гидроксильного радикала [Воробьева, 2005; Fariss, 2005; Burton, 2011].

Основными источниками активных форм кислорода в клетках являются НАДФН-оксидаза, локализованная в цитоплазматической мембране макрофагов и нейтрофилов [Manea, 2010; Dikalov, 2011; Lassègue, 2012] и дыхательная цепь митохондрий [Андреев, 2005; Тодоров, 2007; Kowaltowski, 2009; Murphy, 2009], многие компоненты которой кодируются митохондриальной ДНК (мтДНК) [Taylor, 2005; Greaves, 2012]. Функционирование мтДНК определяется влиянием ядерных генов, среди которых можно выделить ген митохондриального фактора транскрипции А (*TFAM*), активирующий экспрессию генов мтДНК [Litonin, 2010; Ngo, 2011; Campbell, 2012], и ген митохондриальной ДНК-полимеразы γ (*POLG*), участвующий в процессах репликации и репарации мтДНК [Chan, 2009; Copeland, 2010; Saneto, 2010].

Для защиты клеток и тканей от окислительного стресса в организме существует антиоксидантная система, которая включает в себя ряд ферментов: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза [Владимиров, 1998; Меньщикова, 2006; Halliwell, 2012]. Кроме того, АФК активируют экспрессию генов, кодирующих ферменты антиоксидантной

защиты [Ляхович, 2005; 2006]. Также, существуют ферменты, которые опосредованно защищают клетку от окислительного стресса и его последствий. Например, параоксаназа обладает антиоксидантными свойствами, препятствуя окислительной модификации липидов [Marchegiani, 2008; Rosenblat, 2009; Sarian-Raczkowska, 2010].

Одним из наиболее распространенных многофакторных заболеваний, в патогенез которого вносит вклад окислительный стресс, является ишемическая болезнь сердца [Бокерия, 2007; Samani, 2007; Fearon, 2009; Negi, 2010]. Повреждающее действие активных форм кислорода на эндотелий сосудов и окислительная модификация липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) рассматриваются как ключевые факторы в развитии атеросклероза и ишемической болезни сердца [Diaz, 1997; Ланкин, 2000; Панкин, 2004; Higashi, 2009; Sugamura, 2011].

Активные формы кислорода играют также важную роль в процессе старения организма. Согласно свободнорадикальной теории старения, скорость накопления повреждений и возрастных изменений в клетках определяется соотношением процессов образования свободных радикалов и их нейтрализации антиоксидантной системой [Harman, 1956, 2006; Анисимов, 2003; Скулачев, 2007, 2009].

На структуру и функцию белков, задействованных в регуляции окислительного стресса, может оказывать значимое влияние генетический полиморфизм. Функциональные миссенс-полиморфизмы, приводящие к замене одной аминокислоты на другую, могут приводить к изменению заряда белковой молекулы, замены в различных доменах белка, в зависимости от локализации, могут изменять активность фермента, сродство с субстратом, специфичность и т.д. Полиморфизмы в регуляторных участках гена, например, промоторных, влияют на интенсивность транскрипции, что приводит к изменению количества синтезируемого белка. Вариабельность нуклеотидной последовательности генов окислительного стресса может оказывать влияние на уровень окислительного стресса организма [Halliwell, 2012].

Исследователями в разных странах получены данные о наличии или отсутствии ассоциаций полиморфных вариантов генов белков, оказывающих прямое или косвенное влияние на окислительный стресс, с продолжительностью жизни и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) [Паук, 2007; Баранов, 2007; Tang, 2008; Soerensen, 2009; Солодилова, 2009; Пардо Пералес, 2009; Кухарчук, 2010; Майкова, 2012]. Однако в подавляющем большинстве исследований гены белков, обладающих анти- либо прооксидантными свойствами, и влияние митохондриального генома на окислительный стресс изучают отдельно.

Поскольку окислительный стресс задействован как в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, так и в механизмах старения, можно предположить, что аллели, ассоциированные с долгожительством, могут быть протективными по отношению к развитию ишемической болезни сердца. В пользу этого предположения говорят данные о том, что у долгожителей реже

встречается патология сердечно-сосудистой системы, чем у лиц пожилого возраста [Шабалин, 2006].

Таким образом, изучение полиморфных вариантов генов, задействованных в метаболических путях регуляции окислительного стресса, и выявление ассоциаций этих полиморфных вариантов с ишемической болезнью сердца и с влиянием на продолжительность жизни является актуальным. Представляет интерес комплексное исследование генетической основы окислительного стресса: изучение генов, обладающих про- и антиоксидантной активностью, митохондриального генома и генов, оказывающих влияние на функционирование митохондриальной ДНК.

Цель работы: изучить связь полиморфизма генов окислительного стресса с предрасположенностью к ишемической болезни сердца и продолжительностью жизни, а также с изменчивостью патогенетически значимых количественных признаков.

Задачи исследования:

1. Провести анализ ассоциаций полиморфных вариантов ядерных генов компонентов про- и антиоксидантной системы (*CYBA*, *SOD2*, *GPX1*, *CAT* и *PON1*) с долгожительством, ишемической болезнью сердца и ранней смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний.
2. Провести анализ ассоциаций гаплогрупп мтДНК и полиморфных вариантов генов-регуляторов функционирования мтДНК (*TFAM* и *POLG*) с изучаемыми фенотипами.
3. Изучить связь полиморфных вариантов генов окислительного стресса и митохондриальной ДНК с количественными признаками (показатели ЭхоКГ, показатели липидного обмена, индекс массы тела), значимыми для функционирования сердечно-сосудистой системы.
4. Оценить значимость вклада сочетаний изученных полиморфных вариантов ядерных генов в определении исследуемых фенотипов.

Научная новизна: Получены новые знания о вкладе полиморфных вариантов ряда ядерных генов и митохондриального генома, задействованных в регуляции окислительного стресса, в определение продолжительности жизни и развитие ишемической болезни сердца. Впервые установлено, что аллель Т полиморфного варианта С242Т гена *CYBA* ассоциирован с долгожительством у женщин, а генотип СС (Thr/Thr) полиморфного локуса Ser12Thr гена *TFAM* ассоциирован с развитием ишемической болезни сердца у мужчин. Показано, что митохондриальная гаплогруппа Н1 ассоциирована с ранней смертностью (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний. Выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов компонентов про- и антиоксидантной системы с количественными признаками, значимыми для функционирования сердечно-сосудистой системы.

Научно-практическая значимость исследования: Полученные данные могут быть востребованы при разработке исследовательских и диагностических панелей генетических маркеров для выявления наследственной предрасположенности к развитию ишемической болезни сердца. Сведения о полиморфных вариантах генов, участвующих в регуляции окислительного

стресса у жителей г. Томска, могут быть использованы при проведении генетико-эпидемиологических исследований. Материалы работы могут быть применены в учебно-методическом процессе на биологических и медицинских факультетах высших учебных заведений.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Полиморфный вариант C242T (*CYBA*) ассоциирован с долгожительством у женщин, а вариант Pro198Leu (*GPXI*) ассоциирован с ранней смертностью (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин.
2. Полиморфные локусы Ala16Val (*SOD2*), Ser12Thr (*TFAM*) и Pro198Leu (*GPXI*) вносят вклад в развитие ишемической болезни сердца.
3. Установлена ассоциация митохондриальной гаплогруппы H с ишемической болезнью сердца и митохондриальной гаплогруппы H1 с ранней смертностью (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний.
4. Локусы Ala16Val (*SOD2*), Pro198Leu (*GPXI*), Gln192Arg (*PONI*), C242T (*CYBA*) и митохондриальная гаплогруппа H вносят вклад в изменчивость количественных признаков, значимых для функционирования сердечно-сосудистой системы.

Апробация работы: Основные результаты исследования по теме диссертационной работы доложены и обсуждены на межлабораторных научных семинарах ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск, 2009, 2013), Ежегодной Европейской конференции по генетике человека (Вена, 2009; Амстердам, 2011); VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томской государственном университете (Томск, 2010).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Данные проиллюстрированы 24 таблицами, 15 рисунками. Библиографический список включает 356 источников, из них 45 работ отечественных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования было сформировано четыре группы: долгожители; больные ИБС, перенесшие инфаркт миокарда в анамнезе; умершие до 55 лет от сердечно-сосудистых заболеваний; популяционная выборка (жители г. Томска).

