

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ»



На правах рукописи

Салахов Рамиль Ринатович

**ПАТОГЕНЕТИКА БОЛЕЗНЕЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО
КОНТИНУУМА: РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА И ГЕНА
ТРАНСЛОКАЗЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ *ТОММ40***

03.02.07 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор
Пузырёв Валерий Павлович

Томск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Концепция болезней сердечно-сосудистого континуума.....	11
1.2 Острый коронарный синдром	14
1.3 Вклад митохондрий в развитие сердечно-сосудистых заболеваний	18
1.4 Строение ТОМ-комплекса и значение гена <i>ТОММ40</i> в развитии многофакторных заболеваний	26
1.5 Ген аполипопротеида Е в развитии многофакторных заболеваний	33
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1 Характеристика выборки больных с ОКС и контрольной группы	36
2.2 Выделение ДНК фенол-хлороформным методом	39
2.3 Генотипирование с помощью TaqMan-проб	40
2.4 Анализ принадлежности к гаплогруппам мтДНК с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и электрофореза в агарозном геле	42
2.5 Методика анализа нуклеотидной последовательности мтДНК с помощью секвенирующей реакции по Сенгеру	44
2.6 Анализ длин амплифицированных фрагментов ДНК (AFLP-анализ) полиморфного варианта rs10524523	45
2.7 Методы статистической обработки данных.....	48
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
3.1 Анализ полиморфизма мтДНК	49
3.1.1 Характеристика распространенности гаплогрупп и полиморфных вариантов мтДНК в выборке больных с острым коронарным синдромом и контрольной выборке.....	50
3.1.2 Анализ вклада гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК в характер течения и тяжести проявления атеросклеротического поражения при ОКС	53

3.1.3 Анализ ассоциаций гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК с количественными признаками.....	65
3.2 Анализ изучаемых полиморфных вариантов в локусе <i>ТОММ40/APOE</i> .	72
3.2.1 Характеристика частот полиморфных вариантов генов <i>ТОММ40</i> и <i>APOE</i> в контрольной выборке и у больных с ОКС	72
3.2.2 Характеристика полинуклеотидного повтора (rs10524523) гена <i>ТОММ40</i>	77
3.2.3 Характеристика неравновесия по сцеплению в локусе <i>ТОММ40/APOE</i>	80
3.2.4 Анализ ассоциаций полиморфных вариантов в локусе <i>ТОММ40/APOE</i> с клинически важными эндотипами	83
3.2.5 Анализ ассоциаций полиморфных вариантов с тяжестью заболевания и данными медицинского анамнеза	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111

ВВЕДЕНИЕ

В современных популяциях из всех известных заболеваний лишь 30 болезней многофакторной природы определяют основную причину заболеваемости и смертности в мире, и среди них первое место занимают заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС) [Czeizel, 1978; Пузырев, 2008]. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является наиболее частым проявлением атеросклеротического процесса. Эпидемиологические и семейные исследования установили, что ИБС примерно на 40-60% обусловлена генетической компонентой [Roberts, 2014]. Однако если анализировать 50 генетических вариантов, достоверно ассоциированных с данным заболеванием, то они могут объяснить лишь не более 15-20 % наследуемости [Deloukas et al., 2013]. Разница между теоретически ожидаемой и фактической оценкой вклада генетической компонентой обозначена как недостающая (потерянная) наследуемость [Eichler et al., 2010]. Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) выявили большое количество новых локусов, ассоциированных с ИБС или факторами риска заболевания, однако доля «недостающей наследуемости» все еще значительна [Schnabel et al., 2012; Trerotola et al., 2015]. В частности, были выявлены хромосомные локусы и идентифицированы гены-кандидаты, ассоциированные с показателями липидного обмена [Aulchenko et al., 2009; Kathiresan et al., 2009; Sabatti et al., 2009; Middelberg et al., 2011], давления крови, атеросклероза коронарных артерий, инфаркта, инсульта [Adeyemo et al., 2009], сахарного диабета 2 типа (СД2) [Wang et al., 2005; Beekman et al., 2010; Kong et al., 2015]. Одним из регионов, представляющих интерес в отношении многих сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), является кластер генов *ТОММ40*, *АРОЕ*, *АРОС1*, *АРОС2* и *АРОС4*, локализованный на длинном плече 19 хромосомы [Talmud et al., 2009; Middelberg et al., 2011].

Тесное сцепление нескольких генов, связанных с функционированием сердечно-сосудистой и нервной системы, долгое время не позволяло точно идентифицировать, какой ген и какие его варианты имеют самостоятельное

значение. Одним из наиболее изученных генов является *APOE*, кодирующий сывороточный аполипопротеид Е (*APOE*), входящий в состав хиломикронов и липопротеидов очень низкой плотности. Роль аполипопротеида Е в метаболизме и транспорте липидов хорошо изучена. Около 14 процентов различий в уровне холестерина в плазме крови может быть связано с вариабельностью гена *APOE* [Apoor et al., 2010]. Ген *TOMM40* располагается в непосредственной близости от гена *APOE* и других генов, задействованных в метаболизме и транспорте липидов [Roses et al., 2010]. Установлено, что ген *TOMM40* ассоциирован с сывороточными уровнями общего холестерина (ОХ), холестерина в составе липопротеидов низкой и высокой плотности (ХС ЛПНП и ХС ЛПВП, соответственно), а также триглицеридов (ТГ) [Aulchenko et al., 2009; Talmud et al., 2009; Middelberg et al., 2011].

В основе атеросклеротического поражения сосудистой стенки лежит нарушение функционирования митохондрий, приводящее к окислительному модифицированию липидов в результате окислительного стресса, что нашло отражение в инфильтрационной теории атерогенеза. Нарушение процессов антиоксидантной защиты митохондрий с возрастом легло в основу свободнорадикальной теории старения. Считается, что повреждение митохондриальной ДНК активными формами кислорода (АФК) является основной причиной окислительного стресса. Многие полиморфизмы в митохондриальной ДНК (мтДНК) - это миссенс-замены или замены в участках кодирующих рибосомальные и транспортные РНК. Ряд исследований указывают на то, что митохондриальный геном имеет важное функциональное значение и вносит вклад в предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям [Benn et al., 2008; Yu, Bennet, 2014]. Одними из первых в России изучением поиска ассоциаций гаплотипов мтДНК с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний были работы сотрудников НИИ медицинской генетики [Фрейдин и др., 1999; Пузырев и др., 2006; Жейкова, 2013].

В связи с выше сказанным, представляется актуальным изучение, полиморфных вариантов локуса генов *TOMM40/APOE*, а также полиморфизма

мтДНК, задействованных в метаболических путях митохондрий и всей клетки в целом, в отношении острого коронарного синдрома (ОКС) и его эндофенотипов.

Степень научной разработанности темы исследования

В ходе работы над темой исследования проведен анализ работ зарубежных и российских ученых, направленных на изучение вклада митохондриального и ядерного генома в отношении совместного влияния на эндофенотипы болезней сердечно-сосудистого континуума (ССК), он показал их актуальность и активные исследования в этом направлении.

Работы, выполненные ранее при исследовании вклада митохондриального генома в развитие сердечно-сосудистых состояний в основном направлены на изучение факторов риска ИБС и метаболического синдрома [Mueller et al., 2011; Roberts, 2014; Dominic et al., 2014; Sobenin et al., 2015]. Однако исследований, направленных на изучение вклада полиморфизма мтДНК на течение инфаркта миокарда (ИМ) и риск развития осложнений острого коронарного синдрома практически не встречается.

Основная доля публикаций, посвященных гену *ТОММ40*, направлена на изучение патогенеза болезни Альцгеймера [Roses et al., 2010; Liu X et al., 2012]. Данные о вкладе полиморфных вариантов гена *ТОММ40* в развитие сердечно-сосудистой патологии немногочисленны, интерес к этому гену значительно возрос благодаря полногеномным исследованиям [Aulchenko et al., 2009; Talmud et al., 2009; Middelberg et al., 2011]. Позднее были проведены мета-анализ [Abe et al., 2015] и скрининговые исследования в отношении факторов риска ишемии сердца и головного мозга [Kong et al., 2015; Yamase et al., 2015; Radmanesh et al., 2015].

Цель исследования

Изучить роль гена *ТОММ40* и полиморфизма мтДНК в развитии болезней сердечно-сосудистого континуума и клинически важных эндофенотипов сердечно-сосудистой системы.

Задачи исследования

1. Получить оценку частот и характеристику полиморфизма вариантов rs741780, rs2075650, rs1160985, rs157580 rs760136, rs8106922 и rs10524523 в локусе генов *ТОММ40/АРОЕ*, гаплогрупп и гипервариабельных участков мтДНК у больных с острым коронарным синдромом и лиц без сердечно-сосудистых заболеваний.
2. Оценить вклад полиморфизма мтДНК в развитие сердечно-сосудистых заболеваний и его связь с вариабельностью количественных показателей сердечно-сосудистой системы у больных с острым коронарным синдромом и индивидов без сердечно-сосудистых заболеваний.
3. Провести анализ изменчивости эндофенотипов сердечно-сосудистой системы в контрольной выборке лиц без сердечно-сосудистых заболеваний и у больных с острым коронарным синдромом в зависимости от носительства различных генотипов по полиморфным вариантам локуса генов *ТОММ40/АРОЕ*.
4. Описать структуру неравновесия по сцеплению полиморфных вариантов локуса генов *ТОММ40/АРОЕ* и оценить вклад отдельных гаплотипов в риск развития острого коронарного синдрома.

Научная новизна

Впервые изучена роль полиморфных вариантов гена *ТОММ40*, в отношении сердечно-сосудистых заболеваний в группах больных и в контрольной выборке; проведена оценка влияния полиморфизмов на развитие клинически значимых эндофенотипов. Получены новые данные, указывающие на вклад митохондриального генома в формирование фенотипов сердечно-сосудистой системы и связь с факторами риска ССЗ и развитием осложнений после инфаркта миокарда.

Проведена оценка неравновесия по сцеплению изученных полиморфных вариантов и получены данные о структуре гаплотипов в хромосомном локусе *ТОММ40/АРОЕ*, ассоциированных с риском развития ИБС.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Полученные данные будут иметь теоретическую значимость, поскольку впервые изучена ассоциация гена *ТОММ40* с важными эндотипами сердечно-сосудистых заболеваний. Выявленные в работе ассоциации генетического полиморфизма с ССЗ позволят расширить понимание процессов развития атеросклеротического процесса и ИБС. С практической точки зрения, появится возможность использования полученных данных для оценки риска сердечно-сосудистых осложнений при атеросклерозе.

Полученные в ходе исследования результаты будут представлять интерес для специалистов-генетиков и кардиологов. Предполагается, что полученные данные могут также представлять интерес для практического здравоохранения для разработки методов превентивной диагностики и профилактических мероприятий до развития клинической симптоматики. Результаты исследования могут быть использованы в педагогическом процессе для студентов биологического и медицинского профилей, а также в курсах последипломного повышения квалификации врачей.

Методологическая основа диссертационного исследования

В ходе выполнения работы использовались современные методы исследования: клинические, молекулярно-генетические и статистические.

Молекулярно-генетические методы включали проведение генотипирования с использованием по TagMan-проб, секвенирования по Сенгеру с использованием капиллярного электрофореза, фрагментного анализа и ПДРФ-анализа. В ходе выполнения диссертационной работы были использованы методы статистического анализа данных с использованием программного обеспечения компании «StatSoft» (США).

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Отдельные гаплогруппы мтДНК, а также гипервариабельные сайты в некодирующей области мтДНК ассоциированы с риском развития острого коронарного синдрома и с эндофенотипами сердечно-сосудистой системы.
2. Полиморфные варианты гена *ТОММ40* ассоциированы с вариабельностью клинических показателей сердечно-сосудистой системы: показателями липидного спектра, уровнями артериального давления, глюкозы как у здоровых индивидуумов, так и у больных с острым коронарным синдромом.
3. Полиморфные варианты в локусе *ТОММ40/APOE* являются факторами риска болезней сердечно-сосудистого континуума.
4. Полиморфные варианты в локусе генов *ТОММ40/APOE* находятся в неравновесии по сцеплению, образуя общий гаплотипический блок, отдельные гаплотипы которого ассоциированы с риском развития острого коронарного синдрома.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных данных обеспечивается большим объемом выборок (общее количество - 803 образца), современными молекулярно-генетическими и статистическими методами исследования.

Личное участие автора

В ходе выполнения диссертационной работы основные результаты были получены автором исследования. Анализ литературных данных, а также вся экспериментальная часть, и статистический анализ данных были выполнены лично автором.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты исследования по теме выполненной диссертационной работы были апробированы на Всероссийской конференции «Актуальные

проблемы сердечно-сосудистой патологии» (Кемерово 2010); на IV Съезде кардиологов Сибирского федерального округа «Сердечно-сосудистые заболевания: от первичной профилактики до высоких технологий в повседневной практике» (Кемерово 2011); на международной конференции «European Human Genetics Conference 2011» Амстердам, Нидерланды 2011); на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы лабораторной диагностики и биотехнологии» (Кемерово 2012); на III Международном конгрессе "Кардиология на перекрестке наук" (Тюмень 2012); на II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург 2012); на III Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород 2014); на VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Ростов-на-Дону 2014) на Международной конференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology — BGRS\SB-2014» (Новосибирск 2014); на VII Съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург 2015).

Публикации

По теме выполненной диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ, 1 статья в сборнике, а также 8 тезисов в материалах российских и зарубежных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 19 таблицами. Библиография включает 249 литературных источников, из них 19 источников отечественной и 230 источников зарубежной литературы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Концепция болезней сердечно-сосудистого континуума

Болезни человека многофакторной природы, сложно наследуемые и широко распространенные, составляют важную проблему медицины, на решение которой в прошедшее десятилетие были направлены самые разнообразные геномные подходы. Надежды в понимании природы многофакторных заболеваний (МФЗ) начинают связывать с появлением новых «омных» технологий. С момента первых полногеномных ассоциативных исследований прошло порядка десяти лет и с тех пор опубликовано огромное количество данных об ассоциации нескольких тысяч однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) или генетических локусов для более чем 90 МФЗ. GWAS хорошо зарекомендовали себя в идентификации новых генетических локусов для многих заболеваний, но особенно важно то, что большинство из ассоциированных генов были из числа тех, для которых ранее и не предполагалось наличие связей с МФЗ [Пузырев, 2011].

GWAS МФЗ, их метаанализ и сопоставление результатов исследований у человека с результатами экспериментальных работ показывают, что эффект подавляющего большинства SNP невелик, а общая их доля в структуре наследуемой компоненты предрасположенности к МФЗ не превышает 10-12% [Eichler et al., 2010]. Однако изучение кандидатных генов остается до сих пор важным при анализе МФЗ, поскольку продукты генов-кандидатов могут быть вовлечены в различные патофизиологические процессы в развитии заболеваний.

Сердечно-сосудистые заболевания уже на протяжении многих лет остаются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в развитых и развивающихся странах мира. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2008г. во всем мире от ССЗ умерло порядка 30 млн. человек. Из этого числа 7,3 миллиона человек умерло от ишемической болезни сердца, которая является наиболее распространенной формой ССЗ [Mendis et al., 2011]. ИБС клинически наиболее часто проявляет себя в виде ишемии,

стабильной стенокардии, нестабильной стенокардии, острого инфаркта миокарда, сердечной недостаточности и внезапной смерти [Ferreira-González, 2014]. При этом основными факторами риска развития заболевания являются артериальная гипертензия, дислипидемии, курение, сахарный диабет. Зачастую у больных наблюдается сочетание нескольких факторов риска, каждый из которых может самостоятельно вызвать фенотипическое проявление заболевания. Наряду с артериальной гипертензией, которая является фактором риска развития ишемической болезни сердца, у больных очень часто присутствуют нарушения липидного профиля (дислипидемии), сахарный диабет 2-го типа. Накопление информации о патогенезе сердечно-сосудистой системы привело в начале 90-х годов к предположению о том, что существует цепь событий между различными факторами риска и конечным выражением развития тяжелой хронической сердечной недостаточности, которая может привести к острому инфаркту миокарда, инсульту или внезапной смерти. Впервые данное предположение выдвинули в 1991г. V. Dzau и E. Braunwald, которые назвали эту цепь событий сердечно-сосудистым континуумом [Dzau, Braunwald, 1991]. А спустя пятнадцать лет в эту концепцию были добавлены нарушения мозгового кровообращения, болезни периферических сосудов и болезни почек [Dzau et al., 2006].

Из рисунка 1 видно, несмотря на развитие нескольких возможных сценариев течения заболеваний, в конечном счете, они приводят к ремоделированию миокарда и развитию хронической сердечной недостаточности. Таким образом, становится понятно, что, несмотря на различия в течении, многие сердечно-сосудистые заболевания патогенетически связаны между собой. Данное сочетание заболеваний нашло отражение в описании такого феномена как синдромные болезни [Пузырев, и др., 2006; Пузырев., 2008; Пузырев и др., 2009].



Рисунок 1 – Сердечно-сосудистый континуум [Dzau, Braunwald, 1991].

Одним из направлений объяснения причин развития сердечно-сосудистого континуума стал поиск генетических маркеров приверженности к развитию сердечно-сосудистой патологии. В цепи развития ССК наиболее частым проявлением ИБС и коронарного атеросклероза является острый коронарный синдром. Отличительной чертой пациентов с острым коронарным синдромом является то, что, несмотря на современное лечение [Aggarwal, Menon, 2013], до сих пор остаются очень распространенными случаи смертельного исхода, инфаркта миокарда и повторных госпитализаций. ОКС представляет собой опасное для жизни проявление атеросклероза, которое ускоряется острым тромбозом, вызванным оторванной или разрушенной атеросклеротической коронарной бляшкой, с или без сопутствующего сужения сосудов, вызывая внезапное и критическое сокращение в кровотоке. В сложном процессе разрушения бляшки, воспаление является ключевым патофизиологическим элементом. Однако, до сих пор остаются неясными патофизиологические

механизмы развития атеросклеротических процессов, приводящих к развитию заболеваний, что требует дальнейшего изучения [Achar et al., 2005].

1.2 Острый коронарный синдром

Острым коронарным синдромом называют нестабильное состояние, представляющее собой обострение ишемической болезни сердца и проявляющееся развитием инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии (НС) или внезапной смерти. В основе патофизиологии острого коронарного синдрома лежит эрозия и внезапный разрыв атеросклеротической бляшки в стенке коронарного сосуда, с последующим образованием тромба, мешающего нормальному кровотоку. В случае если коронарная обструкция кратковременна и не приводит к повреждению клеток миокарда (некроз) и выбросу в кровоток маркеров ИМ, то такое клиническое состояние описывается как нестабильная стенокардия. Нестабильная стенокардия может приводить к обратимым изменениям на электрокардиограмме (ЭКГ), но не к повышению тропонинов. Некроз клеток миокарда приводит к выбросу маркеров (тропонинов, креатинфосфакиназ) в кровоток. При кратковременной ишемии миокарда или ишемии затрагивающей малую территорию миокарда на ЭКГ не будет видно каких-либо аномалий или наличия тонких изменений. Такой синдром носит название острый коронарный синдром без подъема сегмента ST. НС и ОКС без подъема сегмента ST тесно связаны между собой по происхождению, клиническим проявлениям, но отличаются по степени тяжести [Kumar et al., 2009; Fuster, Kovacic, 2014].

Третий вариант ОКС с подъемом сегмента ST, как правило, приводит к развитию инфаркта миокарда. Зачастую пациент испытывает устойчивые боли в груди, иногда тошноту, рвоту, одышку, потоотделение и бред. Симптомы могут быть нетипичными, особенно у женщин, пожилых людей и людей с сахарным диабетом. Помимо выделения тропонинов, за счет более тяжелого поражения миокарда на ЭКГ наблюдается стойкий подъем сегмента ST [Achar et al., 2005].

Патогенез ОКС включает в себя сложное взаимодействие эндотелия, иммунных клеток (макрофагов) и тромбогенности крови. Кроме того, некритическое стенозирование коронарных артерий (до 50%) может быть связано с дальнейшим резким прогрессированием вплоть до полной окклюзии просвета сосуда [Naghavi et al., 2003; Kumar et al., 2009].

Тщательный анамнез и физикальное обследование являются необходимыми для прогнозирования ОКС и определения риска неблагоприятных исходов. Наиболее важными факторами риска развития ОКС являются: наличие симптомов стенокардии, история ИБС, пол (мужской), возраст, а также традиционные факторы риска (гипертония, дислипидемии, курение, СД2, семейная предрасположенность). Сами по себе факторы риска несут малый эффект в предсказание развития ОКС, однако их наличие важно для определения тяжести течения заболевания и неблагоприятных исходов ОКС [Kumar et al., 2009].

Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении острого коронарного синдрома, о процессах, вызывающих атеросклеротическое поражение сосудов, по сей день ведутся споры. На данный момент единой теории возникновения атеросклероза нет. Исторически существует более 50 теорий и моделей атеросклероза, которые создают общий взгляд на возникновение и развитие этого процесса. Каждая из них выделяет ведущий фактор патологического воздействия, которые, несомненно, имеют много общего, взаимосвязанного. Условно звенья патогенеза атеросклероза можно свести к таким основным составляющим, как иммунный ответ и воспаление, развитие эндотелиальной дисфункции и пролиферация гладкомышечных клеток, влияние генетических факторов [Скворцов, Тумаренко, 2009].