Выборку долгожителей составили 243 человека (средний возраст 92 ± 3 года). Среди них было 24% мужчин и 76% женщин. Выборка была сформирована на базе поликлиник г.Томска (133 человека), а также была использована ДНК долгожителей г.Новосибирска (110 человек), предоставленная ФГБУ НИИ терапии СО РАМН (д-р. мед. наук Воевода М.И.,

д-р. мед. наук Максимов В.Н.). Критерием включения в выборку послужил возраст (от 90 лет и старше).

Выборка больных ИБС включала 175 человек (средний возраст 55±8 лет). Среди них было 90% мужчин и 10% женщин. Формирование выборки осуществлялось по мере поступления больных на стационарное лечение в ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН (д-р. мед. наук Шипулин В.М., канд. мед. наук Лежнев А.А.). Критериями включения служили диагноз ИБС и наличие перенесенного инфаркта миокарда в анамнезе. Диагноз ИБС ставили на основании результатов клинико-инструментального обследования в соответствии с критериями ВОЗ.

Выборка лиц, умерших в возрасте до 55 лет, составила 94 человека (средний возраст 47±7 лет). Среди них было 81% мужчин и 19% женщин. Выборка формировалась на базе Бюро судебной медицинской экспертизы Томской области (Калянов Е.В.). Критерием включения являлся возраст смерти (до 55 лет) и причина смерти – сердечно-сосудистые заболевания и нарушения мозгового кровообращения.

В качестве **контрольной группы** использовалась рандомизированная популяционная выборка, сформированная из жителей г. Томска в возрасте от 22 до 74 лет, численностью 424 человека (средний возраст 47±10 лет; 54% мужчин и 46% женщин). Выборка предоставлена ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (канд. мед. наук Цимбалюк И.В.).

Исследованные выборки различались по половому составу, поэтому, учитывая гендерные различия в патогенезе ССЗ, сначала сравнивали частоты генотипов и аллелей в контрольной выборке у мужчин и женщин. Если статистически достоверных различий не выявляли, то проводили сравнительный анализ между общими выборками.

В рамках работы проводили генотипирование 8 однонуклеотидных полиморфных вариантов 7 ядерных генов: *SOD2*, *GPX1*, *CAT*, *PON1*, *CYBA*, *TFAM* и *POLG* (табл. 1) и исследование полиморфизма митохондриальной ДНК.

Таблица 1

Характеристика исследованных полиморфных вариантов

Ген	Полиморфный локус	Rs номер	Локализация в гене	Хромосомная локализация	Фермент рестрикции
<i>SOD2</i>	Ala16Val	rs4880	Экзон	6q25.3	<i>BshTI</i>
<i>GPX1</i>	Pro198Leu	rs1050450	Экзон	3p21.3	<i>HaeIII</i>
<i>CAT</i>	C-262T	rs1001179	Промотор	11p13	<i>SmaI</i>
<i>PON1</i>	Leu55Met	rs854560	Экзон	7q21.3	<i>HinfI</i>
<i>PON1</i>	Gln192Arg	rs662	Экзон	7q21.3	<i>HinfI</i>
<i>CYBA</i>	C242T	rs4673	Экзон	16q24.3	<i>RsaI</i>
<i>TFAM</i>	Ser12Thr	rs1937	Экзон	10q21	<i>DdeI</i>
<i>POLG</i>	T/C	rs2238296	Интрон	15q25	<i>MspI</i>

Материалом для исследования являлась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови и из аутопсийных образцов печени методом фенол-хлороформной экстракции.

Генотипирование по ядерным локусам осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Полиморфизм митохондриальной ДНК изучали с помощью секвенирования первого гипервариабельного сегмента (ГВС1) D-петли митохондриальной ДНК (16024-16400 п.н.) по методу Сенгера. Принадлежность мтДНК к отдельным гаплогруппам определяли с помощью рестрикционного анализа.

Обработку полученных данных осуществляли с помощью пакетов статистического анализа данных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0. Для оценки соответствия наблюдаемых распределений частот генотипов теоретически ожидаемым распределениям при равновесии Харди-Вайнберга использовали критерий χ^2 Пирсона. Для попарного сравнения частот генотипов и аллелей между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность или двусторонний точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для выполнения анализа ассоциаций количественных признаков проводили проверку количественных показателей на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Показатели с ненормальным распределением подвергали логарифмированию, что позволяет использовать в дальнейшем параметрические статистические методы. Сравнение средних значений независимых переменных выполняли с использованием однофакторного дисперсионного анализа по Фишеру [Лакин Г.Ф., 1990]. С целью уменьшения размерности данных и выделения наиболее значимых интегральных факторов, определяющих изменчивость количественных признаков, применяли метод главных компонент или факторный анализ [Ким, Мьюллер, 1989]. Для выделения главных компонент и их смысловой интерпретации проводили процедуру вращения, максимизирующего дисперсию исходного пространства данных (Varimax normalized).

Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель отношение шансов (OR). Величина $OR=1$ указывает на отсутствие ассоциации, $OR > 1$ – имеет место при положительной ассоциации ("фактор риска") и $OR < 1$ – отрицательная ассоциация аллеля с заболеванием. Обсуждение величин OR проводили при уровне значимости не более 5% [Pearce N., 1993].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование проводили в несколько этапов. На первом этапе оценивали частоты генотипов и аллелей исследованных полиморфных локусов и проводили анализ ассоциаций полиморфных вариантов с изучаемыми фенотипами. Затем был выполнен анализ фенотипической изменчивости количественных признаков в выборках больных ИБС и контрольной выборке. На третьем этапе проводили анализ суммарного вклада сочетаний полиморфных вариантов ядерных генов в определении изученных фенотипов.

Исследованные выборки различались по половому составу: выборки больных ИБС и лиц, умерших до 55 лет, состояли преимущественно из мужчин

на 90% и 81% соответственно, а в выборке долгожителей преобладали женщины – 76%. В контрольной группе доля мужчин и женщин была 54% и 46% соответственно. Учитывая гендерные различия в патогенезе ССЗ, сначала сравнивали распределение частот генотипов и аллелей в контрольной выборке отдельно у мужчин и женщин. Если статистически достоверных различий не выявляли, то проводили попарный сравнительный анализ между общими выборками. Сравнительный анализ проводили как между общими выборками, так и между мужчинами и женщинами отдельно. Группа женщин больных ИБС и женщин, умерших до 55 лет, была слишком малочисленной для анализа, поэтому сравнения их с популяционной выборкой женщин не проводили. Из выборки больных ИБС отдельно выделяли для сравнения с контрольной группой подвыборку больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда (ИМ) до 50 лет, т.к. предполагается, что у лиц с ранним инфарктом миокарда генетические факторы предрасположенности более существенны [Kathiresan, 2009].

Характеристика изменчивости полиморфных вариантов генов *SOD2*, *GPXI*, *CAT*, *PON1*, *CYBA*, *TFAM* и *POLG* в обследованных выборках

Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов в популяционной выборке находились в пределах величин, характерных для популяций европейского происхождения. Распределение генотипов в контрольной выборке по всем исследованным локусам соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (РХВ).

Отклонение от РХВ в остальных группах было выявлено только для двух локусов. В общей выборке долгожителей, в подгруппе долгожителей-женщин, а также в группе больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда до 50 лет, наблюдалось отклонение от РХВ по полиморфному варианту Pro198Leu гена *GPXI*. При этом у долгожителей наблюдался избыток гетерозигот и отмечена низкая частота редких гомозигот ТТ, что может быть связано с отбором против них, так как этот генотип ассоциирован с ранним инфарктом миокарда (см. ниже). Отклонение от РХВ по этому гену в выборке ИБС объясняется так же ассоциацией генотипа ТТ с ранним ИМ. Во втором случае отклонение наблюдалось по полиморфному варианту Ser12Thr гена *TFAM* в выборке больных ИБС мужчин и в группе больных ИБС с ИМ до 50 лет за счет избытка редких гомозигот СС. Отклонение объясняется выявленной ассоциацией генотипа СС с ИБС у мужчин (см. ниже).

Сравнительный анализ по частотам аллелей и генотипов между мужчинами и женщинами популяционной выборки показал статистически значимые различия только по одному локусу: С242Т гена *CYBA*. Вследствие этого, сравнения частот аллелей и генотипов этого локуса проводили отдельно для мужчин и женщин.

Анализ ассоциаций изученных полиморфных локусов с долгожительством

Сравнительный анализ по частотам генотипов и аллелей исследованных полиморфных вариантов показал статистически значимые различия только для одного локуса: С242Т гена *CYBA*.

Полиморфный вариант C242T гена *СУВА*

Ассоциация аллеля Т с долгожительством у женщин: Сравнение между группами женщин популяционной выборки и выборки женщин-долгожителей выявило статистически значимое различие по частотам аллелей ($\chi^2=4,969$; $p=0,026$; $OR=1,47$): частота аллеля Т в выборке женщин-долгожителей была статистически значимо выше (34,39%) по сравнению с контролем (26,32%) (Рис. 1). По частотам генотипов статистически значимых различий не было выявлено. При этом при сравнении частот генотипов и аллелей между мужчинами изучаемых выборок не показано статистически значимых различий.

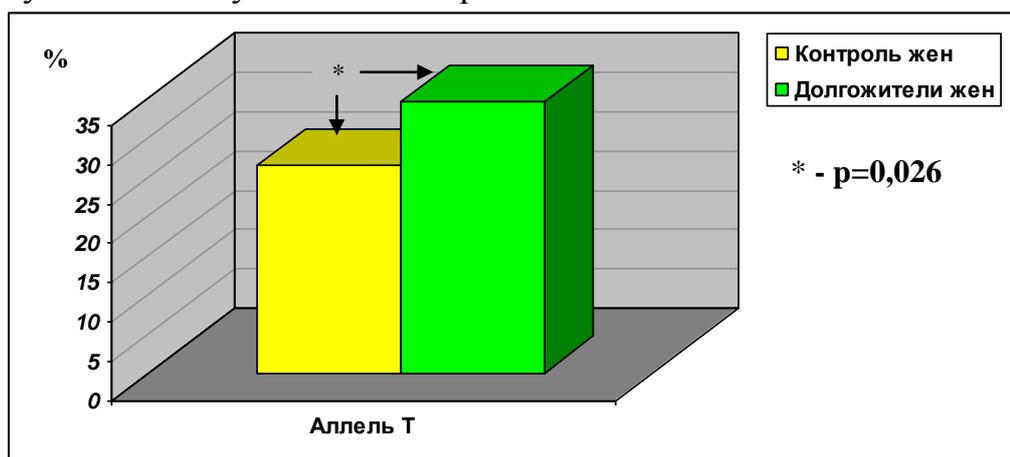


Рис. 1. Частоты аллеля Т локуса C242T гена *СУВА* у женщин контрольной группы и женщин – долгожителей.

Ген *СУВА* кодирует α -субъединицу НАДФН-оксидазы – одного из основных источников супероксида в клетках сосудов [Manea, 2010; Dikalov, 2011; Lassègue, 2012]. Ассоциацию аллеля Т с долгожительством можно объяснить тем, что замена гистидина (аллель С) на тирозин (аллель Т) может приводить к снижению продукции супероксида посредством повреждения гем-связывающих сайтов НАДФН-оксидазы [Cahilly, 2000; Soccio, 2005] и, соответственно, к более низкому уровню окислительного стресса, что является благоприятным фактором для долгожительства. В пользу этого предположения говорят данные исследований о том, что у носителей аллеля Т продукция супероксида ниже, чем у носителей аллеля С [Arca, 2008; Schirmer, 2008].

Анализ ассоциаций изученных полиморфных локусов с ИБС и ранней смертностью от ССЗ

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей исследованных полиморфных вариантов показал статистически значимые различия для трех локусов: Ala16Val гена *SOD2*, Ser12Thr гена *TFAM* и Pro198Leu гена *GPX1*.

Полиморфный вариант Ala16Val гена *SOD2*

Ассоциация аллеля Т с ИБС: Между контрольной выборкой и выборкой больных ИБС отмечено статистически значимое различие по частотам аллелей ($\chi^2=4,551$; $p=0,033$; $OR=1,33$) за счет преобладания аллеля Т в группе больных ИБС. Частота аллеля Т в популяционной выборке составила 48,18%, а в группе больных ИБС – 55,23% (Рис. 2). По частотам генотипов различий не выявлено.

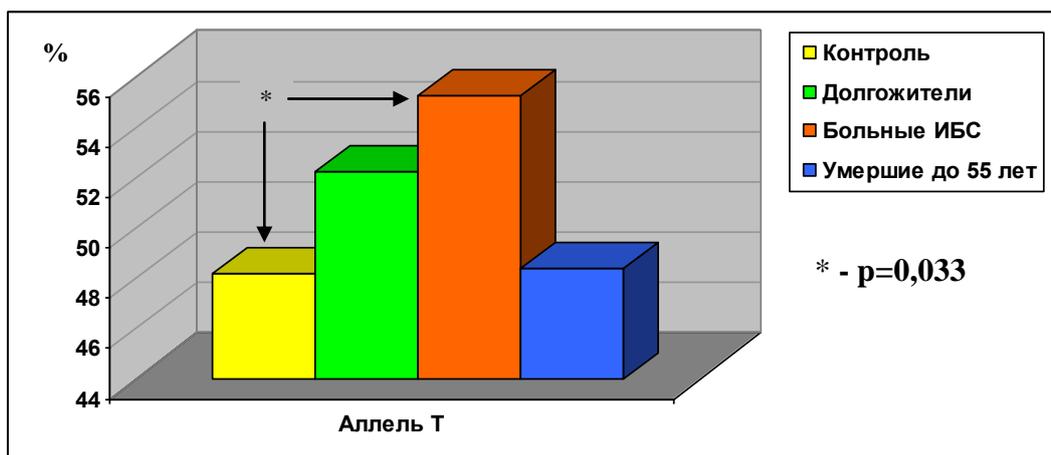


Рис. 2. Частоты аллеля T (Val) локуса Ala16Val гена *SOD2* в изученных выборках.

Ген *SOD2* кодирует фермент супероксиддисмутаза-2, оказывающую антиоксидантное действие в митохондриях путем превращения супероксид-аниона в перекись водорода [Miao, 2009; Fukai, 2011; Miller, 2012]. Полиморфизм Ala16Val, приводящий к замене аланина на валин, локализован в участке, отвечающем за связывание с митохондрией для транспортировки фермента в митохондриальный матрикс, где этот участок расщепляется, и супероксиддисмутаза переходит в активную форму [Rosenblum, 1996]. Отмечено, что фермент, содержащий в этой позиции Val(T), транспортируется в матрикс медленнее, чем белок с Ala(C). Соответственно, у носителей аллеля T и генотипа TT накапливается супероксид, что приводит к большей выраженности окислительных повреждений мтДНК [Sutton, 2005; Martin, 2009], которые могут нарушать синтез АТФ митохондрией [Lee, 2007; Wei, 2009], что приводит к ССЗ [Finsterer, 2007; Victor, 2009; Limongelli, 2012].

Полиморфный вариант Pro198Leu гена *GPX1*

Сравнение распределений частот генотипов локуса Pro198Leu гена *GPX1* выявило статистически значимые различия в трех случаях.

Ассоциация генотипа TT с ИБС: Обнаружена более высокая частота генотипа TT в группе больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда до 50 лет – 19,44%, по сравнению с контрольной группой – 7,28% ($\chi^2=11,375$; $p=0,003$; OR=3,07) (Рис. 3).