По мнению ряда исследователей, только две теории сегодня способны в какой-то мере объяснить инициирование атерогенеза. Это, прежде всего, инфильтрационная теория атеросклероза [Аничков, 1935], а также теория повреждающих реакций [Ross et al., 1977]. В обеих теориях ключевым моментом в развитии атеросклероза рассматривается окислительная модификация липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) с

последующим каскадом воспалительных процессов, приводящих к атеросклеротическому процессу [Сафронов и др., 2006; Скворцов, Тумаренко, 2009; Sugamura, Keany Jr., 2011; Gleissner et al., 2007; Badimón et al., 2009]. Образование окислительно модифицированных ЛПНП (омЛПНП) происходит в результате действия активных форм кислорода в эпителиальных клетках в ходе свободнорадикального окисления липидов [Gutierrez et al., 2006].

Процесс начинается с повреждения эндотелия сосудов, причём повреждение может иметь различные механизмы. Важнейший механизм – повреждение эндотелия за счёт изменённой структуры ЛПНП, например в результате активации свободнорадикального перекисного окисления липидов (ПОЛ) в составе ЛПНП; повреждение провоцируется свободными радикалами, образующимися в процессе метаболизма или поступающими извне [Северин, 2005; Зайчик, Чурилов, 2007]. В интиме в отличие от плазмы содержится мало антиоксидантов. При окислении липидов образуются гидроперекиси, лизофосфолипиды, оксистерины и альдегиды. В ходе ПОЛ в ЛПНП изменяется не только структура самих липидов, но и нарушается структура апопротеинов. Окисление апопротеинов ведет к разрыву пептидных связей и соединению боковых цепей аминокислот (обычно β -аминогруппы лизина) с продуктами расщепления жирных кислот (4-гидроксиноненалем и малоновым диальдегидом). Стойкая гипергликемия при сахарном диабете способствует неферментативному гликозилированию апопротеинов и собственных белков интимы, что тоже нарушает их функции и ускоряет атерогенез [Ross, 1999; Скворцов, Тумаренко, 2009]. Раньше предполагали, что в эндоцитозе участвуют хорошо известные рецепторы ЛПНП, но при дефекте этих рецепторов как у экспериментальных животных, так и у больных (например, при семейной гиперхолестеремии) все равно имеются многочисленные ксантомы и атеросклеротические бляшки, заполненные ксантомными клетками. Кроме того, экзогенный холестерол тормозит синтез этих рецепторов, и при гиперхолестеремии их мало. Теперь предполагается роль скэвенджер-рецепторов макрофагов (связывающих в основном модифицированные липопротеиды) и других рецепторов для окисленных ЛПНП и

мелких атерогенных ЛПОНП [Зайчик, Чурилов, 2007; Скворцов, Тумаренко, 2009]. Этот процесс не регулируется количеством поглощённого холестерина, как в случае его поступления в клетки через специфические рецепторы, поэтому макрофаги перегружаются холестерином и превращаются в «пенистые клетки», которые проникают в субэндотелиальное пространство [Williams, Tabas, 1995; Ross, 1999; Davis, 2005; Woollard, Geissmann, 2010]. Это приводит к образованию жировых полосок в стенке кровеносных сосудов. На этой стадии эндотелий сосудов может сохранять свою структуру. При увеличении количества «пенистых клеток» происходит повреждение эндотелия сосудов. В норме клетки эндотелия секретируют простагландин I_2 (простациклин I_2), который ингибирует агрегацию тромбоцитов. При повреждении клеток эндотелия тромбоциты активируются. Во-первых, они секретируют тромбоксан A_2 (ТХ A_2), который стимулирует агрегацию тромбоцитов, что может привести к образованию тромба в области атеросклеротической бляшки; во-вторых, тромбоциты начинают продуцировать пептид –тромбоцитарный фактор роста, стимулирующий пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК). ГМК мигрируют из медиального слоя во внутренний слой артериальной стенки и способствуют, таким образом, росту бляшки. Далее происходит прорастание бляшки фиброзной тканью (коллагеном, эластином); клетки под фиброзной оболочкой некротизируются, а холестерол откладывается в межклеточном пространстве. На этой стадии в центре бляшки образуются даже холестероловые кристаллы. На последних стадиях развития бляшка пропитывается солями кальция и становится очень плотной [Северин, 2005; Зайчик, Чурилов, 2007]. Однако точные механизмы запускающие процесс накопления и окисления ЛПНП остаются малоизученными.

Считается, что в основе окислительного модифицирования липидов лежит нарушение в работе митохондрий. Так нарушение функционирования системы утилизации реактивных форм кислорода и азота, за счет снижения активности ферментных систем может привести к повреждению как дыхательной цепи и митохондрий, так и нарушению функционирования всей клетки, запуская весь каскад атеросклеротического поражения, приводящий к развитию сердечно-

сосудистых заболеваний [Wenzel et al., 2008; El Assar et al., 2013; Oelze et al., 2014; Mikhed et al., 2015].

1.3 Вклад митохондрий в развитие сердечно-сосудистых заболеваний

Не последнюю роль в развитии атеросклеротического процесса играет и митохондриальная ДНК. Поскольку мтДНК кодирует белки дыхательной цепи, то ее повреждение может усугубить процесс образования АФК. Вклад повреждения мтДНК значим на ранних этапах атеросклероза [Ballinger, et al., 2002; Yu et al., 2013]. Поэтому одним из направлений исследований стал поиск мутаций и полиморфных сайтов митохондриальной ДНК, связанных с процессом свободнорадикального окисления при эндотелиальной дисфункции [Madamanchi, Runge, 2007]. Ряд работ связывают генетический полиморфизм с повышенным риском развития ОКС [Fatini et al., 2004; Méthot et al., 2005; Dedoussis et al., 2005], при этом количество работ посвященных изучению генетической связи с конкретными клиническими исходами ОКС остается сравнительно небольшим [Palmer et al., 2008; Ellis et al., 2011].

По структуре митохондрии состоят из четырех компартментов: наружной и внутренней мембран, межмембранного пространства и матрикса. Поскольку согласно теории эндосимбиогенеза митохондрии подавляющую часть своей генетической информации передали ядру эукариот, то для выполнения своих функций им требуется синтез и транспорт белков кодируемых ядерной ДНК [Adams, Palmer, 2003]. Митохондриальная ДНК наследуется исключительно по материнской линии и тем самым характеризуется отсутствием такого явления как рекомбинация. Число копий мтДНК в соматических клетках варьирует в пределах 10^3 - 10^4 копий на клетку. Митохондриальная ДНК человека включает 16569 пар оснований в составе двухцепочечной кольцевой молекулы, прикрепленной к внутренней мембране митохондрий, которая кодирует небольшую группу генов ответственных за систему синтеза белков и элементов дыхательной цепи (субъединицы комплексов I, III, и IV и АТФ-синтазы [комплекс V]), в том числе 13 основных генов окислительного фосфорилирования, а также рибосомальные и

транспортные РНК необходимые для синтеза белка. Несмотря на небольшие размеры мтДНК очень полиморфна. Существующие индивидуальные различия в нуклеотидной последовательности легли в основу классификации мтДНК на разделении их в гаплогруппы. Так, мтДНК относящаяся к какой-либо гаплогруппе, имеет определенный набор замен (одиночных нуклеотидных полиморфизмов) в нуклеотидной последовательности, характеризующих эту гаплогруппу, разбросанных по всему митохондриальному геному. Причем эти замены могут носить как функционально значимый характер, так и нейтральный [Torroni et al., 1997]. В ходе эволюции, число мутаций мтДНК постоянно увеличивается [Wallace, 2005]. Мутации, возникшие во время расселения и эволюции человеческих популяций относят к регион специфическим. В популяциях европейского происхождения было описано девять гаплогрупп с частотами не менее 1%: H, U, I, K, J, T, V, W и X [Torroni et al., 1997]. Для азиатских популяций характерны такие гаплогруппы как: A, B, C, D, F, G, а также некоторые подгруппы гаплогрупп M и N. Американские популяции в основном представлены четырьмя гаплогруппами - A, B, C, D. Африканское население представлено гаплогруппами L0, L1, L2 и L3, являющимися наиболее полиморфными по своей структуре по сравнению с остальными гаплогруппами (Рисунок 2) [Wallace, 2013].

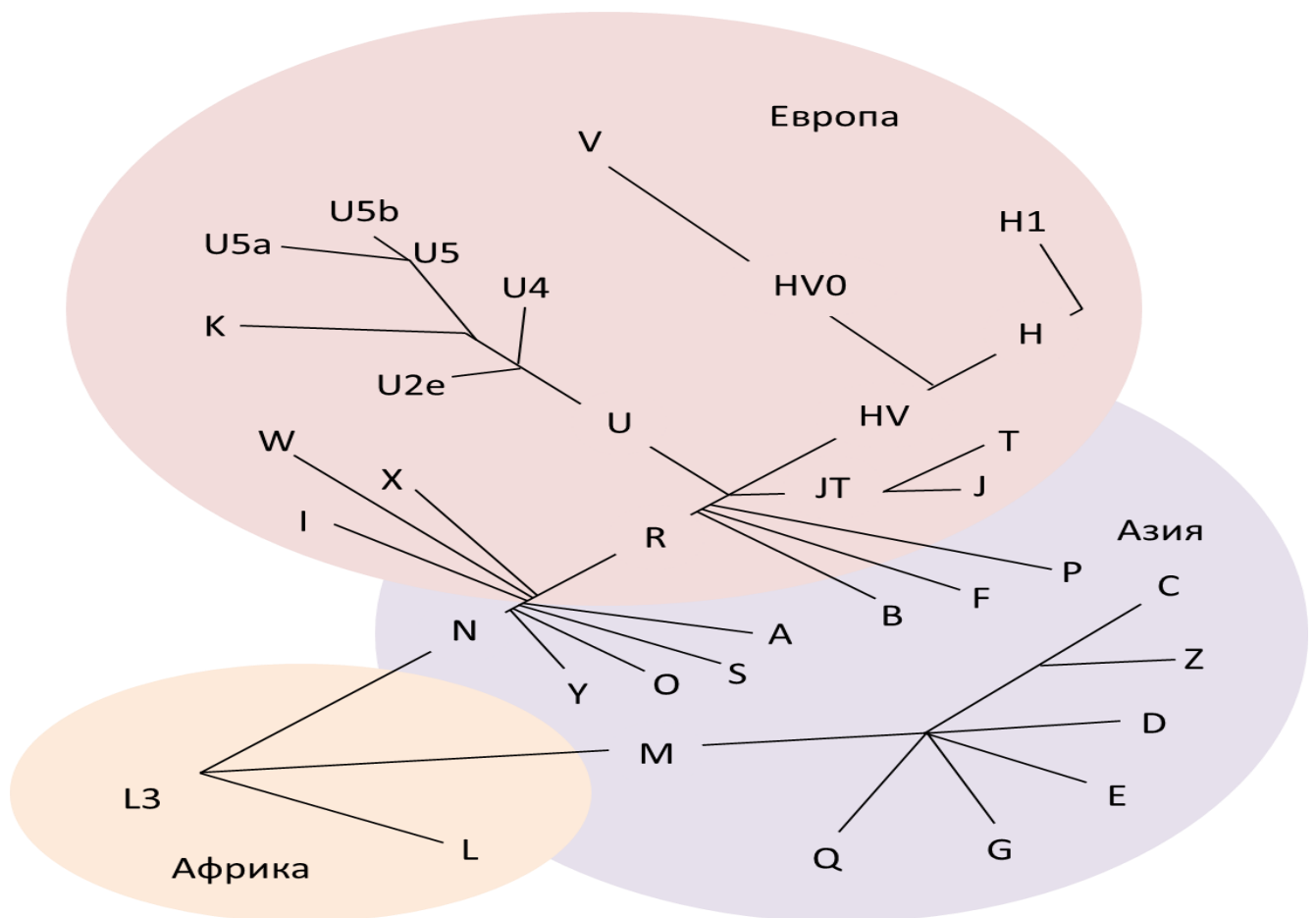


Рисунок 2 – Схема митохондриального древа.

Кроме того, в мтДНК есть некодирующий регион (displacement loop) или D-петля. В нем содержатся участки, ответственные за инициацию, транскрипцию и репликацию, а также за прикрепление к внутренней мембране митохондрий. Особо широко изучены два некодирующих гипервариабельных сегмента (HVR1 и HVR2) – регионы характеризующиеся высоким уровнем полиморфизма. По генетическим мутациям, накапливаемым в этих сегментах и повторяемым из поколения в поколения со строго определёнными местоположениями в цепочках, определяют гаплогруппы исследуемого субъекта [Li et al., 2012]. Поскольку D-петля мтДНК не содержит кодирующих последовательностей, мутации в ней не приводят к значительным изменениям функциональности клетки и организма в целом. По видимому именно это качество демонстрирует повышенность частоты мутаций этих сегментов по сравнению с другими частями митохондриального

генома. Эти два участка представляют большой интерес для исследований, поскольку — в связи с высокой частотой мутаций, можно обнаружить наибольшую степень различий и последовательностей у разных родственных групп людей [Chen et al., 2009; Pliss et al., 2011].

По сравнению с ядерным геномом митохондриальный геном лишен защиты гистоновыми белками, а непосредственно близкое расположение от систем дыхательной цепи делает его особенно восприимчивым к воздействию АФК [Wallace, 2010; Sena, Chandel, 2012]. В ходе митохондриального дыхания комплексы I и III реагируют с кислородом, приводя к образованию супероксид аниона, который в свою очередь приводит к повреждению мтДНК. Данный аспект нашел отражение в свободнорадикальной теории старения [Harman, 1956] и митохондриальной теории старения [Harman, 1972]. Согласно этой теории, рост концентраций АФК должен происходить экспоненциально, приводя к накоплению повреждений мтДНК и нарушению их функционирования и снижению эффективности дыхания, образуя порочный круг [Kelly, 2011]. Однако в последнее время появились работы, указывающие на то, что рост концентрации АФК происходит в течение жизни не экспоненциально, а линейно [Trifunovic et al., 2004; Kujoth et al., 2005].

Роль митохондрий давно вышла за пределы основного поставщика АТФ — главного энергетического субстрата клетки. Митохондрии осуществляют регуляцию различных клеточных процессов, включая пролиферацию [Mitra et al., 2009], иммунный ответ [Zhou et al., 2011], апоптоз [Kroemer et al., 2007; Yu, Bennett 2014] и являются посредниками при передаче сигналов от вторичных мессенджеров к ядру [Al-Mehdi et al., 2012].

В частности, было показано, что митохондриальная функция важна при переходе от G1 к S-фазе. Индуцирование митохондрий в этой стадии приводит к образованию большого количества циклина E, необходимого для входа в S-фазу. Деполяризация митохондрий приводила к остановке перехода к S-фазе по p53/p21-зависимому пути [Mitra et al., 2009]

Участие митохондрий в апоптозе играет очень важную роль в жизни клеток. Нарушение функциональной активности или повреждение митохондрий в результате увеличения проницаемости мембраны приводит к запуску проапоптотической активности. Этот механизм осуществляется высвобождением в цитозоль цитохрома С или других проапоптотических факторов. Цитохром С, выйдя в цитозоль связывается с фактором активации апоптоза (АРАФ-1) приводя к образованию «апоптосомы», которая при взаимодействии с каспазой-9 запускает каскад ферментативных реакций приводящих к апоптотической гибели клеток [Caroppi et al., 2009]

Мутации, возникающие в одной молекуле мтДНК, могут распространиться в клетках в результате репликации, поскольку нет никакого механизма, гарантирующего четкого соответствия исходной мтДНК, как в случае с ядерной ДНК во время каждого клеточного цикла. Такое разделение может привести к случайной сегрегации мутаций мтДНК с образованием либо гомоплазмии (наличию только нормальной или мутантной мтДНК) или гетероплазмии (наличие смеси нормальных и мутантных молекул мтДНК). Данный тип сегрегации характерен как для точечных мутаций, так и для больших делеций мтДНК. Тем не менее, есть некоторые свидетельства того, что на первый взгляд нейтральные полиморфизмы могут отобраны не случайным образом – их выбор может быть тканеспецифичным [Jenuith et al., 1997; Wallace, 2013].

Количество митохондрий широко варьирует в различных тканях: в эндотелии сосудов содержание митохондрий доходит до 6 % от объема клетки, в то время как в кардиомиоцитах их количество достигает трети от объема [Kluge et al., 2013]. Причем низкое содержание митохондрий в эндотелиальных клетках указывает на то, что окислительное фосфорилирование играет не ключевую роль в энергетических запросах клеток. Так до 75% АТФ в эндотелиальных клетках вырабатывается за счет гликолиза [Culic et al., 1997]. В исследовании на мышах было показано, что при отсутствии митохондриальных белков смерть животных наступала в те же сроки, что и при сердечно-сосудистых заболеваниях, или они

становились более чувствительны к факторам риска ССЗ [Miller et al., 2010; Kröller-Schön et al., 2013].

Дефекты в биогенезе митохондрий и их динамика сильно сказываются на биоэнергетике клеток, оказывая существенное влияние на функции клеток и участвуя в процессах старения и патогенезе заболеваний, в том числе и атеросклероза [Botto et al., 2005; Dromparis, Michelakis, 2013].

Учитывая центральную роль митохондрий в выработке энергии и продукции АФК, митохондриальная ДНК является очевидным кандидатом для исследования генетической предрасположенности к атеросклерозу. Внеядерный митохондриальный геном очень полиморфен и его вариации могут способствовать изменениям в энергетическом метаболизме и приводить к развитию различных заболеваний [DiMauro, Schon, 2003]. Известно, что число мутаций в митохондриальной ДНК накапливается с возрастом, что в принципе объясняется ошибками системы репликации и репарации мтДНК [Larsson, 2010; Afanas'ev, 2010]. Причем при глубоком секвенировании мтДНК мышей было высказано предположение, что ошибки системы репликации играют более важную роль [Ameur et al., 2011]. Так большое количество мутаций и делеций связаны с различными заболеваниями. Однако для фенотипического проявления требуется превышение порогового уровня накопления мутаций для проявления дефектов дыхательной цепи [Wallace, 1999].

Существуют данные, свидетельствующие о том, что различные гаплогруппы мтДНК связаны с тонкими различиями в процессах окислительного фосфорилирования и соответственно с различиями в силе генерации АФК. Было показано, что окислительный стресс в связи с нарушением баланса между производством АФК и антиоксидантной защитой играет важную роль в патогенезе коронарного атеросклероза и его осложнений [Madamanchi, Runge, 2007; Monsalve et al., 2007].

Например, в одной работе есть данные об ассоциации гаплогруппы Т с ишемической болезнью сердца и диабетической ретинопатией. Группа авторов выдвинула предположение, что принадлежность мтДНК к гаплогруппе Т может

быть связано с повышенным окислительным стрессом или повышенной восприимчивостью к окислительному стрессу. Лица, несущие гаплогруппу Т, могут быть более уязвимы к окислительному повреждению, чем носители других гаплогрупп [Kofler et al., 2009].

В другом исследовании была показана высокая частота гаплогруппы Н у больных с инфарктом миокарда, предполагая, что эта гаплогруппа может быть связана с более высоким уровнем выработки АФК и приводит к повреждению эндотелия у курильщиков [Palacín et al., 2011]. Аналогичные ассоциации гаплогруппы Н и инфарктом миокарда были обнаружены и в других исследовательских группах [Nishigaki et al., 2007; Kathiresan et al., 2009]. При этом в другом исследовании субгаплогруппа Н1, наоборот, проявила протективный эффект в отношении ишемического инсульта, что нельзя сказать о гаплогруппе U и preHV/HV [Rosa et al., 2008].

Кроме того, в японской популяции гаплогруппы А и М7 были связаны с коронарным атеросклерозом с отношением шансов 1,80 (1,09; 2,97), $p=0,023$ и 1,92 (1,23-3,01), $p=0,004$, соответственно [Sawabe et al., 2011].

Есть ряд работ указывающих на вклад полиморфизма мтДНК и гаплогрупп мтДНК в развитии дилатационной кардиомиопатии [Arbustini et al., 1998; Zaragoza et al., 2011; Strauss et al., 2013; Wallace, 2013]. Было установлено, что гаплогруппа Н достоверно чаще встречалась у больных с идиопатической дилатационной кардиомиопатией по сравнению со здоровыми людьми с частотой 50,7% и 40%, соответственно ($p=0,040$) [Fernández-Caggiano et al., 2013]. В другом исследовании на цибридных клеточных линиях было показано что, две крупные европейские гаплогруппы Н и U вносят существенную изменчивость в прогрессировании и тяжести течения заболевания. Причем пациенты с гаплогруппой U имеют более быстрое и тяжелое течение заболевания, чем Н [Strauss et al., 2013]. Однако в работе выполненной Benn M. с соавторами для северо-европейских популяций не было найдено ассоциаций гаплогрупп мтДНК с долгожительством и ишемической болезнью сердца по сравнению с другими более мелкими исследованиями [Benn M et al., 2008].

Помимо этого полиморфный вариант T16189C ассоциирован с ИБС как у европейцев [Mueller et al., 2011], так и в популяции Саудовской Аравии [Abu-Amero et al., 2010]. Причем в обоих исследованиях важным условием был возраст исследуемых. Кроме того, данный полиморфный вариант был ассоциирован с сахарным диабетом 2 типа, однако после введения поправки на возраст, полииндекс массы тела ассоциация пропала [Mueller et al., 2011].