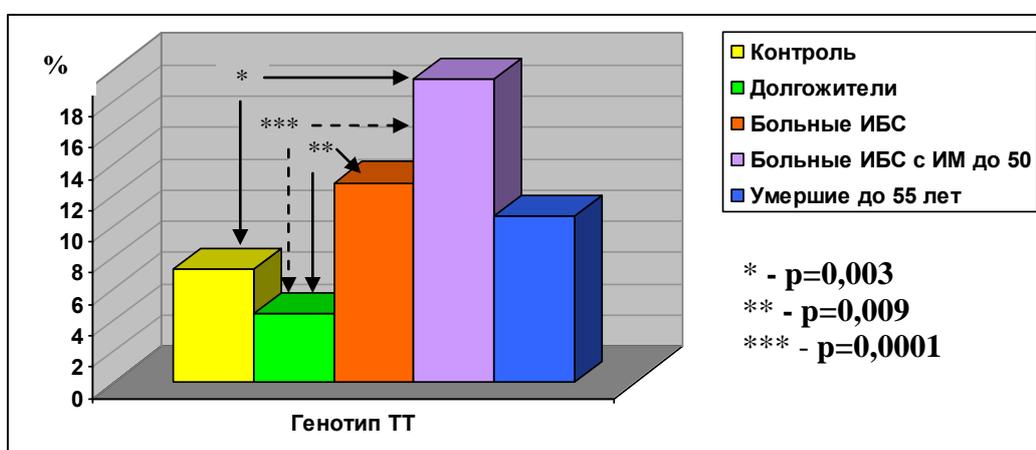


Рис. 3. Частоты генотипа TT (Leu) локуса Pro198Leu гена *GPX1* в изученных выборках.

Кроме того, выявлены различия в распределении частот генотипов при сравнении выборки долгожителей с группой больных ИБС и с подгруппой больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда до 50 лет. Частота генотипа ТТ у долгожителей (4,46%) была статистически значимо ниже, чем в группе больных ИБС (12,79%): $\chi^2=9,508$; $p=0,009$; $OR=3,15$; и в подгруппе больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда до 50 лет (19,44%): $\chi^2=17,662$; $p=0,0001$; $OR=5,18$; (Рис. 3).

Ассоциация аллеля Т с ИБС и ранней смертностью от ССЗ у мужчин:

Сравнительный анализ частот аллелей в выборках мужчин показал статистически значимо более высокую частоту аллеля Т у мужчин больных ИБС – 34,84% ($\chi^2=5,228$; $p=0,022$; $OR=1,46$) и у мужчин, умерших от ССЗ до 55 лет, – 38,16% ($\chi^2=6,461$; $p=0,011$; $OR=1,69$), по сравнению с мужчинами из популяционной выборки – 26,8% (Рис. 4).

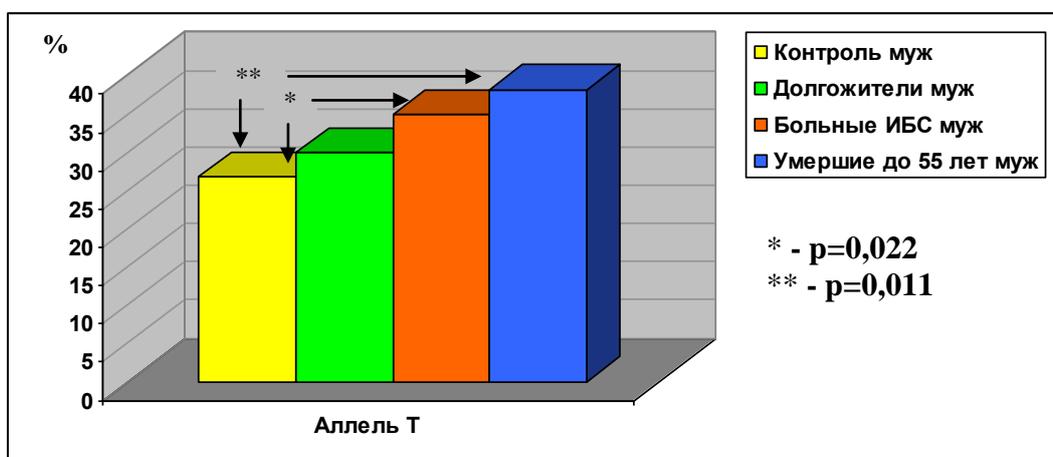


Рис. 4. Частоты аллеля Т (Leu) локуса Pro198Leu гена *GPX1* у мужчин изученных выборок.

Ассоциация генотипа ТТ с ранней смертностью от ССЗ у мужчин:

Частота генотипа ТТ у мужчин, умерших в возрасте до 55 лет от ССЗ (13,6%), была статистически значимо выше, чем у мужчин контрольной выборки (7,21%): $\chi^2=7,100$; $p=0,029$; $OR=1,25$ (Рис. 5).

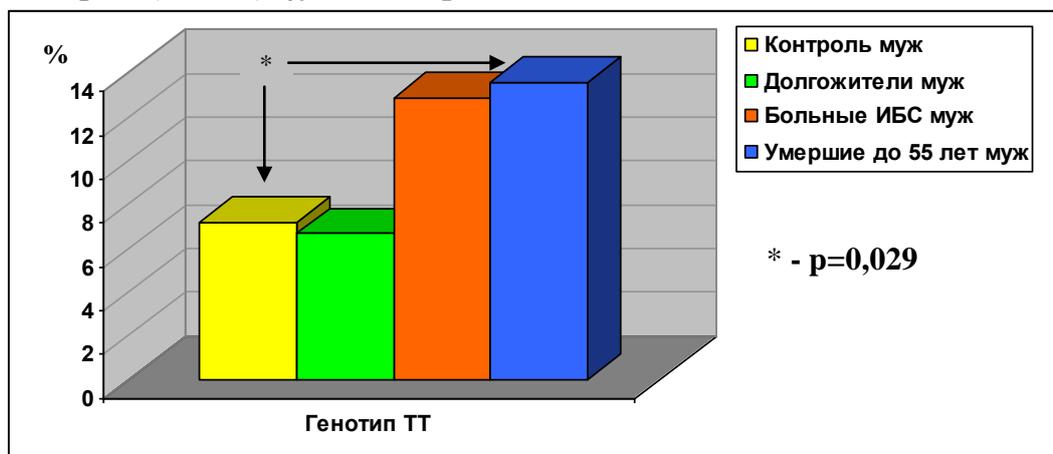


Рис. 5. Частоты генотипа ТТ (Leu) локуса Pro198Leu гена *GPX1* у мужчин изученных выборок.

Ген *GPX1* кодирует глутатионпероксидазу 1 – антиоксидантный фермент, который осуществляет восстановление перекиси водорода до воды [Herbette, 2007; Soerensen, 2009; Lubos, 2011]. Глутатионпероксидаза-1 защищает сосудистую стенку от окислительного стресса и атерогенеза [Blankenberg, 2003; Tzewski, 2007]. В исследовании на мышах обнаружено, что дефицит

глутатионпероксидазы приводит к эндотелиальной дисфункции и ускоряет процесс атеросклероза [Forgione, 2002]. Отмечено, что фермент с заменой пролина на лейцин (аллель Т) обладает более низкой ферментативной активностью [Ну, 2003; Кухарчук, 2010]. Соответственно у носителей аллеля Т и генотипа ТТ уровень АФК будет выше, что способствует развитию ССЗ.

Таким образом, данные нашего исследования указывают на ассоциацию полиморфного варианта Pro198Leu гена *GPXI* с ССЗ. Носительство более редкого аллеля Т (Leu), приводящего к снижению активности фермента, является фактором, предрасполагающим к ИБС и ранней смерти от сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин. Неблагоприятный эффект наиболее выражен у носителей генотипа ТТ, для которых значительно повышен риск раннего инфаркта миокарда.

Полиморфный вариант *Ser12Thr* гена *TFAM*

Ассоциация генотипа СС с ИБС у мужчин: Сравнительный анализ между мужчинами контрольной группы и мужчинами больными ИБС по частотам генотипов показал статистически значимое различие ($\chi^2=7,264$; $p=0,030$) за счет более высокой частоты генотипа СС в выборке больных ИБС мужчин (OR=10,45), которая составила 4,52% по сравнению с контрольной группой – 0,45% (Рис. 6). По частотам аллелей различий не выявлено.

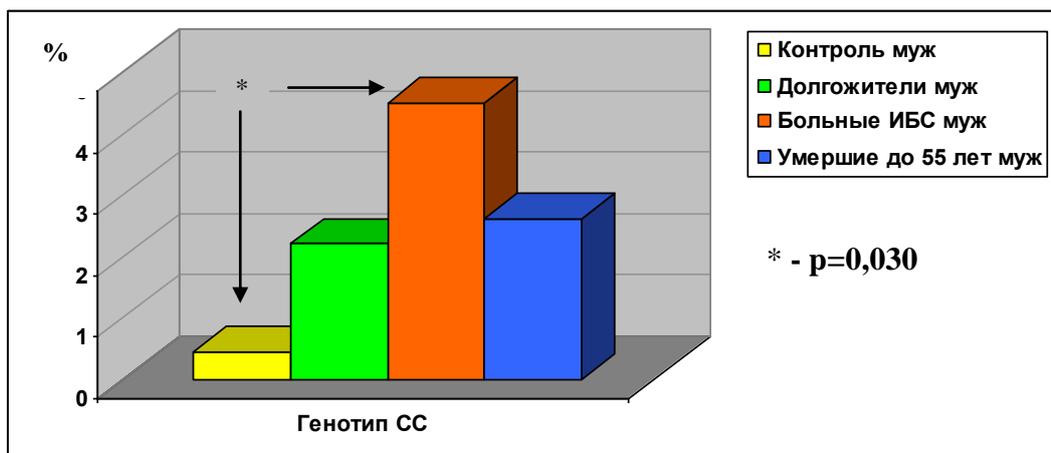


Рис. 6. Частоты генотипа СС (Thr) локуса *Ser12Thr* гена *TFAM* у мужчин изученных выборок.

Ген *TFAM* кодирует митохондриальный фактор транскрипции А – ключевой активатор митохондриальной транскрипции и участник процесса репликации мтДНК [Campbell, 2012]. Количество копий мтДНК прямо пропорционально уровню митохондриального фактора транскрипции А [Ekstrand, 2004; Hance, 2005]. У нокаутированных по гену *TFAM*^{-/-} мышей наблюдается резкое снижение количества мтДНК и, как следствие, нарушение окислительного фосфорилирования, что фенотипически выражается в виде пороков развития сердечно-сосудистой и нервной систем [Larsson, 1998]. Возможно, аминокислотная замена приводит к нарушению работы фактора транскрипции мтДНК, что способствует развитию ИБС.

Полученные данные позволяют сделать заключение о том, что генотип СС полиморфизма *Ser12Thr* гена *TFAM* ассоциирован с развитием ИБС у мужчин.

Полиморфизм митохондриальной ДНК

В рамках исследования проводили анализ ассоциаций гаплогрупп Н, Н1, HV, I, J, T, U4, U5a, U5b, U-K, V и W, а также полиморфных вариантов T16189C и T16519C с ИБС и продолжительностью жизни. Следует отметить, что в нашем исследовании мы анализируем отдельно от гаплогруппы Н наиболее частую ее подгруппу Н1. Ассоциаций с долгожительством не было выявлено, однако был установлен вклад гаплогрупп Н и Н1 в развитие ССЗ.

Ассоциация гаплогруппы Н с ИБС: Сравнительный анализ показал, что частота гаплогруппы Н в группе больных ИБС, составившая 35,43%, статистически значимо выше, чем в контрольной группе – 26,65% ($\chi^2=4,20$; $p=0,0404$; OR=1,51) и в группе долгожителей – 22,63% ($\chi^2=7,64$; $p=0,0057$; OR=1,88) (Рис. 7).

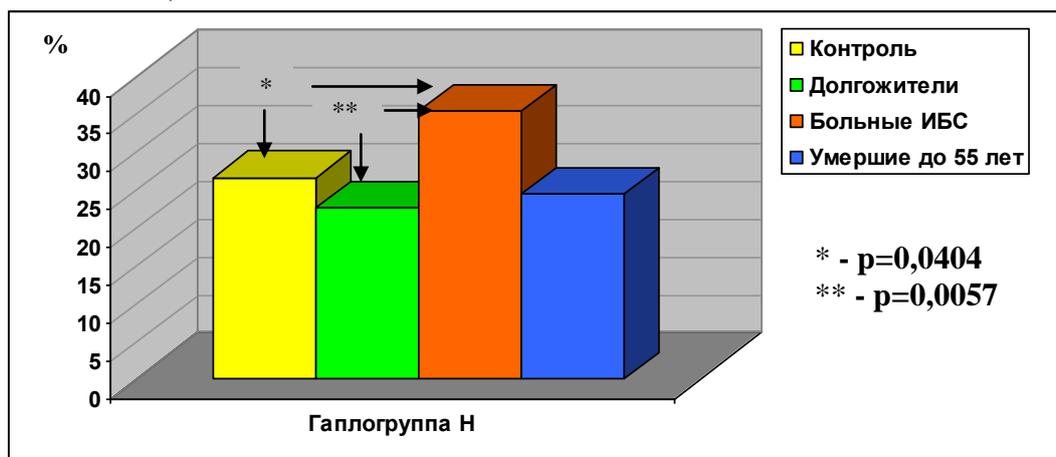


Рис. 7.
Частоты гаплогруппы Н в изученных выборках

При этом сравнительный анализ в группе мужчин этих же выборок показал более высокий уровень значимости различий при сравнении частоты гаплогруппы Н у мужчин больных ИБС (36,94%) с контролем (25,97%): $\chi^2=4,81$; $p=0,0283$; OR=1,67; и с долгожителями (17,24%): $\chi^2=6,67$; $p=0,0095$; OR=2,81.

Ассоциация гаплогруппы Н1 с ранней смертностью от ССЗ: При сравнительном анализе выявлена статистически значимо более высокая частота гаплогруппы Н1 у лиц, умерших до 55 лет от ССЗ (21,28%), по сравнению с контрольной группой (12,03%): $\chi^2=4,81$; $p=0,0283$; OR=1,98 (Рис. 8).

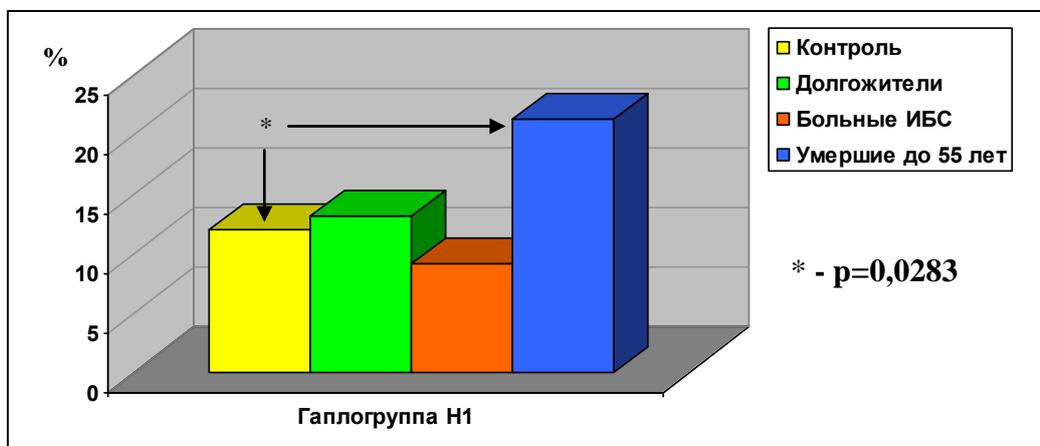


Рис. 8.
Частоты гаплогруппы Н1 в изученных выборках

Отмечено, что у носителей гаплогруппы Н значительно выше продукция АФК [Arning, 2010] и выше уровень окислительных повреждений мтДНК [Martínez-Redondo, 2010]. Повышенная продукция АФК может приводить к

эндотелиальной дисфункции и развитию атеросклероза и ИБС [Fearon, 2009; Higashi, 2009; Gori, 2011]. Ранее была выявлена ассоциация гаплогруппы Н с ранним инфарктом миокарда (до 55 лет) у курящих мужчин [Palacin, 2011]. А также отмечено, что гаплогруппа Н встречалась статистически значимо чаще у больных ИБС, чем в контрольной группе [Майкова, 2012].

Для гаплогруппы Н1 данных об ассоциации с ССЗ и продолжительностью жизни не найдено, но известна ассоциация с сахарным диабетом – заболеванием, в патогенезе которого также задействованы АФК [Soini, 2012].

Таким образом, гаплогруппа Н является фактором, предрасполагающим к развитию ИБС, причем у мужчин это более выражено. Носительство гаплогруппы Н1 ассоциировано с ранней смертностью от ССЗ.