В исследовании Poulton J. и соавторов была показана ассоциация полиморфизма T16189C со снижением толерантности к глюкозе среди носителей гаплогруппы T ($p=0,048$; $OR=1,6$ (1,0-2,7)) [Poulton et al., 2002].

В другом крупном исследовании выполненном на азиатском населении также была показана ассоциация T16189C с СД2. Причем группой исследователей было установлено, что данный полиморфизм за счет своего изменения нуклеотидной последовательности приводит к изменению связывания с белками, что в дальнейшем приводит к уменьшению скорости репликации мтДНК [Park et al., 2008].

Таким образом, судя по многочисленным исследованиям, становится очевидным, что полиморфизм митохондриальной ДНК оказывает влияние как на функционирование митохондрий и выработки АФК, так и на вклад в развитие сердечно-сосудистой патологии. Однако митохондриальный геном кодирует лишь малую часть белков необходимых для нормального функционирования митохондрий, а большая часть кодируется ядерным геномом. Известно, что ядерные митохондриальные белки синтезируются в цитозоле, но им для выполнения своих функций необходимо попасть в различные компартменты митохондрий с помощью различных транспортных систем.

1.4 Строение ТОМ-комплекса и значение гена *ТОММ40* в развитии многофакторных заболеваний

Механизм транспорта белков-предшественников в митохондри

На внешней и внутренней мембранах митохондрий имеются два комплекса транслоказ - транслоказа внешней мембраны (ТОМ-комплекс) и транслоказа внутренней мембраны митохондрий (ТИМ-комплекс), взаимодействие которых носит динамический характер и полностью комплексы собираются только в момент переноса белка из цитоплазмы в матрикс или другие компартменты. Сначала, синтезированные в цитозоле белки предшественники взаимодействуют с рецепторами ТОМ-комплекса, которые далее передают их к главной импортирующей поре (GIP) – каналу, образованному белком ТОМ40. После прохождения ТОМ-комплекса, белки-предшественники передаются в другие митохондриальные отделы: в межмембранное пространство, внутреннюю мембрану и матрикс с помощью ТИМ-комплекса (Рисунок 3) [Rehling et al., 2004].

Строение ТОМ-комплекса

Более 98% белков-предшественников проникают через внешнюю мембрану митохондрий с помощью ТОМ-комплекса, поэтому роль этого комплекса сложно переоценить [Roses et al., 2010]. Существуют доказательства того, что митохондрии имеют монофилетическое происхождение, и компоненты ТОМ-комплекса начали формироваться еще у общего предка всех эукариот до деления на несколько линий, давших начало растениям, животным и другим классам [Embley, Martin, 2006]. Хотя некоторые компоненты: *tom40*, *tom7*, *tom22* и сохранились в ходе эволюции эукариот, но есть несколько белков ТОМ-комплекса, которые проявляют уникальные свойства и могут отсутствовать у растений в отличие от животных и грибов, и наоборот [Dolezal et al., 2006].

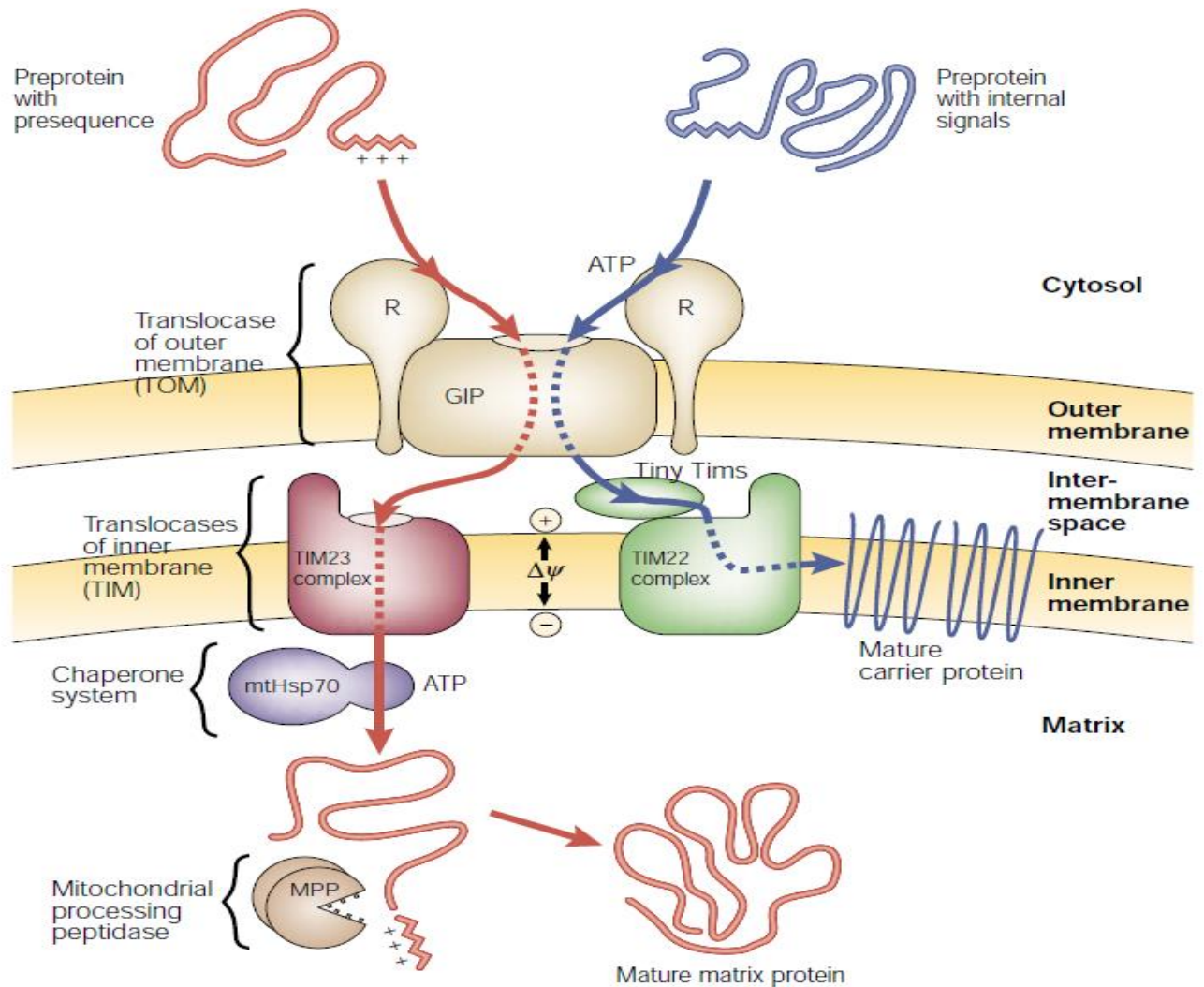


Рисунок 3 – Схема импорта белков-предшественников, кодируемых ядерным геномом, в матрикс митохондрий [Pfanner, Geissler, 2001].

Так у дрожжей были обнаружены следующие субъединицы: tom72, tom70, tom40, tom37, tom22, tom20, tom7, tom6 и tom5. Но у *N. Crassa* отсутствуют tom37 и tom5. В ходе изучения были определены две формы ТОМ-комплекса: holo-комплекс и core-комплекс. Core-комплекс или GIP имеет молекулярную массу 450-500 кДа и состоит из tom40, tom22 и трех маленьких белков: tom5, tom6 и tom7. Holo-комплекс дополнительно включает в себя рецепторы: tom20 и tom70, и имеет молекулярную массу 490-600 кДа [Neupert, Herrmann, 2007]. Рецепторы интегрированы в наружную мембрану с помощью одного N-концевого трансмембранного домена, а рецепторным доменом обращены в цитозоль. Tom20 является основным рецептором для белков-предшественников с пресиквенсом,

тогда как Tom70 признает предшественники с гидрофобными свойствами, не содержащими N-терминальный пептид. Ядерная магнитно-резонансная и кристаллическая структура рецепторного домена Tom20 в комплексе с пресиквенсами белков-предшественников показали, что Tom20 признает амфипатический α -спиральный пресиквенс [Saitoh et al., 2007]. С другой стороны, TPR (Tetratricopeptide Repeat) мотивы Tom70 содержат сайт для стыковки шаперонов Hsp90 и Hsp70, которые доставляют белки-предшественники членов семейства транспортеров растворимых веществ к ТОМ-комплексу [Young et al., 2003]. Оба рецептора - Tom20 и Tom70 передают белки-предшественники с помощью Tom5 и tom22 к каналу Tom40 [Mayer et al., 1995; van Wilpe et al., 1999]. Центральным компонентом ТОМ-комплекса является белок Tom40, β -складчатый белок, который образует транслокационный канал. Tom22 служит дополнительным рецептором комплекса, а также играет роль в поддержании динамической структуры ТОМ-комплекса, наряду с tom7 [van Wilpe et al 1999; Meisinger et al., 2004]. Tom6 принимает участие в сборке и поддержании всего комплекса, а Tom7 в разборке [Neupert, Herrmann, 2007; Chacinska et al., 2009].

Учитывая, какую важную роль играет ТОМ40 в митохондриальном биосинтезе, несомненным является тот факт, что этот белок жизненно важен для эукариотических организмов. Подтверждение этому было продемонстрировано с помощью нокаут-генетических исследований на *S. Cerevisiae* [Baker et al., 1990], *N. Crassa* [Taylor et al., 2003], мышах [Gottschalk et al., 2014] и человеческих клеточных культурах [Kozjak-Pavlovic et al., 2007].

Несмотря на то, что изучение строения и функций ТОМ-комплекса ведется многие годы, о генах, кодирующих субъединицы комплекса, информации в литературе мало. Однако развитие «полногеномных технологий» позволило наметить роль генов в развитии различных патологий. Так одним из новых кандидатных генов как в отношении сердечно-сосудистой патологии, так и нейродегенеративной патологии стал ген *ТОММ40*, кодирующий центральную субъединицу ТОМ40 ТОМ-комплекса [Humphries et al., 2005]. Ген *ТОММ40* (translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)) располагается на

большом плече хромосомы 19. Ген включает в себя 10 экзонов и 9 интронов общей протяженностью 16210 п.о. В базе данных NCBI имеется информация о 297 SNP [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>].

ТОММ40 и нейродегенеративные заболевания

Порядка 58-79% развития болезни Альцгеймера (БА) обусловлено генетическими факторами [Gatz et al., 2006]. Тот объем знаний, который получен при изучении патогенеза БА за последние двадцать лет показывает, что наиболее сильным и изученным показателем риска БА является ген *APOE* [Corder et al., 1993]. Однако ряд полногеномных исследований показал наличие ассоциаций БА с регионом на хромосоме 19, включающим кластер генов *ТОММ40-APOE-APOC1-APOC2-APOC4*, находящихся в сильном неравновесии по сцеплению.

Roses A. D. с соавторами провели глубокое секвенирование этого региона, где расположены гены *APOE* и *ТОММ40*, в том числе и структурные полиморфизмы в дополнение к SNP, а затем применили филогенетический анализ для определения эволюционного родства полиморфизмов. Они описали полиморфный полиТ вариант в гене *ТОММ40* и продемонстрировали связь между длиной полиТ повтора гена *ТОММ40* с более ранним возрастом начала БА у *APOE* ε3 носителей [Roses et al., 2010; Grossman et al., 2010], и предложили классифицировать все возможные длины полиТ повторов на три группы: короткие (с протяженностью до 19 нуклеотидов), длинные (от 20 до 29) и очень длинные (от 30) [Linnertz et al., 2012].

Более того, исследования, посвященные анализу однонуклеотидных полиморфизмов обнаружили связь между геном *ТОММ40* и БА. Так в одном исследовании по типу «случай-контроль», сравнивая людей с или без БА, показали высокую значимую связь между SNP (rs2075650) гена *ТОММ40* и БА. При этом интересным является тот факт, что гаплотип включающий два полиморфных варианта гена *ТОММ40* – rs2075650, rs11556505 и один в гене *APOE* – rs429358 показали более сильную ассоциацию с БА, чем вариант rs2075650 гена *ТОММ40* в отдельности [Shen et al., 2010], тем самым поддерживая

выводы Roses A. D. и его коллег о синергетическом эффекте генов *ТОММ40* и *АРОЕ* [Roses et al., 2010]. Также существует ряд исследований, в которых показана ассоциация различных полиморфных вариантов гена *ТОММ40* с умеренными когнитивными нарушениями и изменением количества серого вещества в различных областях мозга [Johnson et al., 2011; Liu et al., 2012; Ma et al., 2013].

Поскольку ген *ТОММ40* находится в неравновесии по сцеплению с *АРОЕ*, то он может отвечать за часть недостающей наследуемости БА. Кроме того, ген *ТОММ40* может принимать участие в том патофизиологическом каскаде, который происходит в доклинической фазе заболевания [Mancuso et al., 2009]. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что недавние полногеномные ассоциативные исследования показали, что транспорт белков через митохондриальные мембраны участвует в патофизиологии БА, и ген *ТОММ40* вероятно вносит самостоятельный вклад в риск развития БА, воздействуя на трансмембранный транспорт [Hong et al., 2010].

Митохондриальная дисфункция является ранним дефектом в патогенезе БА [Atamna, Frey, 2007; Wang et al., 2009; Lutz et al., 2010], которая выражается в связи с несколькими патологическими процессами: гипометаболизмом мозга, синаптической патологией, накоплением белка-предшественника амилоида (APP) и притоком амилоида β ($A\beta$) в клетки [Devi et al., 2006; Swerdlow, 2011].

Для БА, в частности, была выдвинута гипотеза, что митохондрии оказывают нейротоксическое влияние, осуществляя приток $A\beta$ в клетки через импортирующую пору ТОМ40. Прохождение $A\beta$ через ТОМ40 увеличивает накопление активной формы кислорода внутри митохондрий. Это увеличение является вредным для митохондриальной жизнедеятельности и производства энергии АТФ, что, в конечном счете, приводит к запуску процессов апоптоза в клетке [Mancuso et al., 2009; Manczak et al., 2006]. Далее АФК ускоряют процесс накопления APP в митохондриальной импортирующей поре. Это накопление APP было обнаружено в мозге у больных с БА, главным образом в лобной коре, гиппокампе, и миндалинах и, похоже, что его количество меняется в зависимости

от тяжести заболевания. Интересно, что у *APOE* ε3/ε4 носителей подтверждается высокое количество APP в митохондриях, что наводит на мысль о синергетическом эффекте митохондриальной дисфункции в присутствии *APOE* [Devi et al., 2006]. Кроме того, было показано, что митохондрии имеют высокие внутриклеточные концентрации Aβ при БА [Manczak et al., 2006]. Также было отмечено, что накоплению Aβ в митохондриях предшествует внеклеточное осаждение Aβ [Mancuso et al., 2009].

Помимо этого, ген *ТОММ40* недавно был связан с биомаркерами спинномозговой жидкости, такими как - Aβ1-42, t-tau и p-tau [Kim et al., 2011]. Таким образом, гипотеза митохондриального каскада получает большую поддержку в литературе, тем самым демонстрируя роль митохондриальной дисфункции в начале патогенеза БА. Гипотеза постулирует, что митохондриальная дисфункция предшествует накоплению амилоида в мозге и что повреждение митохондрий является основным источником патологии при БА [Swerdlow, 2011; Ankarcrona et al., 2010].

ТОММ40 и сердечно-сосудистые заболевания

Помимо влияния на нейродегенеративные заболевания, ген *ТОММ40* показал наличие связи с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Первая информация о роли гена *ТОММ40* появилась в ходе полногеномного ассоциативного исследования, целью которого являлся анализ локусов влияющих на уровни липопротеидов и риск развития коронарной болезни сердца в 16 европейских популяционных когортах. В работе были показаны ассоциации полиморфных вариантов rs157580 и rs2075650 гена *ТОММ40* с такими показателями как сывороточные уровни общего холестерина, холестерина в составе липопротеидов низкой плотности и триглицеридов [Aulchenko et al., 2009]. В том же году вышла работа, в которой были получены похожие ассоциации. Так Talmud P. J. и соавторы получили данные, в которых содержалась информация об ассоциации кластера генов *ТОММ40-APOE-APOC1-APOC2-APOC4* с холестерином в составе липопротеидов высокой плотности

[Talmud et al., 2009]. Изучение ассоциаций полиморфных локусов большого спектра генов с 13-ю различными биохимическими показателями в группе из 20 тысяч человек, включающей близнецовые пары, показало, что полиморфный локус rs2075650 гена *ТОММ40* вносит вклад в вариабельность содержания ХС ЛНВП, ХС ЛПНП, С-реактивного белка и ТГ в сыворотке крови [Middelberg et al., 2011]. Интересно, что ассоциации этого локуса с уровнем липидов и С-реактивного белка имеют разнонаправленный характер: носительство аллеля G предрасполагает к развитию гиперлипидемии, но предохраняет от развития воспалительных процессов.

При сравнении двух когорт европейского происхождения была показана ассоциация между значениями триглицеридов в случаях хронического семейного стресса при уходе за больными с деменцией и полиморфным вариантом rs157580. Наибольшие значения триглицеридов наблюдались у носителей аллеля G по сравнению с контролем [Jiang et al., 2013].

Полученные данные по уровням липидов в европейских популяциях характеризуются тем, что они ассоциируются с повышенными уровнями этих показателей. Однако для азиатских популяций возможен и противоположный эффект. Так в китайской популяции показаны ассоциации аллеля А варианта rs157580 с повышенными уровнями ХС ЛПНП, ОХ и ТГ, но, в отличие от европейцев [Aulchenko et al., 2009], у китайского населения данный вариант характеризуется снижением уровней ХС ЛПНП и ОХ, и повышением уровня ТГ [Zhang et al., 2011]. В противоположность этим данным в другом исследовании, выполненном также на китайской популяции, показана ассоциация варианта rs157580 с повышенными уровнями ХС ЛПНП как и в европейской популяции. Однако с другими показателями сывороточных липидов ассоциаций не получено [Kong et al., 2015].

При исследовании генов ответственных за метаболизм липидов у населения Японии была получена ассоциация аллеля G полиморфного варианта rs157580 с хронической почечной недостаточностью, являющейся причиной развития ССЗ [Hishida et al., 2014]. В другом исследовании при поиске генетических факторов

дислипидемии у японского населения была получена ассоциация полиморфного варианта rs2075650 с повышенными уровнями ХС ЛПНП в крови [Abe et al., 2015].

При поиске генетических факторов риска поражения каротидных артерий, выполненном Ronald J. и соавторами, было выяснено, что полиморфный вариант rs2075650 гена *ТОММ40* является фактором риска поражения каротидных артерий. Причем он обладает большим эффектом, чем каждый из двух полиморфных вариантов (rs7412 и rs429358) определяющих ϵ 2- ϵ 4 аллели гена *АРОЕ* по отдельности. Однако при оценке совместного эффекта всех трех SNP на риск поражения каротидных артерий значимый эффект достигался только для rs7412. Rs2075650 скорее всего был в целом связан с дислипидемией, чем с конкретными сывороточными уровнями липидов, однако точных механизмов влияния не известен [Ronald et al., 2009].

Исследование Yamase Y. и соавторов показало наличие протективного эффекта аллеля G полиморфного варианта rs2075650 в отношении ишемического инсульта в японской популяции [Yamase et al., 2015].

1.5 Ген аполипопротеида Е в развитии многофакторных заболеваний

Структурные отличия в изоформах аполипопротеида Е играют важную роль в развитии сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний [Mahley, Rall Jr, 2000]. Обнаруженный в 1970-м году белок входит в состав хиломикронов и липопротеидов очень низкой плотности и имеет большое сродство с холестерином, что определяет его функцию [Shore, Shore, 1973; Goldstein, Brown, 1976; Mahley, 1983; Mahley, 1988]. Известные три изоформы: Е2, Е3 и Е4 определяются двумя несинонимичными заменами в гене *АРОЕ* на 19 хромосоме. Существующая на настоящее время номенклатура гена *АРОЕ* и белка возникла в результате консенсуса между основными исследователями этого белка [Zannis et al., 1982]. Основным источником синтеза этого белка является печень (до 75%), вторым наиболее распространенным местом синтеза является мозг

[Elshourbagy et al., 1985]. Макрофаги и другие типы клеток также синтезируют АРОЕ [Elshourbagy et al., 1985; Mahley, Rall Jr, 2000].

Изначально считалось, что АРОЕ вовлечен в транспорт липидов и развитие сердечно-сосудистых заболеваний [Mahley, 1988; Mahley, Rall Jr, 2000]. Аполипопротеид Е является критическим лигандом в клиренсе холестерина из триглицеридов и липопротеидов. После обнаружения Goldstein и Brown рецептора LDL [Goldstein, Brown, 1976], было показано, что АРОЕ является его основным лигандом [Innerarity, Mahley, 1978]. Дальнейшие исследования показали, что изоформа АРОЕ2 приводит к развитию наследственной гиперхолестеролемии III типа [Breslow et al., 1982; Schneider et al., 1981; Rall et al., 1982]. АРОЕ2 и АРОЕ4 являются проатерогенными и ускоряют развитие атеросклероза. Замена аргинина на цистеин в 158 положении (АРОЕ2) вызывает нарушение структуры белка, что ухудшает связывание с рецептором LDL и в итоге приводит к накоплению атерогенных липидов в крови [Wilson et al., 1991]. В то время как АРОЕ2 и АРОЕ3 связываются с маленькими фосфолипид-богатыми ЛПВП, АРОЕ4 связывается с большими триглицерид-богатыми ЛПОНП. Это свойство объясняется нарушением взаимодействия доменов белка в результате мутаций, приводя к изменению связывающей способности с липидами [Dong, Weisgraber, 1996]. Исследования на АРОЕ-дефицитных мышах показали нарушение секреции триглицеридов липопротеидами очень низкой плотности в гепатоцитах, приводя к развитию атеросклеротического поражения [Kuipers et al., 1997].