Анализ ассоциаций исследованных полиморфных локусов и гаплогрупп с изученными количественными признаками в популяционной выборке и в группе больных ИБС

В изученных группах оценивались следующие количественные признаки: индекс массы тела (ИМТ); параметры эхокардиографического исследования: толщина межжелудочковой перегородки (МЖП) и задней стенки левого желудочка (ЗСЛЖ), конечный диастолический размер левого желудочка (КДР), конечный систолический размер левого желудочка (КСР) и фракция выброса (ФВ); показатели липидного спектра: уровень общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП); показатели артериального давления.

В популяционной выборке анализ ассоциаций проводили отдельно в группе мужчин и женщин. В группе больных ИБС анализ был выполнен только у мужчин, т.к. группа женщин больных ИБС была малочисленна.

Для комплексного изучения количественных признаков использовали метод главных компонент или факторный анализ, который позволяет получить интегральные характеристики выборки по спектру количественных признаков.

В контрольной выборке выделено три фактора, которые объясняли 62% фенотипической изменчивости анализируемых признаков как у мужчин, так и у женщин. В группе больных ИБС мужчин выделено 2 фактора, объясняющих 73% фенотипической изменчивости анализируемых признаков (табл. 2). Полученные факторы анализировали как количественный признак.

Таблица 2

Структура главных компонент в обследованных выборках

Фактор	Контроль ♀	Контроль ♂	Больные ИБС ♂
Сократительной функции миокарда ЛЖ	КДР, КСР	КДР, КСР	КДР, КСР, ФВ
Геометрии миокарда ЛЖ	МЖП, ЗСЛЖ	–	ИМТ, ЗСЛЖ
Атерогенности	–	САД, ДАД, ОХС, ЛПНП	–
Липидного обмена	ОХС, ТГ, ЛПНП, ЛПОНП	ТГ, ЛПОНП, ЛПВП	–

Анализ ассоциаций в контрольной популяционной выборке

Результаты однофакторного дисперсионного анализа в группе мужчин популяционной выборки продемонстрировали ассоциацию ИМТ с локусом Ala16Val (*SOD2*), толщины ЗСЛЖ с полиморфизмом Pro198Leu (*GPX1*) и показателей липидного обмена с двумя маркерами: локусом Ala16Val гена *SOD2* и гаплогруппы Н митохондриальной ДНК (табл. 3). В выборке женщин установлена ассоциация концентрации ЛПВП с полиморфным вариантом С242Т (*CYBA*), толщины ЗСЛЖ и МЖП с Pro198Leu (*GPX1*) и показателей артериального давления с локусом Gln192Arg гена *PON1* (табл. 4).

Таблица 3

Ассоциации полиморфизма исследуемых локусов с количественными признаками у мужчин популяционной выборки

Полиморфизм	Признак	Генотипы			p
		СТ	ТТ	СС	
<i>SOD2</i> (Ala16Val)	ИМТ	25,33±4,07 n=106	25,22±4,18 n=56	26,81±3,86 n=59	0,0495
	ОХС	5,75±1,04 n=96	5,53±0,89 n=51	6,09±0,94 n=50	0,0162
	ЛПНП	3,80±0,86 n=95	3,59±0,80 n=51	4,08±0,82 n=50	0,0132
<i>GPX1</i> (Pro198Leu)	ЗСЛЖ	СТ	СС	ТТ	
		0,94±0,06 n=84	0,96±0,06 n=114	0,97±0,08 n=14	0,0480
Гаплогруппа Н		–		+	
	ЛПВП	1,28±0,35 n=125		1,39±0,34 n=80	0,0336
	ТГ	5,15±0,18 n=125		5,09±0,16 n=80	0,0224
	Фактор 1	0,16±1,05 n=65		0,23±0,89 n=46	0,0405

Примечание: p – достигнутый уровень значимости для теста Фишера; показатели: ЗСЛЖ и ТГ были логарифмированы. Фактор 1 – фактор липидного обмена.

Полиморфный локус Ala16Val (*SOD2*) был ассоциирован с показателями ИМТ, ОХС и ЛПНП в группе мужчин. У женщин ассоциаций не было выявлено. У носителей генотипа СС все три показателя были выше, что свидетельствует о неслучайном характере ассоциации. Повышение этих трех показателей согласуется с данными о том, что у лиц с повышенным ИМТ повышен уровень ОХС и ЛПНП [Karaouzene, 2011; Wonisch, 2012].

Для полиморфного варианта Pro198Leu (*GPX1*) показана ассоциация с толщиной ЗСЛЖ и МЖП у женщин, а у мужчин отмечено влияние данного локуса только на толщину ЗСЛЖ. Носители генотипа ТТ характеризовались более высокой толщиной ЗСЛЖ и МЖП. Повышение этих показателей может быть признаком гипертрофии левого желудочка [Рыбакова, 2008], которая часто встречается при ССЗ. По данным собственного исследования и данным

литературы показано, что генотип ТТ ассоциирован с развитием ИБС и ССЗ. Таким образом, выявленная ассоциация полиморфного варианта Pro198Leu гена *GPX1* с толщиной ЗСЛЖ и МЖП представляется логичной.

Таблица 4

Ассоциации полиморфизма исследуемых локусов с количественными признаками у женщин популяционной выборки

Полиморфизм	Признак	Генотипы			p
		СТ	СС	ТТ	
<i>СУВА</i> (C242T)	ЛПВП	1,42±0,33 n=57	1,40±0,35 n=98	1,70±0,42 n=14	0,0091
<i>GPX1</i> (Pro198Leu)		СТ	СС	ТТ	
	ЗСЛЖ	0,92±0,05 n=88	0,90±0,05 n=87	0,94±0,06 n=14	0,0210
	МЖП	0,92±0,05 n=88	0,90±0,05 n=87	0,94±0,06 n=14	0,0151
<i>PON1</i> (Gln192Arg)		AG	AA	GG	
	САД	2,10±0,07 n=75	2,12±0,06 n=102	2,16±0,07 n=12	0,0264
	ДАД	1,91±0,06 n=75	1,92±0,06 n=102	1,97±0,07 n=12	0,0069

Примечание: p – достигнутый уровень значимости для теста Фишера; показатели: ЗСЛЖ, МЖП, САД и ДАД были логарифмированы.

Полиморфный вариант Gln192Arg ассоциирован с показателями артериального давления (САД и ДАД) у женщин. У мужчин подобной ассоциации не было выявлено. Более высокие показатели артериального давления выявлены у носителей генотипа GG (Arg/Arg). Ранее было установлено, что более высокий уровень АД был ассоциирован с генотипом Arg/Arg полиморфного маркера Gln192Arg гена *PON1* у больных артериальной гипертензией с отягощенным семейным анамнезом [Минушкина, 2008].

Отмечено влияние локуса C242T гена *СУВА* на концентрацию ЛПВП у женщин. В группе мужчин подобной закономерности не было выявлено. Более высокие показатели наблюдались у носителей редкого генотипа ТТ. Известно, что высокий уровень ЛПВП оказывает протективный эффект в отношении развития атеросклероза и ИБС [Badimon, 2012; Mackness, 2012]. Соответственно генотип ТТ можно рассматривать как протективный по отношению к ИБС. Анализ вклада полиморфного варианта C242T гена *СУВА* в продолжительность жизни также показал статистически значимую ассоциацию только в группе женщин: аллель Т ассоциирован с долгожительством у женщин. Отсутствие ассоциации у мужчин может быть связано с особенностями гормонального фона у мужчин и женщин: женские половые гормоны (эстрогены) способны повышать уровень ЛПВП, в то время как мужские половые гормоны обладают обратным эффектом.

Гаплогруппа Н была ассоциирована с показателями липидного обмена: ЛПВП, ТГ и фактором 1 – «фактором липидного обмена» в группе мужчин. «Фактор липидного обмена» включал в себя три показателя: ТГ, ЛПОНП и ЛПВП. У носителей гаплогруппы Н уровень ЛПВП был выше, а уровень ТГ – ниже. Данную ассоциацию можно объяснить влиянием гаплогруппы Н на синтез АТФ митохондрией. Возможно, полиморфные варианты, характерные для гаплогруппы Н, приводят к увеличению потребления ТГ для синтеза АТФ, что приводит к снижению уровня ТГ в крови. Разнонаправленность эффектов ЛПВП и ТГ может быть причиной ассоциации носительства гаплогруппы с высокими значениями ЛПВП.