АРОЕ играет важную роль в развитии такого нейродегенеративного заболеваний как болезнь Альцгеймера и других неврологических заболеваний. Синтезированный нейронами АРОЕ4 подвергается большему протеолитическому расщеплению, чем АРОЕ3 [Harris et al., 2003]. Полученные укороченные фрагменты не подвергаются секреции и проникают в цитозоль. Установлено, что гидрофобные домены, ответственные за связывание с липидами, обладают митохондриальным таргетингом и приводят к нейротоксичности [Chang et al., 2005]. Так при инкубации нейронных клеток с АРОЕ4 наблюдалось уменьшение

количества митохондрий, локализованных в синапсах [Brodbeck et al., 2008]. Помимо этого, APOE4 вносит вклад с БА взаимодействуя с амилоидным путем поражения мозга. Культивация нейрональных клеток, экспрессирующих белок-предшественник амилоида, с экзогенным APOE4 приводит к увеличению синтеза пептида и его клиренсу в митохондриях [Mahley et al., 2006].

Роль гена *APOE* в развитии сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний хорошо изучена, однако полногеномные исследования позволили обнаружить ассоциации гена *TOMM40*, расположенного в непосредственной близости от *APOE*, с уровнями липидного спектра и развитием БА. Данный аспект вызывает большой интерес в изучении вклада гена *TOMM40* в развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на большое количество исследований направленных на установление роли гена *TOMM40* в патогенезе различных заболеваний, остается много белых пятен в понимании механизмов, с помощью которых осуществляется влияние на риск развития нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. До конца неясным остается вопрос о независимых эффектах гена *TOMM40*, или совместном влиянии с геном *APOE* за счет неравновесия по сцеплению, в риск развития патологических состояний. Однако, все обнаруженные ассоциации гена *TOMM40* с БА или ССЗ не могут быть объяснены только неравновесием по сцеплению. Возможно совместное изучение ассоциаций генов *TOMM40* и *APOE*, а также полиморфизма мтДНК позволят получить новые данные в отношении такого состояния как острый коронарный синдром и его эндотипов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика выборки больных с ОКС и контрольной группы

Исследование было одобрено локальными этическими комитетами ФГБНУ «НИИ медицинской генетики» и ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (ФГБНУ «НИИ КПССЗ»).

В исследование включено 437 больных с острым коронарным синдромом с подъемом комплекса ST со средним возрастом 60 лет, из них 309 (70,7%) мужчин (средний возраст 58 лет) и 128 (29,3%) женщин (средний возраст 65 лет), и контрольная группа из 366 практически здоровых в отношении сердечно-сосудистой системы (средний возраст 47 лет), из них 125 (34,2%) мужчин (средний возраст 49 лет) и 245 (65,8%) женщин (средний возраст 46 лет). В группе больных и в контрольной группе, по данным анкетирования, русские составляют 90%, украинцы и белорусы (по национальности матери) – около 5%. Примерно в 60% случаев матери пациентов в обеих выборках были уроженками Западно-Сибирского региона и Алтайского края. Выборки набраны на базе ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и кафедре факультетской терапии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ.

Контрольная группа практически здоровых в отношении сердечно-сосудистых заболеваний индивидуумов сформирована по критериям, характеризующим нормальную деятельность сердечно-сосудистой системы. Индивидуумы были выбраны из случайной выборки жителей городов Томска и Кемерово. Критерии отбора включали анализ таких показателей как уровни артериального систолического (САД) и диастолического давления (ДАД), уровень общего холестерина сыворотки крови, уровни липопротеидов в сыворотке крови, анализ индивидуальной истории сердечно-сосудистых заболеваний и возраст, показатели эхокардиографического исследования (ЭхоКГ), отсутствие ССЗ в анамнезе.

В контрольную выборку включались индивидуумы старше 30 лет; средний возраст составил 45 лет как среди мужчин, так и среди женщин. Исключались

лица более молодого возраста, т.к. первые проявления сердечно-сосудистой патологии, как правило, наступают после 30 лет.

Характеристика контрольной выборки представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика контрольной группы

Признак	Среднее значение $\pm$ станд. ошибка
Индекс массы тела (ИМТ), $\text{кг}/\text{м}^2$	$26,08 \pm 0,26$
Уровень общего холестерина, ммоль/л	$5,89 \pm 0,07$
Уровень ХС ЛПВП, ммоль/л	$1,45 \pm 0,02$
Уровень триглицеридов, ммоль/л	$1,42 \pm 0,04$
Уровень ХС ЛПНП, ммоль/л	$3,97 \pm 0,07$
Уровень глюкозы, ммоль/л	$5,33 \pm 0,5$
Уровень САД, мм.рт. ст.	$126,53 \pm 0,98$
Уровень ДАД, мм.рт. ст.	$81,51 \pm 0,64$

Выборка больных с острым коронарным синдромом с подъемом комплекса ST была набрана на базе ФГБНУ «НИИ КПССЗ» г. Кемерово. На этапе госпитализации всем пациентам ставился предварительный диагноз «острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST». У всех больных получены данные о липидном спектре и уровне глюкозы в сыворотке крови, уровнях систолического и диастолического давления в течение первых суток. Получены данные индивидуального анамнеза: наличие артериальной гипертензии, инсульта, сахарного диабета, гиперхолестеролемии, коронарного стеноза, а также постинфарктного кардиосклероза, стенокардии, хронической сердечной недостаточности (ХСН). У всех больных в течение первых суток была проведена оценка сократительной активности миокарда путем определения с помощью ЭХО-кардиографического исследования процентного объема фракции выброса левого желудочка (ФВ). Значения ФВ меньше 40 % являлись признаком систолической дисфункции миокарда. Кроме того, всем больным проведено обследование некоронарных артериальных бассейнов (экстракраниального и нижних конечностей) с целью установления мультифокального атеросклероза,

который регистрировался в случае обнаружения стенозирования просвета сосуда более 30% по результатам ультразвукового исследования. Помимо этого, у больных определена толщина комплекса интима-медиа (КИМ) в стенке стенозированных коронарных артерий.

У больных в течение 12 месяцев с момента госпитализации прослеживали развитие повторных сердечно-сосудистых событий: ИМ, случаи острых нарушений мозгового кровообращения, декомпенсации хронической сердечной деятельности, либо развития стенокардии 3-4 функционального класса (ФК), а также случаи внезапной смерти не связанной с основной патологией. Кроме того, глубину поражения миокарда оценивали по наличию или отсутствию на ЭКГ признаков патологического зубца Q (Q-инфаркт или не-Q-инфаркт).

Характеристика группы больных представлена в Таблице 2.

Материалом для исследования служила цельная кровь, взятая у исследуемых из локтевой вены.

Таблица 2 – Характеристика больных с ОКС

Признак	Среднее значение $\pm$ станд. ошибка
Индекс массы тела, кг/м ²	28,39 $\pm$ 0,23
Уровень САД, мм. рт. ст.	133,13 $\pm$ 1,21
Уровень ДАД, мм. рт. ст.	82,30 $\pm$ 0,68
Уровень общего холестерина, ммоль/л	5,37 $\pm$ 0,06
Уровень глюкозы при поступлении, ммоль/л	9,12 $\pm$ 0,20
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л	7,09 $\pm$ 0,20
Уровень ХС ЛПВП, ммоль/л	1,09 $\pm$ 0,01
Уровень ХС ЛПНП, ммоль/л	3,15 $\pm$ 0,05
Уровень триглицеридов, ммоль/л	2,03 $\pm$ 0,46
Фракция выброса, %	49,42 $\pm$ 0,48

Характеристика полиморфизмов, взятых для проведения исследования, представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика полиморфизмов генов *ТОММ40* и *АРОЕ*

Полиморфизм	Нуклеотидная последовательность	MAF	Место локализации	
rs741780	GAGAATTAGC[A/G]AGTGGCCCCA	0,480	Инtron	<i>ТОММ40</i>
rs2075650	GTGGGGTTGG[A/G]GTGGAGTGTG	0,119	Инtron	<i>ТОММ40</i>
rs1160985	CACAGGAACG[C/T]AGACTTGGAC	0,479	Инtron	<i>ТОММ40</i>
rs157580	AGGTGTCAGC[A/G]AGGTTCTTG	0,348	Инtron	<i>ТОММ40</i>
rs8106922	CTTCCTCTCC[A/G]GGGCTGCACC	0,297	Инtron	<i>ТОММ40</i>
rs7259620	TTTGCCATTC[A/G]TCTTGCTGCT	0,419	Инtron	<i>АРОЕ</i>
rs429358	GGAGGACGTG[C/T]GCGGCCGCCT	0,151	Экзон	<i>АРОЕ</i>
rs7412	CCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAGT	0,075	Экзон	<i>АРОЕ</i>
rs10524523	TGCATCTGGC[T(12-46)]GAGATGGGGT	-	Инtron	<i>ТОММ40</i>

Примечание – MAF (Minor Allele Frequency) – частота редкого аллеля в проекте «1000Genomes».

2.2 Выделение ДНК фенол-хлороформным методом

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции [Маниатис, Сэмбрук, 1984]. Кровь забирали из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. В пробирку типа «эппендорф» объемом 1,5 мл наливали 0,7 мл крови, затем добавляли 0,7 мл 1x SSC и центрифугировали на микроцентрифуге 2 мин на 10 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливали и затем повторно добавляли 1,4 мл раствора SSC (1x). Осадок разбивали и затем осаждали центрифугированием в том же режиме. На следующем этапе надосадочную жидкость сливали и добавляли к осадку 270 мкл 0,2 М ацетата натрия. Затем осадок снова разбивали и добавляли 30 мкл 10% SDS. Образец инкубировали в течение часа при 37°C, после чего добавляли 500 мкл смеси фенола и хлороформа (в соотношении 1:1) к образцу и перемешивали 10 мин до образования однородной смеси. Затем пробирку откручивали на микроцентрифуге 20 мин при 10 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в чистую микропробирку, не захватывая интерфазу. На следующем этапе к надосадочной жидкости добавляли 1,0 мл 96% этанола. Плавными

вращательными движениями наматывали ДНК саму на себя и осаждали центрифугированием в течение пяти минут при 10 тыс. оборотов в минуту. Затем спирт сливали через край пробирки и отмывали осадок в 70% спирте (1,0 мл) с последующим откручиванием в том же режиме: 5 минут при 10 тыс. об/сек. После чего, вновь отбирали спирт, контролируя наличие ДНК на дне пробирки, и оставляли сохнуть пробирки при комнатной температуре на 20 минут. Затем ДНК растворяли путем добавления 50 мкл деионизованной воды в пробирку. Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C.

Измерение концентрации ДНК проводили на спектрофотометре «NANODROP – 2000C», фирмы «Thermo Fisher Scientific», USA.

2.3 Генотипирование с помощью TaqMan-проб

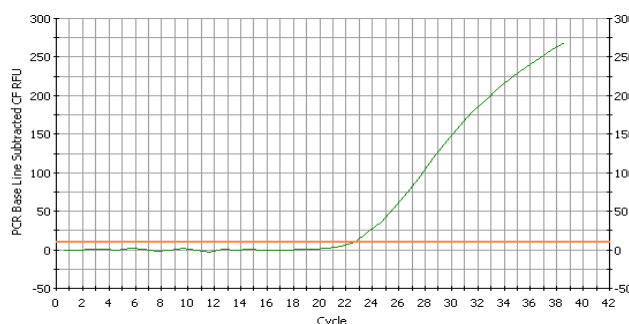
Аmplification исследуемых полиморфных вариантов генов *TOMM40* и *APOE* проводили на системах для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени «CFX96» фирмы «Bio-Rad Laboratories Ltd.», UK, и «ViiA7» фирмы «Applied Biosystems», USA. Для проведения реакции использовали готовые наборы реактивов и подобранных производителем праймеров с мечеными зондами для TaqMan-генотипирования фирмы «Applied Biosystems», с использованием готовых протоколов, рекомендованных производителем.

Для проведения анализа использовалась ДНК с концентрацией 5-20 нг/мкл. Условия проведения анализа представлены в Таблице 4.

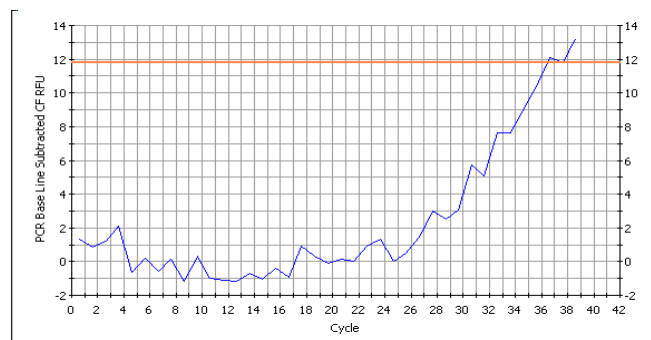
Анализ данных производили на основании полученных кривых амплификации в соответствии с рисунками 4–6.

Таблица 4 – Температурный режим проведения ПЦР в реальном времени

Стадия	Активация AmpliTaq Gold-полимеразы	ПЦР	
		40 циклов	
		Денатурация	Отжиг/Элонгация
Температура	95°C	92°C	60°C
Время	10 мин	15 сек	1 мин
Объем	15мкл		

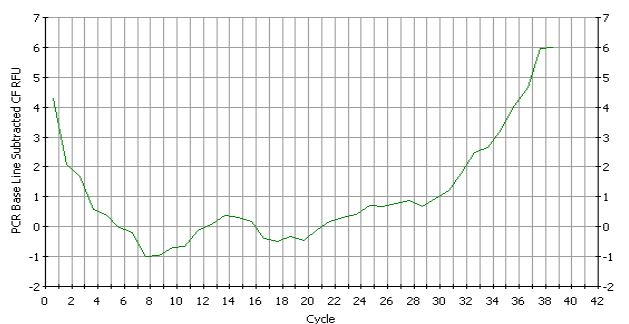


Краситель FAM

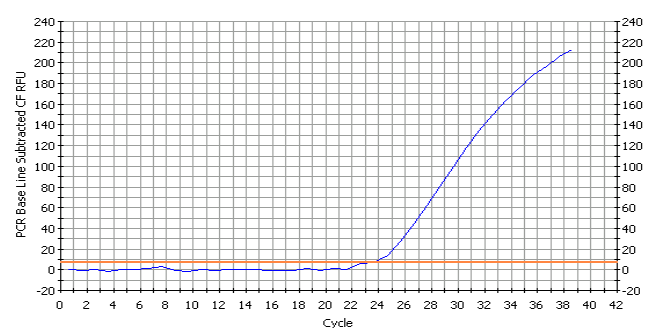


Краситель VIC

Рисунок 4 – Гомозигота по одному аллелю.

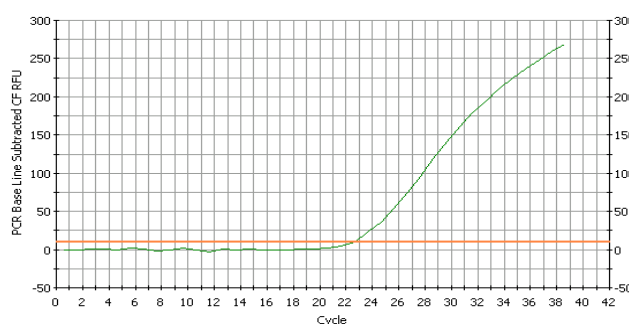


Краситель FAM

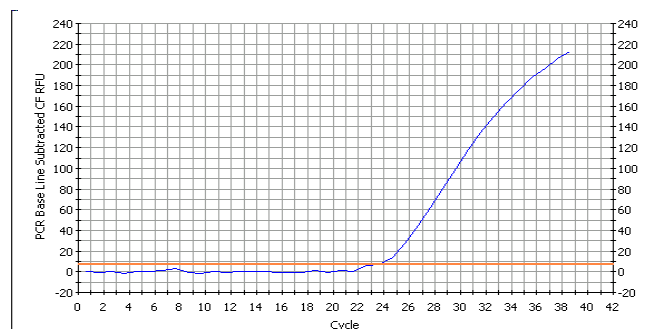


Краситель VIC

Рисунок 5 – Гомозигота по второму аллелю.



Краситель FAM



Краситель VIC

Рисунок 6 – Гетерозигота по обоим аллелям.

2.4 Анализ принадлежности к гаплогруппам мтДНК с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) путем электрофореза в агарозном геле

Для установления принадлежности изучаемых образцов к определенной гаплогруппе мтДНК сначала проводили ПЦР со специфическими праймерами для каждой гаплогруппы (Таблица 5). Структура праймеров была взята из литературных данных [Torroni et al., 1996]. Для каждой гаплогруппы были подобраны условия отжига праймеров в градиенте температур. ПЦР включала следующие этапы: предварительная денатурация – 95°C в течение 5 минут, затем 30-35 циклов амплификации состоящих из денатурации при 95°C в течение 30 сек., отжига праймеров при подобранных температурах от 55°C до 65°C в течение 30 сек. и элонгации при 72°C в течение 30 сек. и после всех циклов образцы инкубировали при 72°C в течение 5 минут для окончательной элонгации продуктов реакции. ПЦР-смесь включала в себя 0,2 мкл. Taq-полимеразы, по 1 мкл. прямого и обратного праймера, 1,5 мкл. SE-буфера, 1мкл. смеси четырех дезоксинуклеотидфосфатов производства компании «Сибэнзим», Новосибирск, и 9,5 мкл. деионизованной воды и 1 мкл. ДНК образца.

Принадлежность к определенным гаплогруппам определяли с помощью ПДРФ-анализа продуктов амплификации с соответствующими рестриктазами при оптимальных для фермента условиях в течение 12-24 часов. В состав рестрикционной смеси входили 7 мкл. амплификата, 1 мкл. буфера для рестрикции и 1-5 единиц активности фермента (подобранной в зависимости от его эффективности), оставшийся до 10 мкл. объем доводили деионизованной. В работе использовали ферменты и буферы производства компаний «Сибэнзим» (Новосибирск) и «Fermentas» (Литва).

После инкубации производили фракционирование продуктов рестрикции в течение 30-40 минут в 3% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием с последующей визуализацией и регистрацией результатов в ультрафиолетовом свете на гель-документирующей системе «GelDoc» компании «BioRad», США.

Таблица 5 – Структура праймеров и ферментов рестрикции для определения гаплогрупп мтДНК

Гаплогруппа	Структура праймеров	Сайт рестрикции	Фермент рестрикции	Длина продукта	Фрагменты рестрикции	
					«+»	«-»
H	F: 5' AAGCAATATGAAATGATCTG 3' R: 5' CGTAGGTTTGGTCTAGG 3'	–	<i>AluI</i>	242	+:137+30+75	–: 167+75
U	F: 5' CTCAACCCCGACATCATTACC 3' R: 5' ATTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAAGATT 3'	+	<i>HinfI</i>	224	+: 40+138+30	–: 40+168
T	F: 5' CCTTACTACACAATCAAAG 3' R: 5' GGCGAAATATTATGCTTTGT 3'	+	<i>AluI</i>	293	+: 199+94	–: 293
J	F: 5' CCTCCCTGACAAGCGCCTATAGC 3' R: 5' CTAGGGCTGTTAGAAGTCCT 3'	–	<i>BstOI</i>	261	+: 123+138	–: 261
M	F: 5' CCATGAGCCCTACAAACAAC 3' R: 5' GTAAATGAGGGGCATTTGGTA 3'	+	<i>AluI</i>	201	+: 115+86	–: 201
C	F: GCTTAGGCGCTATCACCAC 3' R: 5' ATATCTTGTTCAATTGTTAAG 3'	+	<i>AluI</i>	231	+: 90+141	–: 231
D	F: 5' CTAATACTATCTCGCACCTG 3' R: 5' GTAGGAGTAGCGTGGTAA 3'	–	<i>AluI</i>	331	+: 27+304	–: 331
H1	F: ACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCGC R: GAAGCCGCTTTGTGAAGTAGG	–	<i>Bsh1236I</i>	187	+: 17+170	–: 187
HV	F: 5'-CGCAGTCATTCTCATAATCGCCCcCGG-3' R: 5'-GGGGGTAAGGCGAGGTTAGC-3'	–	<i>SmaI</i>	180	+: 27+153	–: 180
V	F: 5' GGAGCTTAAACCCCTTA 3' R: 5' GGTAGTATTGGTTATGGTT 3'	–	<i>NlaIII</i>	432	+: 273+159	–: 432
I	F: 5' CGAAGCCGCCGCCTGATACTGG 3' R: 5' GTAGTAAGGCTAGGAGGGTG 3'	+	<i>AluI</i>	196	+: 122+74	–: 196

2.5 Методика анализа нуклеотидной последовательности мтДНК с помощью секвенирующей реакции по Сенгеру

Полиморфизм мтДНК осуществляли путем секвенирования первого гипервариабельного сегмента (ГВС1) мтДНК расположенного между 16024-16400 парами нуклеотидов. Секвенирование нуклеотидной последовательности было выполнено на приборах 3500 и 3730 Genetic Analyzer по протоколу производителя с использованием меченых терминаторов «Big Dye Terminators v.3.1» фирмы «Applied Biosystems», США. Для проведения ПЦР и секвенирующей реакции были использованы праймеры, структура которых представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Структура праймеров для оценки полиморфизма ГВС1 мтДНК

Название	Ориентация	Последовательность
L15998	Прямой	5'-ACACCAGTCTTGTAACCGG-3'
H408	Обратный	5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3'
H16545	Обратный	5'-AACGTGTGGGCTATTTAGGC-3'

На первом этапе проводили ПЦР с прямым и обратным праймерами для получения продуктов амплификации. После проводили очистку от праймеров и остатков дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) с использованием смеси 1 единицы активности щелочной фосфатазы и экзонуклеазы I фирмы «Fermentas», Латвия. Инкубацию с ферментами проводили в течение 40 минут при 37°C с последующей инактивацией ферментов. В дальнейшем проводилась секвенирующая реакция с одним из праймеров. Продукты секвенирующей реакции подвергали очистке от димеров праймеров и dNTP с помощью BigDye® X Terminator™ Purification Kit фирмы «Applied Biosystems». После очистки образцы помещались в автоматический анализатор для определения нуклеотидной последовательности. На следующем этапе проводили сравнение полученных последовательностей ГВС1 мтДНК с референсной последовательностью в программе «BioEdit» с целью поиска мутаций мтДНК.