Различия в признаках, ассоциированных у мужчин и женщин с одним и тем же локусом могут являться свидетельством либо плейотропного действия самого локуса, либо физиологическими особенностями формирования признака у разных полов.

Анализ ассоциаций в группе больных ИБС

Результаты однофакторного дисперсионного анализа в группе больных ИБС мужчин показали значимый вклад локусов Pro198Leu гена *GPX1* и C242T гена *CYBA* в изменчивость ИМТ. Носители редких генотипов СС полиморфизма Pro198Leu гена *GPX1* и ТТ локуса C242T гена *CYBA* характеризовались более низкими показателями ИМТ (табл. 5).

Таблица 5

Ассоциации полиморфизма исследуемых локусов с количественными признаками в группе больных ИБС мужчин

Полиморфизм	Признак	Генотипы			p
		СТ	СС	ТТ	
<i>GPX1</i> (Pro198Leu)	ИМТ	28,95±4,37 n=61	26,77±3,57 n=56	27,47±5,01 n=18	0,0186
<i>CYBA</i> (C242T)	ИМТ	27,90±4,71 n=56	25,10±4,36 n=16	28,50±3,51 n=63	0,0157
	ФВ	44,98±13,88 n=57	48,50±17,30 n=20	51,71±12,18 n=69	0,0245

Примечание: p – достигнутый уровень значимости для теста Фишера

Маркер C242T гена *CYBA* показал ассоциацию с фракцией выброса левого желудочка. Самые низкие показатели ФВ наблюдались у гетерозигот по этому локусу, а высокие – у гомозигот по редкому аллелю Т. Фракция выброса – отношение ударного объема к конечно-диастолическому объему. ФВ – важнейший интегральный показатель систолической функции сердца, указывающий, какая часть конечно-диастолического объема крови (КДО) выбрасывается из желудочков во время их систолы. ФВ является главным показателем недостаточности сократительной функции ЛЖ. При ИБС часто наблюдается нарушение сократительной функции миокарда, что проявляется в виде снижения ФВ при ЭхоКГ [Рыбакова, 2008].

Анализ вклада сочетаний полиморфных вариантов ядерных генов в определении изученных фенотипов

Для изучения вклада сочетаний исследованных полиморфных вариантов ядерных генов использовали моделирование «баллов предрасположенности» изучаемым фенотипам. Основываясь на данных литературы и результатах собственного исследования, для каждого индивида был рассчитан «общий балл предрасположенности» ИБС и долгожительству, который представлял собой сумму «баллов» по каждому полиморфному локусу. Гомозиготам с рисковыми аллелями присваивали «балл», равный 1; гетерозиготам – 0,5; гомозиготам без аллелей предрасположенности – 0 (табл. 6). В дальнейшем «общий балл предрасположенности» анализировали как количественный признак с использованием статистического критерия Манна-Уитни.

Таблица 6

Полиморфный локус	«Балл предрасположенности» ИБС			«Балл предрасположенности» долгожительству		
	0,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0
<i>SOD2</i> (Ala16Val)	CC	CT	TT	TT	CT	CC
<i>GPX1</i> (Pro198Leu)	CC	CT	TT	TT	CT	CC
<i>CAT</i> (C-262T)	CC	CT	TT	TT	CT	CC
<i>PON1</i> (Leu55Met)	AA	AT	TT	TT	AT	AA
<i>PON1</i> (Gln192Arg)	AA	AG	GG	AA	AG	GG
<i>CYBA</i> (C242T)	CC	CT	TT	CC	CT	TT
<i>TFAM</i> (Ser12Thr)	GG	CG	CC	CC	CG	GG
<i>POLG</i> (T/C)	CC	CT	TT	TT	CT	CC

Статистически значимые различия были показаны только для «балла предрасположенности» ИБС: в группе больных ИБС средний балл составил 3,14, что статистически значимо выше, чем в контрольной группе – 2,90 ($p=0,005$). По значениям «балла предрасположенности» долгожительству значимых различий между выборками не было выявлено (табл. 7).

Таблица 7

Средние значения «балла предрасположенности» ИБС и долгожительству

Выборка	«Балл предрасположенности» ИБС	«Балл предрасположенности» долгожительству
Контроль (n=412)	2,90±0,95	4,02±0,91
Долгожители (n=202)	2,97±0,96	4,19±0,81
Больные ИБС (n=171)	3,14±0,91	4,13±0,90
Умершие до 55 лет от ССЗ (n=94)	3,07±0,84	4,19±0,86

Результаты анализа вклада сочетаний полиморфных вариантов ядерных генов в формирование изученных фенотипов согласуются с данными проведенного исследования ассоциаций полиморфных локусов этих генов с изученными фенотипами: с долгожительством выявлена только одна ассоциация для локуса C242T гена *CYBA*, в то время как для ИБС выявлены ассоциации с тремя локусами: Ala16Val гена *SOD2*, Ser12Thr гена *TFAM* и Pro198Leu гена *GPX1*.

Полученные данные позволяют предположить, что вклад сочетаний исследованных полиморфных вариантов в формирование ИБС является статистически значимым. Анализ влияния сочетаний этих локусов на продолжительность жизни не показал статистической значимости.

Заключение

В рамках настоящего исследования был осуществлен анализ вклада полиморфных вариантов генов, задействованных в регуляции окислительного стресса, в формирование трех фенотипов: ишемическая болезнь сердца, долгожительство (>90 лет) и ранняя смерть (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний. Были изучены полиморфные варианты генов компонентов прооксидантной (*СУВА*) и антиоксидантной системы (*SOD2*, *GPX1*, *CAT*, *PON1*), полиморфизм мтДНК, а также локусы ядерных генов, оказывающих влияние на функционирование мтДНК (*TFAM* и *POLG*).

В результате исследования были показаны ассоциации исследованных полиморфных локусов и гаплогрупп мтДНК с изученными фенотипами и с изменчивостью патогенетически значимых количественных признаков. Часть выявленных ассоциаций являются подтверждением ранее установленных другими исследователями, однако для некоторых локусов ассоциации с фенотипами были установлены впервые.

Так, нами впервые выявлена ассоциация аллеля Т полиморфного локуса С242Т гена *СУВА* с высокой продолжительностью жизни у женщин. Для мужчин подобной ассоциации не было выявлено.

В отношении развития ишемической болезни сердца ассоциации были получены для трех локусов ядерного генома: Ala16Val гена *SOD2*, Ser12Thr гена *TFAM*, Pro198Leu гена *GPX1*. Полученные нами данные о роли полиморфного варианта Ala16Val гена *SOD2* в развитии ИБС подтверждают данные других исследователей: аллель Т (Val) ассоциирован с ИБС. Впервые показано, что генотип СС (Thr/Thr) полиморфного маркера Ser12Thr гена *TFAM* ассоциирован с риском развития ИБС у мужчин. Результаты проведенного исследования указывают также на вклад полиморфного варианта Pro198Leu гена *GPX1* в развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Выявлена ассоциация аллеля Т (Leu) с ИБС у мужчин и генотипа ТТ (Leu/Leu) с ранним инфарктом миокарда у больных ИБС, что согласуется с данными других исследователей. Кроме того, частота генотипа ТТ (Leu/Leu) локуса Pro198Leu гена *GPX1* статистически значимо выше у больных ИБС, чем у долгожителей. Также отмечена ассоциация аллеля Т (Leu) и генотипа ТТ (Leu/Leu) полиморфного варианта Pro198Leu гена *GPX1* с ранней смертностью (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний в группе мужчин.

В результате исследования ассоциаций гаплогрупп мтДНК с изученными фенотипами показано, что гаплогруппа Н и ее подгаплогруппа Н1 являются факторами, предрасполагающими развитию ИБС и ранней смертности от ССЗ.

Установлено, что полиморфизм ряда изученных локусов вносит вклад в изменчивость патогенетически значимых количественных показателей. В контрольной группе у мужчин отмечена ассоциация Ala16Val (*SOD2*) с

индексом массы тела. В изменчивость показателей липидного обмена вносят вклад Ala16Val (*SOD2*) и гаплогруппа Н у мужчин и С242Т (*CYBA*) у женщин. Лocus Pro198Leu (*GPX1*) ассоциирован с толщиной задней стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки. Отмечено влияние Gln192Arg (*PON1*) на показатели артериального давления у женщин. В группе больных ИБС ассоциации выявлены с индексом массы тела и фракцией выброса. Индекс массы тела был ассоциирован с двумя локусами: Pro198Leu (*GPX1*) и С242Т (*CYBA*), а фракция выброса только с маркером Pro198Leu гена *GPX1*.