2.6 Анализ длин амплифицированных фрагментов ДНК (AFLP-анализ) полиморфного варианта rs10524523

Для определения длин фрагментов политиминового повтора гена *ТОММ40* проводили фрагментный анализ на генетических анализаторах 3500 и 3730 Genetic Analyzer фирмы «Applied Biosystems». Методика определения длин полиТ повторов была любезно предоставлена Dr. O. Chiba-Falek (Дьюковский университет, США).

На первом этапе проводят полимеразную цепную реакцию с использованием специфических праймеров, на конце одного из которых добавлен флюоресцентный краситель.

Последовательности праймеров:

Прямой: 5'-FAM-TGCTGACCTCAAGCTGTCCTC-3'

Обратный: 5'-GAGGCTGAGAAGGGAGGATT-3'

ПЦР смесь: (Общий объем 15 мкл)

SA Буфер	1,5 мкл.
5'-FAM-праймер	0,5 мкл.
3'-праймер	0,5 мкл.
dNTPs	1,5 мкл
Hot Start Taq полимеразы	0,2 мкл.
DMSO	0,75 мкл.
MgCL ₂	1,0 мкл.
H ₂ O	4,0 мкл.
ДНК (5нг/мкл.)	4,0 мкл.

Условия ПЦР:

Цикл 1: Денатурация: 95 °C -3 мин.

Цикл 2 (35 повторов):

Денатурация: 95°C – 30сек.

Отжиг: 60°C - 30 сек.

Элонгация: 72°C – 30 сек.

Цикл 3: Элонгация: 72°C – 3 мин.

Хранение при 4°C

После получения ПЦР-продукта проводили подготовку к фрагментному анализу путем добавления Hi-Di формамида и набора маркеров длин фрагментов LIZ 500 Size Standard фирмы «AB»:

Hi-Di Formamide – 9,5мкл.

LIZ 500 Size Standard – 0,2мкл.

PCR Sample – 0,3 мкл.

Предподготовку образцов проводили следующим образом: помещали планшет в термоциклер на 3 мин при 95 °C с последующим резким охлаждением и помещением в генетический анализатор 3500 Genetic Analyzer фирмы «Applied Biosystems» для проведения фрагментного анализа по протоколу AFLP-анализа.

Анализ длин полиТ повтора ПЦР-продукта проводили по следующей формуле

$$N = X - 150 \text{ п. о.},$$

где N – длина полиТ повтора,

X – длина амплифицированного ПЦР-продукта по наивысшему пику (Рисунок 7).

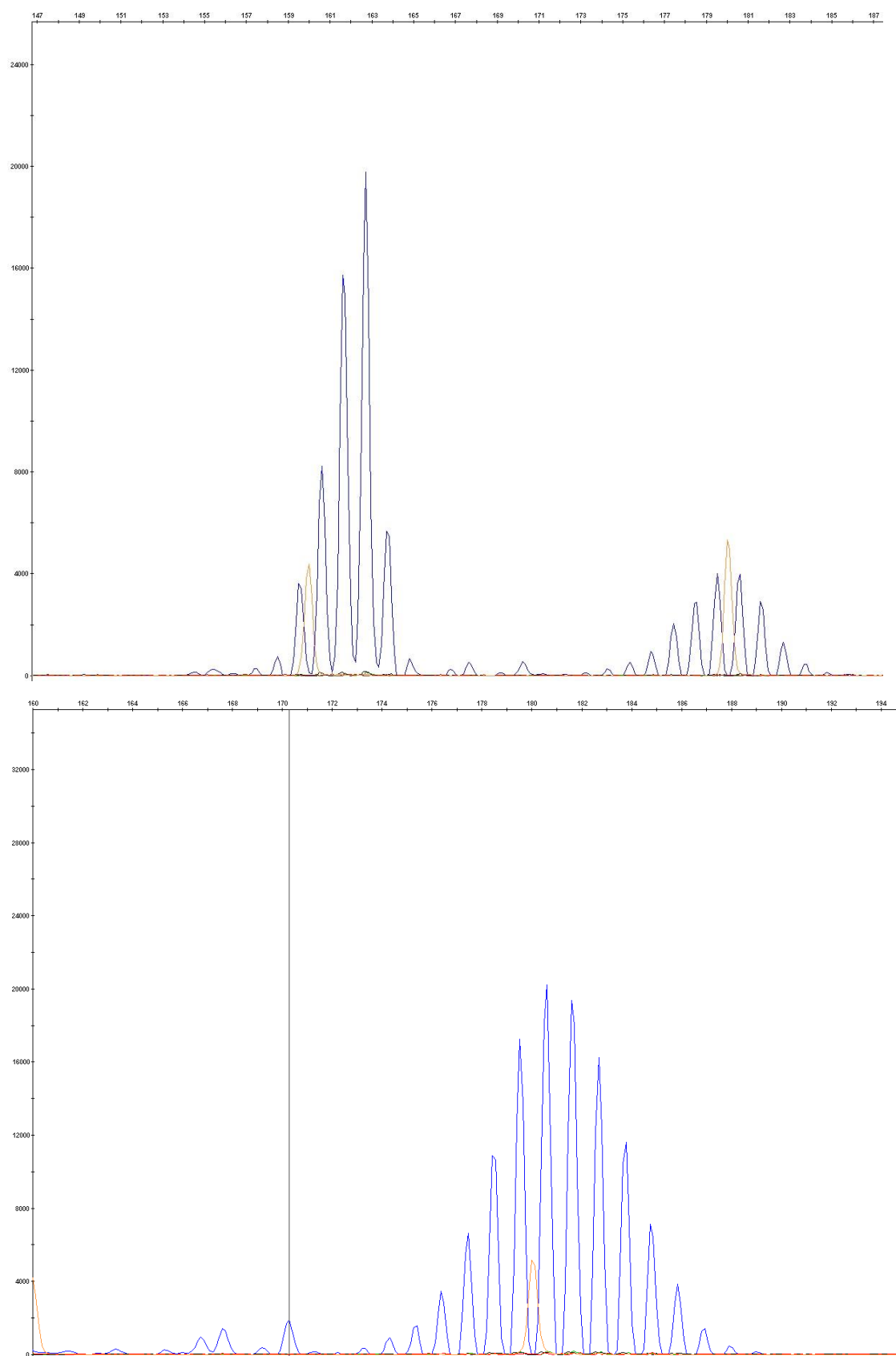


Рисунок 7 – Изображения результатов фрагментного анализа полиТ повтора гена *ТОММ40*.

2.7 Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка результатов включала анализ соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга, сравнение частот аллелей и генотипов в группе больных и в группе контроля (точный тест Фишера, критерий χ^2), однофакторный дисперсионный анализ.

Проверку соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 или точного теста Фишера [Вейр, 1995]. Оценку различия частот генотипов и аллелей между разными группами осуществляли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность или точному тесту Фишера при объеме выборки ≤ 5 . Наблюдаемый уровень гетерозиготности вычисляли как долю гетерозигот от общего объема выборки. Ожидаемую гетерозиготность рассчитывали по Nei [Nei, 1975]. Относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой (H) рассчитывали как:

$$H = (H_{obs} - H_{exp}) / H_{exp}, \quad (1)$$

Где H_{obs} и H_{exp} – ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность соответственно.

Для изучения фенотипической изменчивости количественных признаков, использовали общепринятые статистические процедуры. Проверку на нормальность распределений осуществляли по критерию Колмогорова-Смирнова. Сравнение средних значений признаков в разных группах осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа по Фишеру или непараметрическими методами – по Манну-Уитни и Краскелу-Уоллесу [Лакин, 1990].

Анализ неравновесия по сцеплению проводили с использованием алгоритма предложенного Gabriel S. B. и соавт. [Gabriel et al., 2002]. Гаплотипы оценивались с помощью EM-алгоритма [Qin et al., 2002] или алгоритма цепей Маркова в программе «Haploview 4.2» и «SNPStats» [Solé et al., 2006].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ полиморфизма мтДНК

Исследование полиморфизма митохондриальной ДНК проводили путем анализа первого гипервариабельного сегмента Д-петли мтДНК. В дальнейшем, полученные в ходе секвенирующей реакции, нуклеотидные последовательности сравнивали с кембриджской референсной последовательностью митохондриального генома человека (rCRS) с использованием программного обеспечения «SeqScape Software v. 2.7» фирмы «Applied Biosystem». На основании выравнивания и сравнения нуклеотидных последовательностей проводили первичную классификацию гаплотипов мтДНК к определенным гаплогруппам. В дальнейшем точное установление принадлежности к гаплогруппам осуществляли с помощью генотипирования специфических сайтов рестрикции.

Для выполнения данного этапа были отобраны наиболее часто встречающиеся гаплогруппы мтДНК: H и ее подгруппа H1, U и её подгруппы U2e, U4, U5, U-K, I, J, T, HV, HV0 (включающей в себя гаплогруппу V), W. Помимо этого в качестве маркеров-кандидатов были включены три гипервариабельных сайта в последовательности мтДНК: транзигия A10398G, приводящая к замене аминокислоты в третьей субъединице NADH-дегидрогеназы (Thr114Ala); замена T16519C, для которой ранее были показаны ассоциации с некоторыми количественными признаками, характеризующими функцию сердечно-сосудистой системы [Hegele et al., 1997; Фрейдин и др., 1999]; полиморфизм T16189C, приводящий к образованию полицитозинового тракта с гетероплазмией по числу цитозинов в участке 16184-16193, который известен как фактор риска развития сахарного диабета [Gill-Randall et al., 2001; Ye et al., 2013]. Помимо этого существуют данные, утверждающие, что данный полиморфный вариант оказывает влияние на репликацию и приводит как следствие к снижению числа копий мтДНК в клетке. Однако, гетероплазмия в полицитозинном тракте отсутствует, если T16189C сопровождается дополнительными заменами цитозина на тимин в любой позиции в этом участке.

3.1.1 Характеристика распространенности гаплогрупп и полиморфных вариантов мтДНК в выборке больных с острым коронарным синдромом и контрольной выборке

В ходе выполнения данного этапа работы было проведено сравнение частот встречаемости гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК в изучаемых выборках (Таблица 7). Среди всех гаплогрупп наибольшие частоты наблюдались у гаплогрупп Н, U, Т и J, которые в сумме составили порядка 80% у больных с ОКС и 82% в контрольной выборке. Полученные оценки частот гаплогрупп являются характерными для европеоидных популяций. При сравнении подгрупп, разделенных по гендерному признаку, значимых отличий не наблюдалось, поэтому дальнейший анализ проводился без разделения по полу.

Так частота гаплогруппы Н в выборке больных с ОКС составила 35,68%, а частота ее подгруппы Н1 – 10,80%, в контрольной выборке значения частот были выше, но не достигали статистически значимых различий, и составили 40,44% и 12,30%, соответственно.

Значения частоты второй по распространенности гаплогруппы U у больных была 25,88%, а в контрольной выборке – 27,87%.

Частота гаплогруппы J в выборке больных составила 7,54%, а в контрольной выборке – 5,46%.

Гаплогруппа Т в выборке больных с ОКС встречалась немного чаще по сравнению с контрольной выборкой – 10,55% и 8,20%, соответственно.

Значимое отличие между выборкой больных с ОКС и контрольной выборкой было получено только для гаплогруппы HV0 ($p=0,015$, $\chi^2=5,94$, OR=2,59 (1,18 - 5,81)). У больных с ОКС частота этой гаплогруппы составила 6,78%, у контрольной выборки – 2,73%.

При анализе частоты встречаемости полиморфных сайтов в изучаемых выборках не было получено значимых отличий в частотах аллелей. Так, аллель С полиморфного варианта T16519C у больных с ОКС встречался с частотой 57,79%, а в контрольной выборке – с частотой 57,38%.

Значения частоты аллеля С полиморфного варианта T16189C у больных с ОКС и контрольной выборки составили 17,59% и 17,21%, соответственно.

Частота аллеля G полиморфного сайта A10398G, характерного для ряда гаплогрупп, у больных с ОКС составила 16,83%, а в контрольной выборке – 12,02%.

Таблица 7 – Частоты встречаемости гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК в контрольной выборке и группе больных с острым коронарным синдромом

Гаплогруппа	Пациенты с ОКС с подъемом ST						Контрольная группа					
	Мужчины (n=285)		Женщины (n=113)		Общая (n=398)		Мужчины (n=125)		Женщины (n=241)		Общая (n=366)	
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
H	103	36,14	39	34,51	142	35,68	58	46,40	90	37,34	148	40,44
в т, ч, H1	29	10,18	14	12,39	43	10,80	20	16,00	25	10,37	45	12,30
U	69	24,21	34	30,09	103	25,88	22	17,60	80	33,20	102	27,87
U2e	6	2,11	3	2,65	9	2,26	0	0,00	4	1,66	4	1,09
U4	10	3,51	7	6,19	17	4,27	4	3,20	14	5,81	18	4,92
в т, ч, U5a	19	6,67	10	8,85	29	7,29	7	5,60	22	9,13	29	7,92
U5b	9	3,16	1	0,88	10	2,51	6	4,80	11	4,56	17	4,64
K	9	3,16	6	5,31	15	3,77	4	3,20	17	7,05	21	5,74
I	5	1,75	0	0,00	5	1,26	2	1,60	7	2,90	9	2,46
J	25	8,77	5	4,42	30	7,54	7	5,60	13	5,39	20	5,46
T	28	9,82	14	12,39	42	10,55	12	9,60	18	7,47	30	8,20
HV	7	2,46	1	0,88	8	2,01	3	2,40	6	2,49	9	2,46
HV0 (вкл, V)	22	7,72	5	4,42	27	6,78	3	2,40	7	2,90	10	2,73
W	6	2,11	0	0,00	6	1,51	5	4,00	6	2,49	11	3,01
«Монголоидные»	10	3,51	9	7,96	19	4,77	9	7,20	9	3,73	18	4,92
Другие	10	3,51	6	5,31	16	4,02	4	3,20	5	2,07	9	2,46
Полиморфные сайты:												
10398G	49	17,19	18	15,93	67	16,83	17	13,60	27	11,20	44	12,02
16519C	163	57,19	67	59,29	230	57,79	72	57,60	138	57,26	210	57,38
16189C	46	16,14	24	21,24	70	17,59	19	15,20	44	18,26	63	17,21
16189C-het	38	13,33	20	17,70	58	14,57	16	12,80	31	12,86	47	12,84

Примечание – п – объем выборки

3.1.2 Анализ вклада гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК в характер течения и тяжести проявления атеросклеротического поражения при ОКС

Анализ ассоциаций со значением класса сердечной недостаточности по шкале Killip

Сравнительный анализ частот гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК проводили в зависимости от наличия или отсутствия сердечной недостаточности по шкале Killip, которая оценивает острую сердечную недостаточность при инфаркте миокарда и является мощным предиктором смертности у больных с ОКС. В результате анализа не было получено значимых отличий ни для одной гаплогруппы: частоты всех изученных маркеров в группе пациентов со значениями по шкале Killip >1 не отличались от таковых в группе со значением этого показателя, равным 1 (Таблица 8).

Анализ ассоциаций со значением фракции выброса.

Для анализа ассоциаций полиморфизма мтДНК с объемом фракции выброса левого желудочка сердца группу больных с ОКС разделили на 2 подгруппы в зависимости от значений фракции выброса (процент крови, выбрасываемой из левого желудочка в аорту). В первую группу входили пациенты со значениями этого показателя, меньше или равными 40 %, а во вторую - больше 40%. Полученные данные представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Анализ ассоциаций гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК с клиническими фенотипами

Гаплогруппа	Фракция выброса левого желудочка				χ^2	p	Класс острой сердечной недостаточности по Killip*				χ^2	p	Ранний инфаркт				χ^2	p
	$\leq 40\%$ (n=73)		$>40\%$ (n=326)				1 (n=335)		>1 (n=63)				Ранний инфаркт (n=153)		Поздний инфаркт (n=182)			
	n	%	n	%			n	%	n	%			n	%	n	%		
H	23	31,51	119	36,50	0,45	0,502	121	36,12	21	33,33	0,08	0,779	48	31,37	66	36,26	0,68	0,409
в т. ч. H1	7	9,59	36	11,04	0,02	0,878	35	10,45	8	12,70	0,09	0,759	13	8,50	20	10,99	0,33	0,563
U	26	35,62	77	23,62	3,88	0,049	85	25,37	18	28,57	0,14	0,708	38	24,84	54	29,67	0,75	0,387
в т. ч. U5	12	16,44	27	8,28	3,62	0,057	32	9,55	7	11,11	0,01	0,911	8	5,23	27	14,84	7,20	0,007
U4	4	5,48	13	3,99	-	0,528	13	3,88	4	6,35	-	0,325	5	3,27	10	5,49	0,51	0,474
U2e	2	2,74	7	2,15	-	0,670	8	2,39	1	1,59	-	1,000	7	4,58	0	0,00	-	0,004
K	2	2,74	13	3,99	-	1,000	12	3,58	3	4,76	0,02	0,880	5	3,27	8	4,40	0,06	0,804
J	4	5,48	26	7,98	-	0,625	27	8,06	3	4,76	-	0,716	15	9,80	9	4,95	2,27	0,132
T	8	10,96	34	10,43	0,01	0,938	35	10,45	7	11,11	0,00	0,947	19	12,42	16	8,79	0,81	0,367
HV0 (вкл. V)	3	4,11	24	7,36	-	0,44	24	7,16	3	4,76	-	0,723	8	5,23	13	7,14	0,24	0,622
HV	0	0,00	8	2,45	-	0,360	8	2,39	0	0,00	-	0,366	5	3,27	2	1,10	-	0,253
Полиморфные сайты:																		
10398G	9	12,33	58	17,79	0,91	0,339	56	16,72	11	17,46	0,00	0,969	30	19,61	26	14,29	1,33	0,249
16519C	41	56,16	188	57,67	0,01	0,917	189	56,42	41	65,08	1,30	0,255	97	63,40	96	52,75	3,44	0,064
16189C	14	19,18	56	17,18	0,06	0,814	59	17,61	11	17,46	0,02	0,880	36	23,53	23	12,64	6,07	0,014
16189C-het	12	16,44	46	14,11	0,11	0,744	48	14,33	10	15,87	0,02	0,901	29	18,95	19	10,44	4,24	0,039

Продолжение таблицы 8

Гаплогруппа	ССО				χ^2	р	Сах. диабет 2 типа				χ^2	р	МФА				χ^2	р
	нет (n=133)		да (n=48)				нет (n=330)		да (n=68)				Да (n=149)		Нет (только коронарный) (n=213)			
	п	%	п	%			п	%	п	%			п	%	п	%		
Н	42	31,58	20	41,67	1,18	0,278	119	36,06	23	33,82	0,04	0,832	47	31,54	81	38,03	1,34	0,247
в т. ч. Н1	6	4,51	10	20,83	9,72	0,002	36	10,91	7	10,29	0,00	0,948	17	11,41	22	10,33	0,02	0,878
U	30	22,56	8	16,67	0,43	0,514	81	24,55	22	32,35	1,41	0,235	40	26,85	50	23,47	0,37	0,544
в т. ч. U5	12	9,02	3	6,25	-	0,770	32	9,70	7	10,29	0,01	0,942	16	10,74	17	7,98	0,51	0,477
U4	5	3,76	0	0,00	-	0,327	13	3,94	4	5,88	-	0,507	3	2,01	11	5,16	-	0,169
U2e	1	0,75	2	4,17	-	0,172	5	1,52	4	5,88	-	0,050	5	3,36	3	1,41	-	0,282
К	5	3,76	1	2,08	-	1,000	11	3,33	4	5,88	-	0,300	6	4,03	9	4,23	0,03	0,861
J	14	10,53	1	2,08	-	0,122	28	8,48	2	2,94	-	0,135	10	6,71	19	8,92	0,32	0,572
T	16	12,03	6	12,50	0,03	0,863	32	9,70	10	14,71	1,01	0,314	17	11,41	20	9,39	0,20	0,654
HV0 (вкл. V)	9	6,77	4	8,33	-	0,748	26	7,88	1	1,47	-	0,063	11	7,38	14	6,57	0,01	0,930
HV	4	3,01	0	0,00	-	0,575	6	1,82	2	2,94	-	0,629	6	4,03	2	0,94	-	0,069
Полиморфные сайты:																		
10398G	27	20,30	9	18,75	0,00	0,984	56	16,97	11	16,18	0,00	0,985	25	16,78	39	18,31	0,06	0,814
16519C	74	55,64	30	62,50	0,43	0,513	185	56,06	45	66,18	1,97	0,161	84	56,38	126	59,15	0,18	0,675
16189C	23	17,29	15	31,25	3,34	0,067	57	17,27	13	19,12	0,04	0,850	21	14,09	42	19,72	1,56	0,212
16189C-het	18	13,53	15	31,25	6,28	0,012	49	14,85	9	13,24	0,02	0,877	18	12,08	34	15,96	0,78	0,377

Продолжение таблицы 8

Гаплогруппа	Q-инфаркт				χ^2	p
	Да (n=288)		Нет (n=102)			
	n	%	n	%		
H	103	35,76	38	37,25	0,02	0,881
в т. ч. H1	31	10,76	12	11,76	0,01	0,926
U	73	25,35	28	27,45	0,08	0,775
в т. ч. U5	27	9,38	12	11,76	0,25	0,618
U4	16	5,56	0	0	-	0,016
U2e	5	1,74	4	3,92	-	0,249
K	8	2,78	6	5,88	1,3	0,255
J	24	8,33	5	4,90	0,84	0,360
T	29	10,07	12	11,76	0,09	0,770
HV0 (вкл. V)	17	5,90	7	6,86	0,01	0,915
HV	6	2,08	2	1,96	-	1,000
Полиморфные сайты:						
10398G	47	16,32	18	17,65	0,02	0,877
16519C	168	58,33	58	56,86	0,02	0,887
16189C	48	16,67	21	20,59	0,55	0,459

Примечания – n – объем выборки, p –уровень значимости, значения критерия χ^2 использованы для сравнения частот аллелей и генотипов в сравниваемых выборках, жирным шрифтом выделены значимые ассоциации.