В целом, полученные данные свидетельствуют, что наличие определенных генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции окислительного стресса, и носительство некоторых гаплогрупп митохондриальной ДНК может оказывать влияние на предрасположенность к развитию ишемической болезни сердца и ранней смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, а также на формирование фенотипа долгожительства. Результаты исследования позволяют приблизиться к пониманию роли генетических факторов окислительного стресса в развитии ишемической болезни сердца и определении продолжительности жизни, а также открывают перспективы для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что аллель Т полиморфного варианта С242Т гена *CYBA* ассоциирован с долгожительством у женщин (OR=1,47). Анализ полиморфизма мтДНК и вариантов генов, регулирующих ее работу, не выявил ассоциации с долгожительством.
2. Для двух локусов генов системы антиоксидантной защиты – Ala16Val (*SOD2*) и Pro198Leu (*GPX1*) установлена ассоциация с ишемической болезнью сердца. Показана связь для аллеля Т (Val) локуса Ala16Val гена *SOD2* (OR=1,33) в общей выборке и аллеля Т (Leu) локуса Pro198Leu гена *GPX1* у мужчин (OR=1,46). Отмечена ассоциация генотипа ТТ (Leu/Leu) локуса Pro198Leu гена *GPX1* с ранним инфарктом миокарда (до 50 лет) у больных ишемической болезнью сердца (OR=3,07). Выявлено, что аллель Т (Leu) полиморфного локуса Pro198Leu гена *GPX1* предрасполагает к ранней смертности (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин (OR=1,69).
3. Установлен вклад гаплогрупп Н и Н1 мтДНК и гена *TFAM*, регулирующего экспрессию мтДНК, в развитие ишемической болезни сердца. Митохондриальная гаплогруппа Н (не включая ее подгаплогруппу Н1) является фактором, предрасполагающим к развитию ишемической болезни сердца (OR=1,51); гаплогруппа Н1 ассоциирована с ранней смертностью (до 55 лет) от сердечно-сосудистых заболеваний (OR=1,98); генотип СС (Thr/Thr) полиморфного локуса Ser12Thr гена *TFAM* ассоциирован с ишемической болезнью сердца у мужчин (OR=10,45).
4. Выявлена связь полиморфизма изученных генов с изменчивостью эндофенотипов сердечно-сосудистой системы. В популяционной выборке установлена ассоциация полиморфизма гена *GPX1* с эхокардиографическими

показателями (толщина задней стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки). У женщин показано влияние локуса *PON1* на показатели артериального давления и локуса *CYBA* на уровень липопротеинов высокой плотности. У мужчин в изменчивость показателей липидного обмена вносят вклад ген *SOD2* и гаплогруппа Н мтДНК, а также обнаружена ассоциация полиморфизма *SOD2* с индексом массы тела.

5. В группе больных ишемической болезнью сердца установлены ассоциации полиморфизма гена *CYBA* с индексом массы тела и полиморфизма гена *GPX1* с индексом массы тела и фракцией выброса левого желудочка.
6. Установлен значимый вклад сочетаний полиморфных вариантов генов *SOD2*, *GPX1*, *CAT*, *PON1*, *CYBA*, *TFAM* и *POLG* в предрасположенность к ишемической болезни сердца.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Zheykova T.V.**, Golubenko M.V., Bychkova O.Y., Makeeva O.A., Buikin S.V., Maximov V.N., Voevoda M.I., Puzyrev V.P. Association of a non-coding mtDNA polymorphism with longevity in Russian population // *European Journal of Human Genetics*. – 2009. – Vol. 17. – Suppl.2. – P.248-249.
2. **Жейкова Т.В.**, Боткина О.Ю., Калянов Е.В., Голубенко М.В. Исследование полиморфизма мтДНК и гена *TFAM* в связи с продолжительностью жизни // *Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков*. – 2010. – С.62.
3. Голубенко М.В., **Жейкова Т.В.**, Буйкин С.В., Makeeva O.A. Полиморфизм митохондриальной ДНК и фенотипы сердечно-сосудистой системы // *Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков*. – 2010. – С.46.
4. Чередниченко А.А., **Жейкова Т.В.**, Голубенко М.В. Полиморфизм митохондриальной ДНК при мультифакториальных заболеваниях человека // *Труды Томского государственного университета. Серия биологическая: Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии. Материалы Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томской государственном университете*. – 2010. – Т. 275. – С. 150-151.
5. **Zheykova T.V.**, Golubenko M.V., Makeeva O.A., Botkina O.Y., Polovkova O.G., Lezhnev A.A., Kalyanov E.V., Tsimbalyuk I.V., Shipulin V.M., Puzyrev V.P. Glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) single nucleotide polymorphism Pro198→Leu: association with life span and coronary artery disease in Russian population // *European Journal of Human Genetics*. – 2011. – Vol. 19. – Suppl.2. – P.311.
6. **Жейкова Т.В.**, Голубенко М.В., Буйкин С.В., Боткина О.Ю., Makeeva O.A., Lezhnev A.A., Калянов Е.В., Цимбалюк И.В., Максимов В.Н., Воевода М.И., Шипулин В.М., Пузырев В.П. Полиморфизм Pro198→Leu гена глутатионпероксидазы (*GPX1*): связь с продолжительностью жизни и ишемической болезнью сердца // *Молекулярная биология*. – 2012. – Т. 46. – № 3. – С. 481-486.

7. **Жейкова Т.В.**, Голубенко М.В., Буйкин С.В., Макеева О.А., Лежнев А.А., Цимбалюк И.В., Шипулин В.М., Пузырев В.П. Ассоциация полиморфизма Thr12Ser гена митохондриального фактора транскрипции А (*TFAM*) с ишемической болезнью сердца // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 6. – С. 47-50.
8. **Жейкова Т.В.**, Голубенко М.В., Буйкин С.В., Макеева О.А., Лежнев А.А., Цимбалюк И.В., Шипулин В.М., Пузырев В.П. Ассоциация полиморфизма Ala16Val гена супероксиддисмутазы 2 (*SOD2*) с ишемической болезнью сердца у мужчин в российской популяции // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27. – № 4. С. 34-37.
9. **Жейкова Т.В.**, Голубенко М.В., Буйкин С.В., Боткина О.Ю., Цимбалюк И.В., Максимов В.Н., Воевода М. И., Пузырев В.П. Анализ ассоциаций полиморфного локуса 242С>Т гена субъединицы р22^{phox} НАДФН-оксидазы (*СУВА*) с долгожительством в российской популяции // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 3. – С. 410-414.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АТФ – аденозинтрифосфат
 АФК – активные формы кислорода
 ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
 ГВС1 – гипервариабельный сегмент I митохондриальной ДНК
 ДАД – диастолическое артериальное давление
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 ИМ – инфаркт миокарда
 ИМТ – индекс массы тела
 ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка
 КДР – конечный диастолический размер
 КСР – конечный систолический размер
 ЛЖ – левый желудочек
 ЛПВП – липопротеины высокой плотности
 ЛПНП – липопротеины низкой плотности
 ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
 МЖП – межжелудочковая перегородка
 мтДНК – митохондриальная ДНК
 НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза
 ОХС – общий холестерин
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 САД – систолическое артериальное давление
 ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
 ТГ – триглицериды
 ФВ – фракция выброса
 ЭхоКГ – эхокардиография

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:
ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН
634050 г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10
ученому секретарю Диссертационного совета ДМ 001.045.01
канд. биол. наук Хитринской И.Ю. Факс +7(3822)513-744
E-mail: i.khitrinskaya@medgenetics.ru или zheykova@mail.ru

Подписано к печати 05.03.2013. Тираж 100 экз.
Кол-во стр.24. Заказ № ???
Томский государственный университет
систем управления и радиоэлектроники
634050, г.Томск, ул. Ленина, 40
Тел. 8(3822)53-30-18