При сравнении частот маркеров между подгруппами были получены статистически значимые различия для гаплогруппы U: частота U в подгруппе, где ФВ $\leq$ 40% , была значимо выше по сравнению со второй подгруппой – 35,62% и 23,62, соответственно (p=0,049, χ^2 =3,88, OR=1,79 (1,00 - 3,18)). Кроме того, при сравнении частоты субгаплогруппы U5 в зависимости от ФВ достигнутый уровень значимости был близок к статистически значимым показаниям (p=0,057). По другим гаплогруппам и полиморфным сайтам значимых отличий не получено. Таким образом, показано, что гаплогруппа U является фактором, указывающим на более низкую сократительную способность миокарда при ОКС.

Анализ ассоциаций с ранним инфарктом миокарда

Сравнительный анализ частот встречаемости гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК был также проведен в группах больных, разделенных по наличию либо раннего инфаркта миокарда, либо позднего инфаркта. К группе с ранним инфарктом отнесены пациенты (мужчины и женщины) в возрасте до 55 лет и 60 лет, соответственно. В группу с поздним инфарктом миокарда отнесли пациентов старше этого возраста и с отсутствием в анамнезе постинфарктного кардиосклероза. Полученные данные представлены в Таблице 8.

В результате сравнительного анализа групп с ранним и поздним инфарктом миокарда были получены значимые различия в частоте встречаемости гаплогруппы U5, которая встречалась значительно реже у лиц с ранним инфарктом миокарда по сравнению с группой с поздним инфарктом – 5,23% и 14,84% соответственно ($p=0,007$, $\chi^2=7,20$, $OR=0,32$ (0,13 - 0,76)). В то же время другая ветвь гаплогруппы U – U2e – наоборот, была ассоциирована с ранним инфарктом (4,6% против 0% в группе с поздним инфарктом). Помимо этого, аналогичный эффект в отношении возраста первого инфаркта проявил полиморфизм T16189C, который почти в два раза чаще встречался в группе с ранним инфарктом – 23,53% против 12,64% ($p=0,014$, $\chi^2=6,07$, $OR=2,07$ (1,15 - 3,94)). Такая же связь имеет место, если рассматривать полиморфизм – T16189C, сопровождающийся гетероплазмией полицитозинового тракта ($p=0,039$, $\chi^2=4,24$, $OR=2,01$ (1,03 - 3,94)). Другой полиморфный вариант – T16519C – имел пограничный уровень значимости в отношении возраста первого инфаркта (63,40% при раннем и 52,75% при позднем инфаркте) при использовании критерия Пирсона $p=0,049$, а при использовании поправки Йетса уровень значимости превышал 0,05 ($p=0,064$).

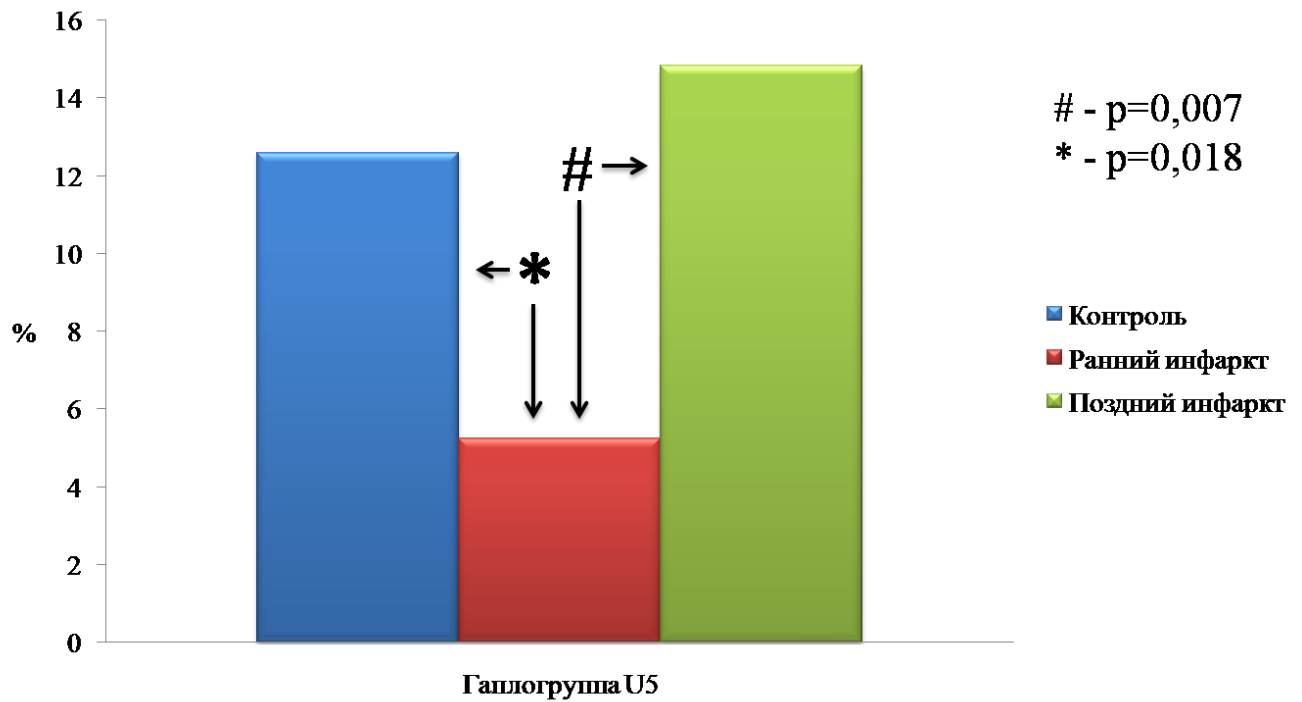


Рисунок 8 – Частоты гаплогруппы U5 в исследуемых выборках.

Кроме того, частота гаплогруппы U5 в группе с ранним инфарктом значимо отличалась от частоты в контрольной группе – 5,23% и 12,57%, соответственно ($p=0,018$, $\chi^2=5,47$, $OR=0,38$ (0,16 - 0,87)) (Рисунок 8).

Анализ ассоциаций с сердечно-сосудистыми осложнениями (ССО)

Сравнительный анализ частот гаплогрупп и полиморфных вариантов мтДНК проводили между группами пациентов, имевших какие-либо сердечно-сосудистые осложнения (повторный инфаркт, инсульт, декомпенсация хронической сердечной недостаточности) в течение года после госпитализации по поводу ОКС, или не имевших ССО. Данные представлены в Таблице 8.

При сравнении была выявлена значимая ассоциация полиморфного варианта T16189C, сопровождающегося гетероплазмией полицитозинового тракта, с развитием ССО в течение года с момента госпитализации. Данный вариант встречался в 31,25% случаев против 13,53% в группе без ССО ($p=0,012$, $\chi^2=6,28$, $OR=2,90$ (1,23 - 6,85)). Аналогичный эффект был получен и для гаплогруппы H1, частота которой в группе с ССО превысила частоту в группе без ССО в 4,6 раза – 20,83% против 4,51% ($p=0,002$, $\chi^2=9,72$, $OR=4,62$ (1,77 - 12,02)).

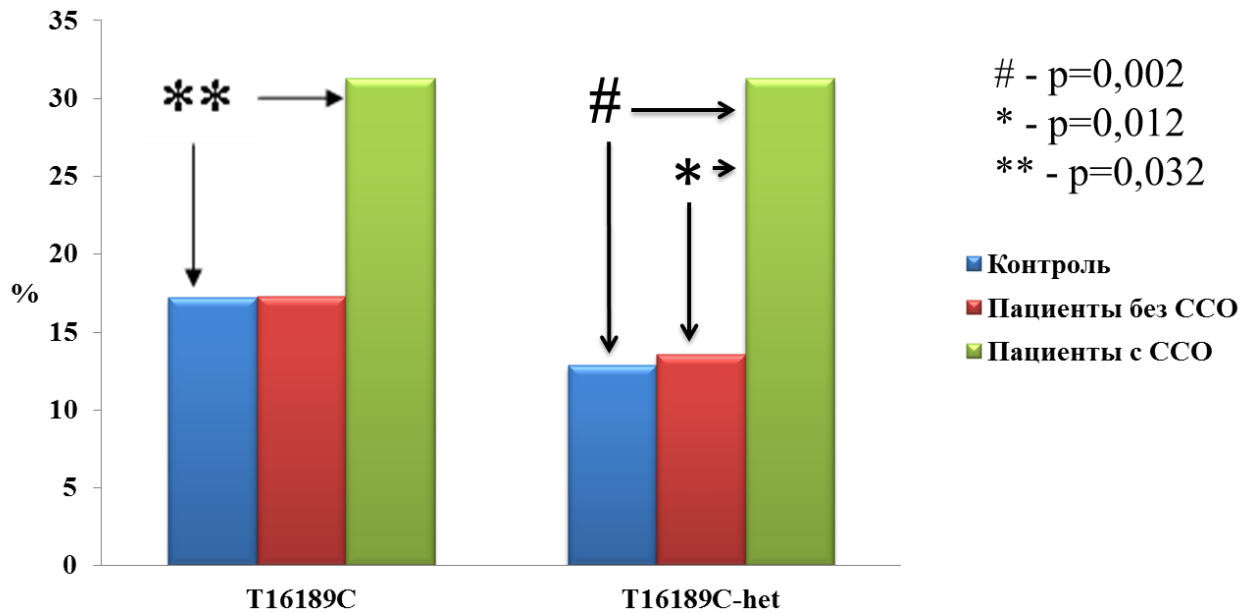


Рисунок 9 – Частоты полиморфных сайтов T16189C и T16189C-het в зависимости от наличия ССО в течение года наблюдения.

Кроме того, частота этого же полиморфного сайта T16189C, но без гетероплазмии, также значительно отличалась от частоты соответствующего сайта в контрольной выборке ($p=0,032$, $\chi^2=9,89$, $OR=3,09$ (1,47 - 6,42)) (Рисунок 9).

Анализ ассоциаций с Q-инфарктом

Сравнение частот гаплогрупп и полиморфных вариантов проводили в подгруппах больных с наличием или отсутствием Q-инфаркта, на основании регистрации патологического зубца Q электрокардиографии сердца, который указывает на глубокое поражение миокарда. Данные представлены в Таблице 8.

В результате анализа показана ассоциация гаплогруппы U4 с Q-инфарктом ($p=0,016$), которая встречалась в этой подгруппе пациентов с частотой 5,56%. Причем в другой группе данная гаплогруппа не встречалась вообще. В отношении частот других гаплогрупп и полиморфных сайтов, а также при сравнении с контрольной выборкой значимых отличий не выявлено.

Анализ ассоциаций с мультифокальным атеросклерозом

Сравнительный анализ частот гаплогрупп был проведен между двумя группами пациентов в зависимости от наличия у них стеноза больше 30% либо только коронарного бассейна (коронарный атеросклероз (КА)), либо поражения двух и более сосудистых бассейнов организма (мультифокальный атеросклероз (МФА)). Данные представлены в Таблице 8.

В ходе анализа не было показано значимых отличий в частотах гаплогрупп между группами с коронарным атеросклерозом и МФА. В то же время в обеих подгруппах были выявлены различия при сравнении с контрольной выборкой (рисунок 10).

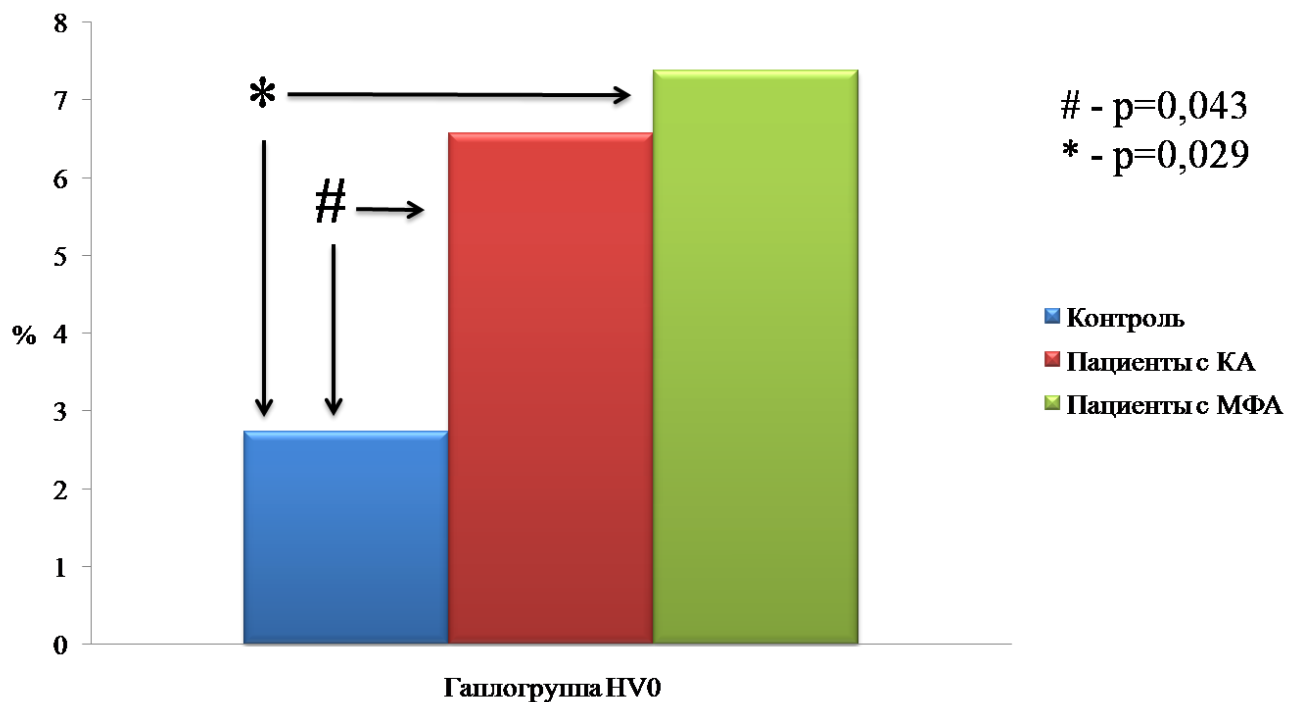


Рисунок 10 – Частоты гаплогруппы HV0 в исследуемых выборках.

В группе с МФА гаплогруппа HV0 регистрировалась чаще по сравнению с контрольной выборкой – 7,38% и 2,73%, соответственно ($p=0,029$, $\chi^2=4,73$, $OR=2,84$ (1,09 - 7,40)). Гаплогруппа HV0 достоверно чаще, чем в контроле, встречалась и в группе с коронарным атеросклерозом – 6,57% ($p=0,043$, $\chi^2=4,08$, $OR=2,50$ (1,02 - 6,20)).

Анализ ассоциаций с сахарным диабетом

Сравнительный анализ проводили путем разделения группы больных с ОКС на подгруппы с наличием сахарного диабета 2 типа и его отсутствием. После разделения на подгруппы проводили сравнение частот гаплогрупп и полиморфных сайтов, как между больными, так и по отдельности с контрольной выборкой.

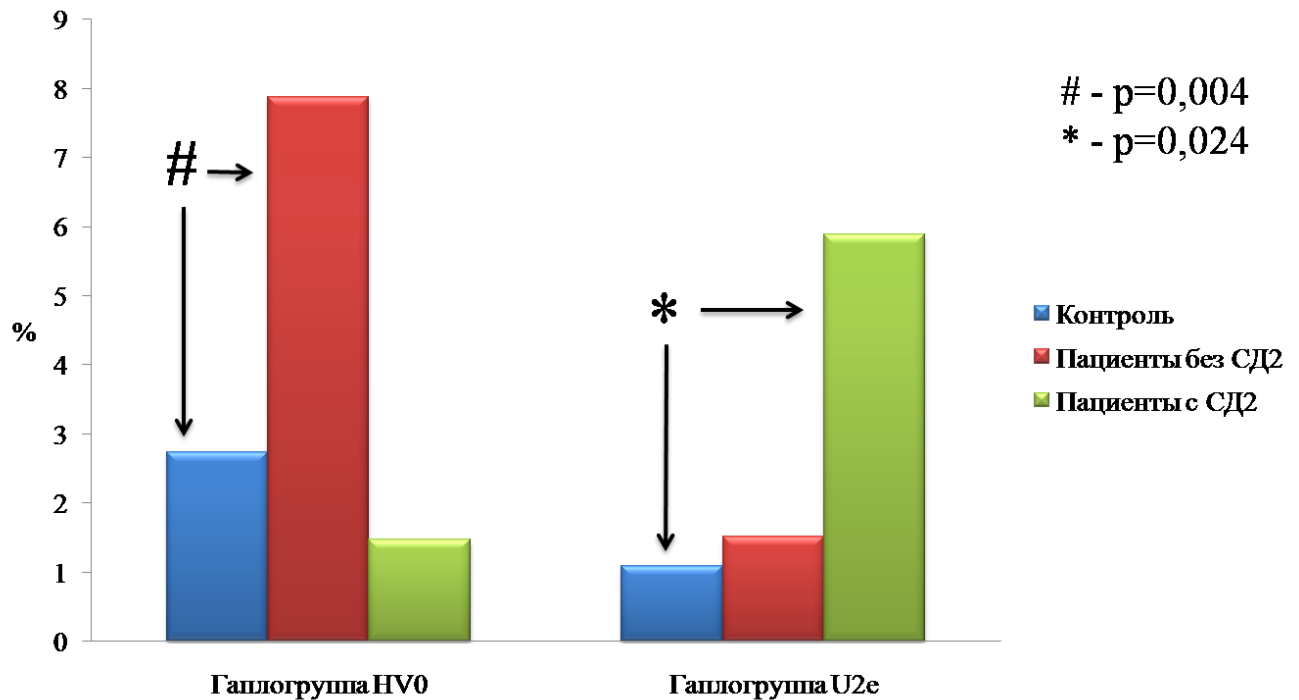


Рисунок 11 – Частоты гаплогрупп HV0 и U2e в исследуемых выборках.

При анализе частот между группами больных с СД2 и без СД2 не найдено значимых отличий. Пограничное значение уровня значимости наблюдалось только для гаплогруппы U2e ($p=0,050$). При сравнении группы больных с ОКС с наличием СД2 и контрольной группой было выявлено значимое отличие в частоте гаплогруппы U2e ($p=0,024$, $\chi^2=4,86$, $OR=5,66$ (1,15 - 27,73)). При сравнительном анализе группы больных без СД2 с контрольной выборкой показано значимое отличие в частоте встречаемости другой гаплогруппы – HV0. Так частота HV0 в контрольной выборке составила 2,73%, а в группе больных без СД2 – 7,88% ($p=0,004$, $\chi^2=8,35$, $OR=3,04$, (1,38 - 6,87)) (Рисунок 11) [Салахов и др., 2015].

Таким образом, полученные данные позволяют нам предположить, что ряд гаплогрупп, характерных для европеоидных популяций, и полиморфные варианты мтДНК ассоциированы с острым коронарным синдромом и его осложнениями.

Полиморфный вариант T16189C известен как фактор риска для сахарного диабета 2 типа, как было показано в европеоидных и монголоидных популяциях [Poulton et al., 2002; Ye et al., 2013; Park et al., 2008; Liou et al., 2010]. Есть также данные об ассоциации данной замены и полицитозинового тракта с коронарным атеросклерозом [Abu-Amero et al., 2010, Mueller et al., 2011] и метаболическим синдромом [Weng et al., 2005; Palmieri et al., 2011]. Существует гипотеза о том, что вариант T16189C способствует снижению аффинности с белком mtSSB, который участвует в стабилизации D-петли и поддержании мтДНК. [Park et al., 2008]. Наличие данной замены и, как следствие, образование полицитозинового тракта, приводит к снижению репликации мтДНК и снижению количества копий, поскольку недалеко расположен один из сайтов инициации репликации. Кроме того, если на участке 16184-16193 происходит вторая мутация наряду с заменой T6189C, приводящая к разрыву полицитозинового тракта, то в таком случае репликация характеризуется нормальным значениям [Liou et al., 2010]. Приведенные факты свидетельствуют о том, что, несмотря на локализацию в некодирующей части митохондриального генома и значительный уровень распространенности в популяции (>10%), полиморфизм T16189C может иметь функциональное значение. Уменьшение числа копий мтДНК должно вести к снижению белкового синтеза и угнетению основной функции митохондрий, что является неблагоприятным фактором, в том числе для состояния сердечно-сосудистой системы.

Другой полиморфизм в некодирующей области мтДНК, для которого в нашем исследовании выявлена ассоциация с ранним инфарктом миокарда – это замена T16519C. Этот полиморфизм примечателен тем, что локализован вне гипервариабельных сегментов D-петли мтДНК, но тем не менее является одним из наиболее часто мутирующих сайтов в митохондриальном геноме человека. Это также, пожалуй, первый полиморфизм, для которого была выявлена связь с

фенотипами сердечно-сосудистой системы: уровнем триглицеридов [Hegele et al., 1997] и артериальным давлением [Фрейдин и др., 1999]. Функциональное значение этого сайта может быть обусловлено связыванием регуляторных белков.

Гаплогруппа U, в том числе ее ветвь U5, определяется несколькими заменами, которые могут иметь функциональное значение. Замена A12308G (U) расположена в гене тРНК лейцина, а T3197C (U5) – в гене 16S РНК митохондрий. Транзиция G9477A, также определяющая гаплогруппу U5, находится в гене цитохром С оксидазы и приводит к замене консервативной аминокислоты валина в 91 позиции на изолейцин. В различных линиях гаплогруппы U5 произошли также аминокислотные замены в гене цитохрома b (III комплекс дыхательной цепи) [Montiel-Sosa et al., 2006]. Есть данные, свидетельствующие о критическом значении комплекса III дыхательной цепи в развитии нарушений после ишемии: в эксперименте с моделированием инфаркта миокарда на крысах было показано снижение содержания белков комплекса III на 46% и снижение активности на 26%, также увеличение выработки H_2O_2 комплексом III в три раза и 60% снижение содержания цитохрома С по сравнению с контролем; в итоге все изменения в работе комплексов III и IV приводили к снижению сократительной активности миокарда в виде уменьшения фракции выброса [Heather et al., 2010]. Существует ряд исследований, показавших, что замена A12308G в гене тРНК лейцина может быть ассоциирована с риском инсульта [Pulkeset al., 2000; Majamaa et al., 1997]. При исследовании группы пациентов, несущих макроделецию мтДНК, было показано увеличение частоты замены A12308G, которая была ассоциирована с более высоким риском развития пигментной дегенерацией сетчатки, низкорослостью, дисфазией-дизартрией и дефектами сердечной проводимости [Crimi et al., 2003]. Таким образом, если полиморфизмы мтДНК в составе гаплогрупп U и U5 снижают активность комплексов дыхательной цепи, то это может быть причиной ассоциации с более низким значением фракции выброса во время ишемии и реперфузии при инфаркте миокарда. С другой стороны, меньшая активность дыхательной цепи в норме связана с более низкой выработкой АФК. Это может объяснять «протективный»

эффект гаплогруппы U5 в отношении раннего инфаркта [Mueller et al., 2011] и ее ассоциацию с более высоким уровнем глюкозы (что при инфаркте миокарда является благоприятным фактором) [Голубенко и др., 2015].

Гаплогруппа U2e распространена в популяциях с невысокой частотой и характеризуется целым рядом нуклеотидных замен, в том числе полиморфизмом T16189C и заменой A1811G в гене 16S РНК. Кроме того, мтДНК этой гаплогруппы несут замену A15907G в гене тРНК треонина, в сайте узнавания аминоксил-тРНК-синтазы, и замену C6045T в гене цитохром оксидазы, которая ведет к использованию другой тРНК для включения в белок аминокислоты лейцина в этом положении: тРНК Leu(UUR) вместо тРНК Leu(CUN). Ген тРНК Leu(UUR) является «горячей точкой» для мутаций, приводящих к развитию некоторых митохондриальных синдромов. Совокупность замен в генах аппарата белкового синтеза митохондрий, совместно с транзицией T16189C, влияющей на число копий мтДНК, могут объяснять ассоциацию этой гаплогруппы с ранним инфарктом миокарда.

Гаплогруппы H и HV0 являются крупными ветвями «западно-евразийского» кластера HV, который определяется полиморфизмом T14766C (аминокислотной заменой Thr7Ile в гене цитохрома b). В дополнение к этому, большинство линий гаплогруппы HV0 несут транзицию C15904T в гене тРНК треонина (в том же сайте узнавания аминоксил-тРНК-синтазы, что и замена в U2e). Среди частых европейских гаплогрупп, гаплогруппа H проявляет наиболее консервативную аминокислотную последовательность и показывает наибольшую активность окислительного фосфорилирования и эффективность сопряжения дыхательной цепи; при этом она характеризуется малыми потерями тепла и высокими значениями АФК по сравнению с другими гаплогруппами. Тем самым принадлежность мтДНК к гаплогруппе H способствует более высокой выработке АТФ, но за счет высокого выделения АФК она может быть ассоциирована с преждевременным старением [Martinez-Redondo et al., 2010]. Для гаплогруппы H характерна замена G2706A в гене 16S РНК. Ее подгруппа H1, в свою очередь, определяется дополнительной заменой G3010A в этом же гене. Возможно,

комбинированный эффект этих вариантов отвечает за выявленную нами ассоциацию гаплогруппы H1 с сердечно-сосудистыми осложнениями в течение года наблюдения после инфаркта [Голубенко и др., 2015].

Таким образом, можно говорить о роли полиморфизма мтДНК в определении некоторых прогностически важных проявлений атеросклероза: возраст первого инфаркта, снижение сократимости миокарда при инфаркте, риск повторных сердечно-сосудистых событий. В качестве неблагоприятных генотипов можно рассматривать гаплогруппу H1 как фактор риска развития осложнений в течение года, гаплогруппу U как ассоциированную с низким значением фракции выброса левого желудочка, гаплогруппу U2e и вариант 16189C - как фактор риска раннего инфаркта и дальнейших осложнений. В то же время, гаплогруппа U5 реже встречалась у пациентов с ранним инфарктом. Полученные результаты указывают на значимый вклад вариантов митохондриального генома в развитие атеросклеротического процесса, обусловленный, вероятно, влиянием вариантов мтДНК на интенсивность окислительного фосфорилирования и образования активных форм кислорода в митохондриях.

3.1.3 Анализ ассоциаций гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК с количественными признаками

В качестве признаков характеризующих состояние сердечно-сосудистой системы были выбраны следующие количественные показатели: САД, ДАД, ОХ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, ТГ, глюкоза при поступлении и натощак, толщина комплекса интима-медиа, фракция выброса левого желудочка.

В популяционной группе анализ проводили как в общей группе, так и отдельно в группах женщин и мужчин. Расчет проводился с применением однофакторного анализа для признаков соответствующих нормальному распределению, так и с применением критерия Манна-Уитни – в иных случаях.

Анализ ассоциаций количественных признаков в контрольной выборке

Анализ распределения значений количественных признаков в зависимости от генотипа мтДНК показал ассоциацию гаплогруппы Н (вкл. Н1) с ИМТ, гаплогруппы Н со уровнями триглицеридов в сыворотке крови, ДАД и ИМТ, гаплогруппы U с уровнем общего холестерина и САД, полиморфного варианта T16519C с уровнем триглицеридов. В подгруппе мужчин показана только одна ассоциация полиморфного сайта T16519C с ТГ. В группе женщин с ОКС выявили ассоциации уровня ИМТ с гаплогруппой Н (вкл. Н1), ТГ и ИМТ с гаплогруппой Н, и общего холестерина с гаплогруппой U (Таблица 9).

Таблица 9 – Ассоциации гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК с количественными признаками в контрольной выборке в зависимости от пола

Группа	Гаплогруппа	Количеств. признак	Генотип, (n)		p
Общая	Н (вкл. Н1)	ИМТ, кг/м ²	«+» (n=121)	«-» (n=171)	0,009
			25,32 ± 4,37	26,62 ± 4,43	
	Н	ТГ, ммоль/л	«+» (n=82)	«-» (n=188)	0,011
			1,29 ± 0,65	1,48 ± 0,71	
		ДАД мм.рт.ст.	«+» (n=103)	«-» (n=263)	0,019
			79,23 ± 12,15	82,40 ± 12,16	
		ИМТ, кг/м ²	«+» (n=87)	«-» (n=205)	0,019
			25,17 ± 4,16	26,47 ± 4,52	
	U	ОХ, ммоль/л	«+» (n=93)	«-» (n=253)	0,040
			6,13 ± 1,37	5,79 ± 1,39	
		САД, мм.рт.ст.	«+» (n=102)	«-» (n=263)	0,016
			123,76 ± 20,16	127,60 ± 18,19	
Мужчины	T16519C	ТГ, ммоль/л	T (n=115)	C (n=155)	0,003
			1,28 ± 0,59	1,53 ± 0,75	
Женщины	T16519C	ТГ, ммоль/л	T (n=47)	C (n=49)	0,025
			1,10 ± 0,37	1,35 ± 0,58	
	Н (вкл. Н1)	ИМТ, кг/м ²	«+» (n=75)	«-» (n=118)	0,024
			25,59 ± 4,73	26,95 ± 4,32	
		ТГ, ммоль/л	«+» (n=50)	«-» (n=124)	0,039
			1,38 ± 0,75	1,59 ± 0,76	
	Н	ИМТ, кг/м ²	«+» (n=54)	«-» (n=139)	0,029
			25,32 ± 4,37	26,84 ± 4,52	
Женщины	U	ОХ, ммоль/л	«+» (n=72)	«-» (n=153)	0,031
			6,27 ± 1,41	5,85 ± 1,46	

Примечание – p –уровень значимости.

Анализ ассоциаций количественных признаков в группе пациентов с ОКС

Оценка вклада гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК в фенотипические значения количественных признаков была проведена как в выборке больных, так и при разделении их на подгруппы в зависимости от пола, наличия сахарного диабета, и раннего инфаркта. Анализ сравнения значений количественных признаков в группе больных с ОКС показал наличие ассоциаций гаплогруппы Н (вкл. Н1) и полиморфного сайта Т16519С с ИМТ, а также гаплогруппы U с толщиной КИМ (Таблица 10).

При разделении выборки больных по полу в группе мужчин показана ассоциация гаплогруппы Н (вкл. Н1) с ИМТ, и гаплогруппы U с толщиной КИМ. В группе женщин показана ассоциация полиморфного сайта Т16519С с ИМТ. Кроме того, у женщин с ОКС выявлена ассоциация с уровнем глюкозы при поступлении (Таблица 10) [Салахов и др., 2014].

При разделении выборки в зависимости от наличия или отсутствия сахарного диабета 2 типа было выявлено несколько ассоциаций в этих подвыборках. Так в группе больных с ОКС без сахарного диабета была получена ассоциация с ИМТ гаплогруппы Н (вкл. Н1), а также с толщиной КИМ – гаплогруппы U. Для гаплогруппы Н и полиморфного сайта Т16519С не было показано ни одной ассоциации с количественными признаками (Таблица 11).

При анализе фенотипической изменчивости количественных признаков в группе больных с СД2 была показана только одна значимая ассоциация – с уровнем глюкозы натощак (Таблица 11) [Салахов и др., 2015].

Следующим этапом анализа стало разделение группы больных с ОКС на подгруппы в зависимости от возраста первого инфаркта. В группе с поздним инфарктом была выявлена ассоциация гаплогруппы U с уровнем глюкозы натощак и фракцией выброса. В отношении других количественных признаков ни гаплогруппа U, ни другие гаплогруппы не показали значимых ассоциаций. Группа больных с ОКС ранним инфарктом не показала ни одной ассоциации с количественными признаками.

Таблица 10 – Ассоциации гаплогрупп и полиморфных сайтов мтДНК с количественными признаками в зависимости от пола больных с ОКС

Группа	Гаплогруппа	Количеств. признак	Генотип, (n)		p
Общая	Н (вкл. Н1)	ИМТ, кг/м ²	«+» (n=138)	«-» (n=246)	0,025
			27,74 ± 5,04	28,71 ± 4,47	
	U	КИМ, мм	«+» (n=83)	«-» (n=252)	<0,001
			1,18 ± 0,15	1,25 ± 0,13	
	T16519C	ИМТ, кг/м ²	T (n=161)	C (n=223)	0,034
			27,77 ± 4,28	28,79 ± 4,95	
Мужчины	Н (вкл. Н1)	ИМТ, кг/м ²	«+» (n=175)	«-» (n=100)	0,020
			28,03 ± 4,11	26,90 ± 4,14	
	U	КИМ, мм	«+» (n=52)	«-» (n=189)	<0,001
			1,18 ± 0,16	1,25 ± 0,13	
Женщины	Н	Глюкоза при поступлении, ммоль/л	«+» (n=96)	«-» (n=290)	0,045
			1,38 ± 0,75	1,59 ± 0,76	
	T16519C	ИМТ, кг/м ²	T (n=43)	C (n=66)	0,026
			28,79 ± 4,42	31,19 ± 5,87	

Примечание – p –уровень значимости.

Таблица 11 – Ассоциации гаплогрупп мтДНК с количественными признаками в подгруппах больных в зависимости от наличия или отсутствия СД, раннего или позднего инфаркта

Группа	Гаплогруппа	Количеств. признак	Генотип		p
			+	-	
нет СД2	Н (вкл. Н1)	ИМТ, кг/м ²	«+» (n=117)	«-» (n=203)	0,016
			27,21 ± 4,85	28,39 ± 4,54	
	U	КИМ, мм	«+» (n=66)	«-» (n=215)	<0,001
			1,18 ± 0,15	1,25 ± 0,13	
с СД2	Н (вкл. Н1)	Глюкоза натощак, ммоль/л	«+» (n=14)	«-» (n=19)	0,029
			7,70 ± 3,05	9,63 ± 2,29	
поздний ИМ	U	Глюкоза натощак, ммоль/л	«+» (n=34)	«-» (n=80)	0,046
			7,24 ± 2,59	6,27 ± 2,02	
		ФВ, %	«+» (n=65)	«-» (n=180)	0,032
			46,25 ± 10,87	49,41 ± 9,92	

Примечание – p –уровень значимости.

Индекс массы тела является важным количественным показателем избыточной массы тела и фактором риска заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета 2 типа [Vazquez et al., 2007; Wormser et al., 2011; Wells, Cole, 2014]. Генетические факторы объясняют порядка 40-70% дисперсии ИМТ [Hebebrand et al., 2013]. В нескольких исследованиях было показано, что ИМТ больше коррелирует между матерями и их потомством, чем между отцами и их потомством [Sorensen et al., 1998; Magnusson, Rasmussen, 2002]. Это указывает на возможный вклад вариантов мтДНК, передающихся по материнской линии, в изменчивость ИМТ. Так, в европейской популяции была показана ассоциация гаплогруппы Х с ИМТ [Yang et al., 2011]. В нашем исследовании мы выявили ассоциации гаплогрупп мтДНК с ИМТ как в контрольной выборке, так и в выборке больных с ОКС: гаплогруппа Н (вкл. Н1) показала значимые ассоциации с ИМТ. При оценке значений ИМТ, в группах, разделенных по половому признаку, мы получили ассоциации только у женщин в контрольной выборке, и у мужчин в выборке больных. Аналогичную ассоциацию гаплогруппы Н (вкл. Н1) мы получили и подгруппе больных без СД2. Кроме того, значимые отличия были получены для гаплогруппы Н у женщин с ОКС. Средние значения ИМТ в группах включающих гаплогруппы Н и (Н+Н1) были ниже по сравнению с остальными гаплогруппами, за исключением группы мужчин с ОКС, у которых значения ИМТ были выше, чем в сравниваемой группе. В ряде исследований также было показано, что значения ИМТ у мужчин выше, чем у женщин [Murphy et al., 2006; Canoy et al., 2007; Hotchkiss et al., 2013]. Однако в последнее время все чаще встречается информация о том, что повышенные значения ИМТ, а соответственно и избыточный вес, проявляют защитный эффект в отношении смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [Yusuf et al., 2005; Taylor et al., 2010; Niedziela et al., 2014; Rao et al., 2015].

Уровень глюкозы, наряду с ИМТ, является еще одним ключевым показателем метаболических изменений при сердечно-сосудистой патологии и сахарном диабете 2 типа. Показано, что уровень глюкозы при поступлении в стационар при инфаркте миокарда является прогностическим фактором, как в

отношении госпитальной летальности, так и для отдаленного постинфарктного периода [Каретникова и др., 2012; Seferović et al., 2014]. Кроме того, наличие сахарного диабета само по себе является фактором риска дальнейших осложнений инфаркта миокарда. Стрессорная гипергликемия, возникающая во время острой фазы инфаркта миокарда, является следствием выброса стрессовых гормонов (в частности, глюкокортикоидов и адреналина), повышающих уровень глюкозы в крови. При наличии сахарного диабета (нарушенной толерантности к глюкозе) такое повышение вызывает нежелательные последствия: например, высокий уровень глюкозы усиливает окислительный стресс в эндотелии. С другой стороны, гаплогруппа Н, ассоциированная с более высокими значениями уровня глюкозы у диабетиков при инфаркте миокарда, характеризуется более высокой интенсивностью продукции АТФ и активных форм кислорода, по сравнению с гаплогруппами L и J, а также более высоким уровнем окислительного повреждения митохондрий [Martinez-Redondo et al., 2010; Kenney et al., 2013; Kenney et al., 2014], т.е. тоже способствует окислительному стрессу. Ранее было показано, что гаплогруппа Н и ее подгруппа Н1 ассоциированы с инфарктом миокарда [Жейкова, 2013; Palacín et al., 2011].

Следует отметить, что нами не выявлена ассоциация полиморфизма T16189C с сахарным диабетом 2 типа, которая ранее была найдена в популяциях различного этнического происхождения [Park et al., 2008; Aral et al., 2011; Mueller et al., 2011; Palacín et al., 2011]. Причиной может быть небольшая численность исследованной нами выборки пациентов с сахарным диабетом, не позволяющая выявить малые эффекты.

Толщина комплекса интима-медиа является предиктором развития ишемической болезни сердца и цереброваскулярных заболеваний, и используется в качестве раннего клинического количественного показателя развития атеросклероза [Chambless et al., 2000; Iglesias del Sol et al., 2003; Rosvall et al., 2005; Weber et al., 2015]. Европейское общество кардиологов и государственные руководства АСС/АНА 2010 г. рекомендовали использовать толщину КИМ (Класс Па; доказательный) для дальнейшей оценки раннего или промежуточного

риска у больных [Perk et al., 2012]. В ходе мета-анализа оценки роли КИМ на риск развития сердечно-сосудистой патологии было показано, что увеличение абсолютного значения толщины КИМ на 0,1 мм от нормальных значений приводит в будущем к увеличению риска ИМ на 10%–15%, а инсульта – 13%–18% [Lorenz et al., 2007]. Кроме того, есть данные, что у пациентов с сахарным диабетом 2 типа толщина КИМ увеличена по сравнению с контрольной группой, что приводит к росту риска развития инфаркта или инсульта на 40% [Brohall et al., 2006]. В нашей работе средние значения толщины КИМ у больных с ОКС были выше нормы. Однако значимые отличия в толщине были характерны для гаплогруппы U в целом в выборке и в подгруппе мужчин. Причем значения толщины КИМ в гаплогруппе U были ниже, чем в остальных гаплогруппах, указывая на протективный эффект гаплогруппы U в отношении развития атеросклероза, что отражается в толщине сосудистой стенки. Аналогичные данные были получены и в подгруппе больных без СД2.

Гиперлипидемия является основным фактором риска ишемической болезни сердца [Dodds, Mills, 1959]. Во время острой фазы инфаркта миокарда происходят изменения в метаболизме липидов. В сыворотке крови происходит увеличение количества триглицеридов и ЛПОНП, а уровни ЛПНП, ЛПВП и ОХ уменьшаются [Pitt et al., 2008]. Липопротеиды играют важную роль во внеклеточном транспорте липидов. Ряд липопротеидов обладают проатерогенными свойствами: ЛПНП и ЛПОНП. В ходе окислительного стресса в митохондриях происходит выработка АФК, что приводит к модифицированию ЛПНП, которые окисляются и затем откладываются в стенке сосудов. Этот процесс приводит к мощному воспалительному процессу. Поглощение макрофагами омЛПНП приводит к образованию пенистых клеток [Balci, 2011]. В свою очередь митохондриальная дисфункция индуцируется гиперхолестеремией, гипергликемией, гипертриглицеридемией и процессами старения [Madamanchi, Runge, 2007; Mercer et al., 2010]. Полученные нами ассоциации гаплогруппы U у женщин с ОКС и в контрольной выборке с более высокими значениями ОХ указывают на наличие связи митохондриальной дисфункции с нарушениями липидного обмена в

организме. Эта цепь событий, возможна, связана с избыточным проникновением холестерина в ГМК и клетки эндотелия и нарушением процесса обратного транспорта холестерина в кровоток из макрофагов [Allen, Graham, 2012], приводя к развитию атеросклеротической бляшки в стенке сосуда. Полученные результаты указывают на вклад полиморфизма митохондриального генома в формирование некоторых фенотипов сердечно-сосудистого континуума. Ассоциации с уровнем глюкозы, холестерина, индексом массы тела показаны для самой распространенной в европейских популяциях гаплогруппы Н, которая характеризуется, по сравнению с другими гаплогруппами, более эффективной работой электронтранспортной цепи, сопряженной с более сильным окислительным стрессом. Помимо ассоциаций гаплогруппы Н, нами получены ассоциации второй по распространенности гаплогруппы U с уровнем глюкозы, фракцией выброса, толщиной комплекса интима-медиа, общим холестерином у больных с ОКС. Эти факторы могут оказывать влияние на течение инфаркта миокарда, в том числе при сахарном диабете 2 типа и риск развития осложнений сердечно-сосудистой системы.

3.2 Анализ полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ*

3.2.1 Характеристика частот полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* в контрольной выборке и у больных с ОКС

Для выявления роли полиморфизма в локусе генов *ТОММ40/АРОЕ* в формировании предрасположенности к ОКС проведена оценка частотного спектра в контрольной выборке и в выборке больных с ОКС полиморфных вариантов *ТОММ40*: rs1160985; rs157580; rs741780; rs2075650; rs8106922, а также *АРОЕ*: rs7259620; rs429358 и rs7412 (Таблица 12). Сравнение частот аллелей и генотипов проводили между контрольной выборкой и общей группой пациентов. Предварительно было проведено сравнение частот генотипов и аллелей в подгруппах мужчин и женщин в обеих выборках, которое не выявило значимых различий.

Таблица 12 – Характеристика сравнения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *TOMM40* и *APOE* в изученных выборках

SNP	Сравниваемые группы (n)	Частоты генотипов						χ^2 , p	Частоты аллелей				χ^2 , p	OR (95% ДИ)
		n	(%)	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
rs1160985 <i>TOMM40</i>		TT		CT		CC			T		C			
	Больные с ОКС (n=436)	115	26,38	202	46,33	119	27,29	1,99	432	49,54	440	50,46	1,99	1,16
	Контроль общий (n=364)	84	23,08	166	45,6	114	31,32	0,369	334	45,88	394	54,12	0,159	(0,95 - 1,42)
rs157580 <i>TOMM40</i>		AA		AG		GG			A		G			
	Больные с ОКС (n=436)	225	51,61	169	38,76	42	9,63	2,4	619	70,99	253	29,01	2,32	1,19
	Контроль общий (n=358)	166	46,37	150	41,9	42	11,73	0,302	482	67,32	234	32,68	0,128	(0,95 - 1,48)
rs2075650 <i>TOMM40</i>		AA		AG		GG			A		G			
	Больные с ОКС (n=437)	273	62,47	138	31,58	26	5,95	1,28	684	78,26	190	21,74	0,58	0,90
	Контроль общий (n=359)	230	64,07	114	31,75	15	4,18	0,527	574	79,94	144	20,06	0,448	(0,70 - 1,16)
rs741780 <i>TOMM40</i>		CC		CT		TT			C		T			
	Больные с ОКС (n=435)	110	25,29	199	45,75	126	28,97	1,16	419	48,16	451	51,84	1,09	1,12
	Контроль общий (n=359)	83	23,12	160	44,57	116	32,31	0,559	326	45,4	392	54,6	0,273	(0,91 - 1,37)
rs8106922 <i>TOMM40</i>		AA		AG		GG			A		G			
	Больные с ОКС (n=437)	137	31,35	197	45,08	103	23,57	5,16	471	53,89	403	46,11	5,19	1,27
	Контроль общий (n=361)	134	37,12	163	45,15	64	17,73	0,076	431	59,7	291	40,3	0,023	(1,04 - 1,55)

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
rs7259620 APOE		AA		AG		GG			A		G			
	Больные с ОКС (n=434)	113	26,04	199	45,85	122	28,11	1,76	425	48,96	443	51,04	1,76	1,15 (0,94 - 1,41)
	Контроль общий (n=354)	81	22,88	160	45,2	113	31,92	0,416	322	45,48	386	54,52	0,185	
rs429358 APOE		CC		CT		TT			C		T			
	Больные с ОКС (n=427)	7	1,64	98	22,95	322	75,41	0,53	112	13,11	742	86,89	0	1,01 (0,75 - 1,37)
	Контроль общий (n=362)	8	2,21	78	21,55	276	76,24	0,768	94	12,98	630	87,02	0,998	
rs7412 APOE		CC		CT		TT			C		T			
	Больные с ОКС (n=437)	382	87,41	52	11,9	3	0,69	*	816	93,36	58	6,64	0,05	1,07 (0,71 - 1,60)
	Контроль общий (n=362)	314	86,74	45	12,43	3	0,83	0,947	673	92,96	51	7,04	0,824	

Примечания – жирным шрифтом выделены значимые отличия; OR – отношение шансов; n – объем выборки; p – уровень значимости; значения критерия χ^2 использованы для сравнения частот аллелей и генотипов в сравниваемых выборках.

Таблица 13 – Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* в изученных выборках

Полиморфизм	Группа	Частота редкого аллеля, (%)	$H_o \pm s. e.$	$H_e \pm s. e.$	D	$\chi^2, d. f. = 1$	P
rs1160985 <i>ТОММ40</i>	Больные с ОКС	T (49,54)	$0,463 \pm 0,024$	$0,500 \pm 0,001$	-0,073	2,344	>0,05
	Контроль	T (45,88)	$0,45,6 \pm 0,026$	$0,497 \pm 0,003$	-0,082	2,428	>0,05
rs157580 <i>ТОММ40</i>	Больные с ОКС	G (29,01)	$0,388 \pm 0,023$	$0,412 \pm 0,013$	-0,059	1,518	>0,05
	Контроль	G (32,68)	$0,419 \pm 0,026$	$0,440 \pm 0,012$	-0,048	0,817	>0,05
rs2075650 <i>ТОММ40</i>	Больные с ОКС	G (21,74)	$0,316 \pm 0,022$	$0,340 \pm 0,016$	-0,072	2,261	>0,05
	Контроль	G (20,06)	$0,318 \pm 0,025$	$0,321 \pm 0,018$	-0,01	0,034	>0,05
rs741780 <i>ТОММ40</i>	Больные с ОКС	C (48,16)	$0,458 \pm 0,024$	$0,499 \pm 0,002$	-0,084	3,056	>0,05
	Контроль	C (45,40)	$0,446 \pm 0,026$	$0,496 \pm 0,004$	-0,101	3,665	>0,05
rs8106922 <i>ТОММ40</i>	Больные с ОКС	G (46,11)	$0,451 \pm 0,024$	$0,497 \pm 0,003$	-0,093	3,772	>0,05
	Контроль	G (40,30)	$0,452 \pm 0,026$	$0,481 \pm 0,007$	-0,062	1,373	>0,05
rs7259620 <i>АРОЕ</i>	Больные с ОКС	A (48,96)	$0,459 \pm 0,024$	$0,499 \pm 0,001$	-0,083	2,958	>0,05
	Контроль	A (45,48)	$0,452 \pm 0,027$	$0,496 \pm 0,004$	-0,089	2,779	>0,05
rs429358 <i>АРОЕ</i>	Больные с ОКС	C (13,11)	$0,229 \pm 0,020$	$0,228 \pm 0,017$	0,007	0,021	>0,05
	Контроль	C (12,98)	$0,216 \pm 0,022$	$0,226 \pm 0,019$	-0,046	0,779	>0,05
rs7412 <i>АРОЕ</i>	Больные с ОКС	T (6,64)	$0,119 \pm 0,016$	$0,124 \pm 0,015$	-0,04	0,689	>0,05
	Контроль	T (7,04)	$0,124 \pm 0,017$	$0,131 \pm 0,016$	-0,051	0,934	>0,05

Примечания – H_e и H_o – соответственно теоретически ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность; s. e. – стандартная ошибка; D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга; d. f. – число степеней свободы; p – уровень значимости.

Для всех полиморфных вариантов было показано соответствие эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга. Все изученные полиморфные варианты гена *ТОММ40*, а также варианты гена *АРОЕ* характеризуются высоким уровнем полиморфизма (Таблица 13).

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей rs1160985 гена *ТОММ40* не показал статистически значимых различий частот аллелей и генотипов между контрольной выборкой и выборкой больных с ОКС.

В результате сравнительного анализа частот генотипов и аллелей rs157580 гена *ТОММ40* не было выявлено значимых отличий между выборками. В подгруппах больных, разделенных по гендерному признаку, а также в общей выборке больных частота аллеля G составила в среднем 29%, в то время как в контрольной выборке частота аллеля G была приблизительно 33%.

При анализе полиморфного варианта rs2075650 гена *ТОММ40* не выявлено значимых отличий в частотах аллелей и генотипов в сравниваемых выборках. Частота редкого аллеля G у больных с ОКС была незначительно выше, чем в контроле – 21,74 и 20,06%, соответственно.

При сравнительном анализе частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs741780 гена *ТОММ40* не выявлено значимых отличий. Частота редкого аллеля C во всех группах варьировала от 44% до 49%.

Сравнительный анализ полиморфного варианта rs8106922 гена *ТОММ40* выявил статистически значимое различие в частотах аллелей между выборкой больных и контрольной выборкой ($p=0,023$, $\chi^2=5,19$). В то же время значимых отличий в частотах генотипов между изучаемыми выборками не наблюдалось, хотя значение уровня значимости было близко к достоверному ($p=0,076$) (Таблица 12) Так, частота аллеля G в общей выборке больных с ОКС составила – 46,11%, в контроле – 40,30%.

В ходе сравнительного анализа полиморфного варианта rs7259620 гена *АРОЕ* значимых отличий в частотах аллелей и генотипов не выявлено. Частота

редкого аллеля А в контрольной выборке составила 45,5%, в выборке больных с ОКС – 48,96%.

В ходе сравнительного анализа полиморфного варианта rs429358 гена *APOE*, кодирующего замену цистеина на аргинин (Cys112Arg) и определяющего E4 изоформу белка *APOE*, значимых отличий частот аллелей и генотипов не выявлено. Частота редкого аллеля С в изучаемых выборках в среднем составила 13%.

Кроме того, при сравнительном анализе полиморфного варианта rs7412 гена *APOE*, кодирующего замену аргинина на цистеин (Arg158Cys) и определяющего E2 изоформу белка *APOE*, также не получены значимые отличия в частотах аллелей и генотипов исследуемых выборок. Частота редкого аллеля Т составила в среднем 7%.

3.2.2 Характеристика политиминового повтора (rs10524523) гена *TOMM40*

В результате фрагментного анализа политиминового повтора гена *TOMM40* были описаны аллели с различной длиной политиминового тракта: от 14 до 40 нуклеотидов, которые были разделены на три подгруппы: 1 – «Короткие фрагменты» – «short» (S) – длиной до 19 нуклеотидов; 2 – «Длинные» – «Long» (L) – от 20 до 29 нуклеотидов; 3 – Очень длинные – «Very long» (VL) – от 30 нуклеотидов.

При сравнении длин полиТ повтора между контрольной выборкой и выборкой больных с ОКС значимых отличий не было выявлено (Рисунок 12). Частоты генотипов и аллелей в исследуемых выборках представлены в Таблице 14.

Таблица 14 – Характеристика частот генотипов и аллелей политиминового повтора гена *ТОММ40*

Группа (n)	Частоты генотипов						χ^2 , p	Частоты аллелей			χ^2 , p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	
	S/S	S/L	S/VL	L/L	L/VL	VL/VL		S	L	VL	
Больные с ОКС (n=425)	101 (23,76)	49 (11,53)	154 (36,24)	11 (2,59)	45 (10,59)	65 (15,29)	1,40 0,924	405 (47,65)	116 (13,65)	329 (38,71)	1,44 0,488
Контроль общий (n=348)	76 (21,84)	39 (11,21)	126 (36,21)	8 (2,30)	34 (9,77)	65 (18,68)		317 (45,55)	89 (12,79)	290 (41,67)	

Примечания – n – объем выборки, p –уровень значимости, значения критерия χ^2 использованы для сравнения частот аллелей и генотипов в сравниваемых выборках.

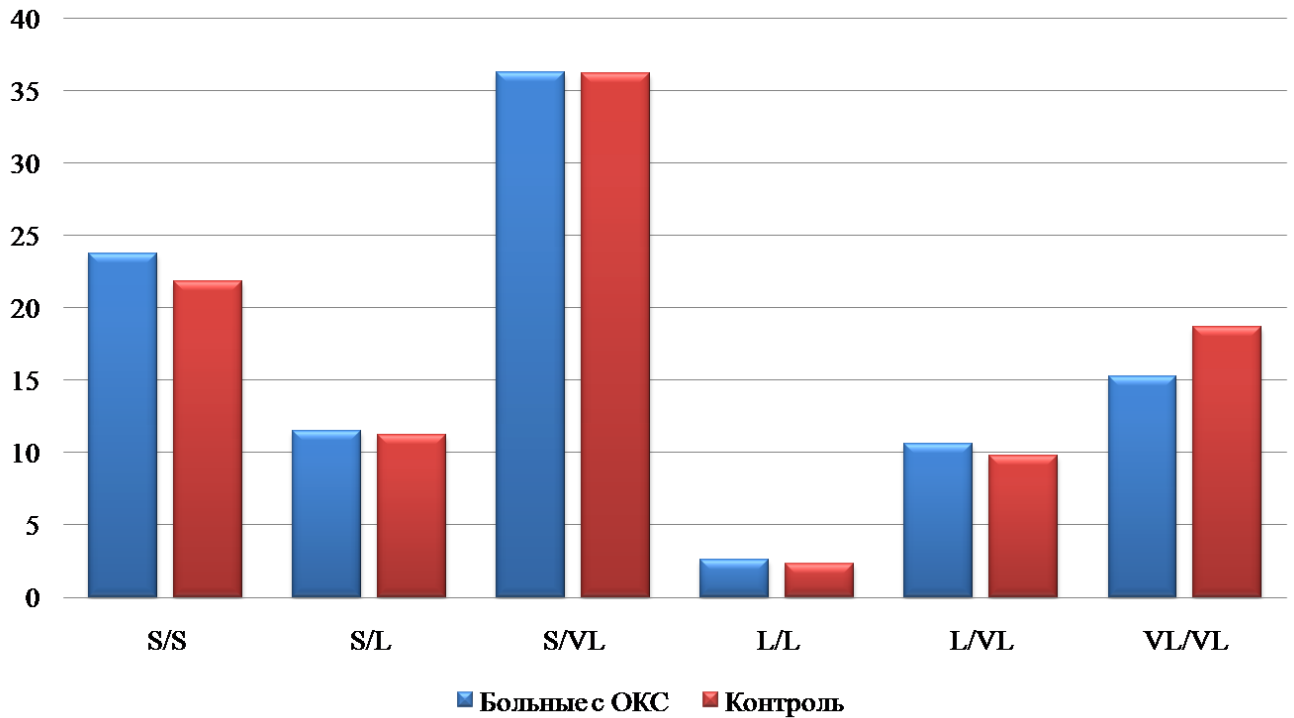


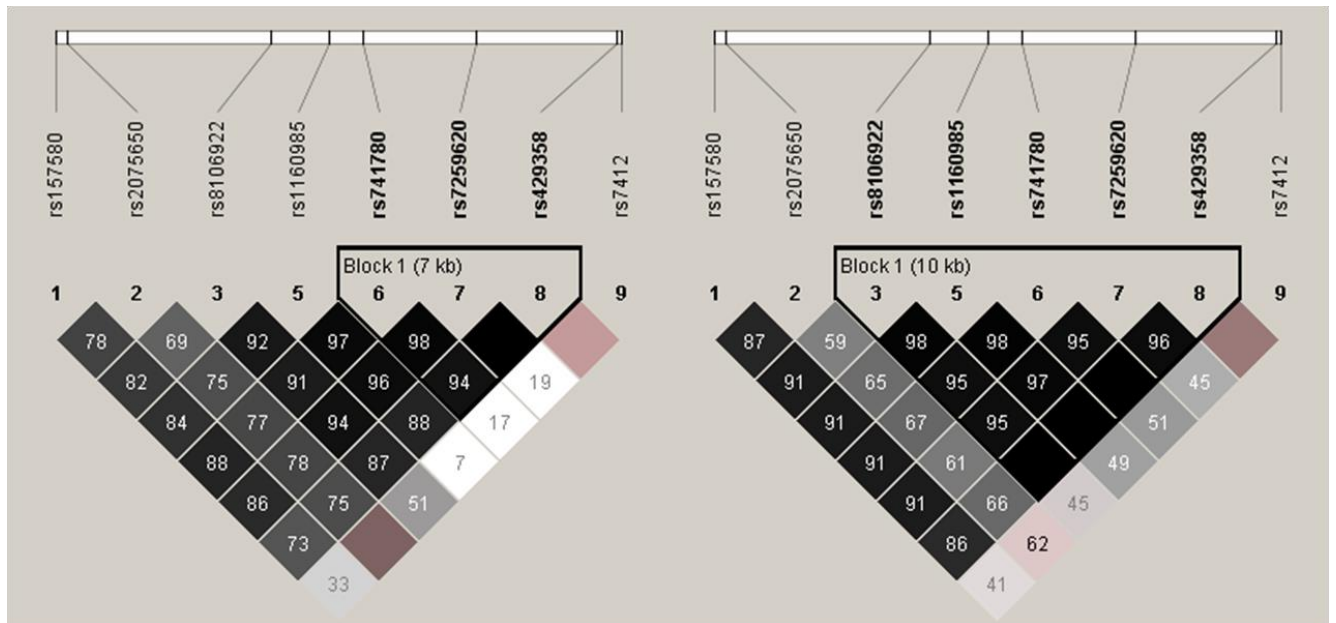
Рисунок 12 – Сравнения частот генотипов полиТ повтора гена *TOMM40* между больными с ОКС и контролем

Для проведения анализа сцепления и поиска ассоциаций с ОКС генотипы данного локуса были преобразованы в зависимости от носительства того или иного аллеля в биаллельные генотипы. Например, для оценки вклада аллеля S в изменчивость эндофенотипов ОКС, имеющиеся 6 вариантов генотипов были обозначены следующим образом: S/S – гомозигота по аллелю S; S/X – гетерозигота по аллелю S, объединяет в себе два варианта генотипов: S/L и S/VL; X/X - включает в себя варианты, не имеющие в своем составе короткого аллеля S: L/L, L/VL и VL/VL. Аналогичным образом преобразование было выполнено и для анализа других аллелей.

3.2.3 Характеристика неравновесия по сцеплению в локусе *ТОММ40/APOE*

Структура неравновесия по сцеплению генов *ТОММ40* и *APOE* в изучаемых выборках имеет картину, характерную для европейских популяций [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>]. На первом этапе были проанализированы все SNP, за исключением полиtimiнового повтора. В исследуемых выборках обнаружен один гаплотипический блок. В контрольной выборке этот блок имел длину 10 кб и включал 5 полиморфных вариантов: rs8106922, rs1160985, rs741780, rs7259620 и rs429358. В выборке больных длина блока составила 6 кб, и он включал три SNP: rs741780, rs7259620 и rs429358 (Рисунок 13). При парном сравнении неравновесия по сцеплению полиморфных вариантов в популяционной выборке все 28 пар показали наличие значимого сцепления. В выборке больных с ОКС было выделено 25 пар сцепления изученных полиморфных вариантов. Неравновесия по сцеплению не было между парами: rs7412-rs1160985, rs7412-rs741780, rs7412-rs7259620. В паре rs2075650–rs7412 коэффициент сцепления по Левонтину D' был близок к 100 у больных с ОКС, что не наблюдалось в контрольной группе.

Для анализа вклада изучаемых полиморфных вариантов в риск развития ОКС с помощью программы «SNPstats» были выявлены 12 наиболее часто встречающихся гаплотипов, из которых 3 были ассоциированы с ОКС (Таблица 15). Так, ассоциация с ОКС была показана для второго по частоте гаплотипа ($p=0,0028$; $OR=1,75$ (1,21-2,53)). Кроме того, данный гаплотип был сцеплен с очень длинным аллелем VL полиtimiнового повтора. Два других гаплотипа, показавших ассоциации с ОКС, встречаются в изученных выборках с частотой 2-2,5% от общей частоты всех гаплотипов. В ходе анализа было установлено, что аллель L варианта rs 10524523 в 95% гаплотипов встречается вместе с $\epsilon 4$ аллелем гена *APOE*.



Больные с ОКС

Контроль

Рисунок 13 – Структура неравновесия по сцеплению генов *TOMM40* и *APOE* в контрольной выборке и больных с ОКС. В клетках указано значение коэффициента сцепления по Левонтину D' (в пустых клетках $D'=1$). Цвет ячеек отображает степень сцепления между SNPs: белые – слабое сцепление ($D' < 1$, $LOD < 2$), светло-серые и серые – среднее сцепление ($D' < 1$, $LOD > 2$), темно-серые и черные – сильное сцепление ($D' = 1$, $LOD > 2$)

Таблица 15 – Анализ ассоциаций гаплотипов полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с риском развития ОКС

№№	rs157580	rs2075650	rs8106922	rs10524523	rs1160985	rs741780	rs7259620	rs429358	rs7412	Частота гаплотипов в общей выборке	OR (95% ДИ)	р
1	A	A	G	S	T	C	A	T	C	0,364	1,00	
2	G	A	A	VL	C	T	G	T	C	0,2483	1,75 (1,21 - 2,53)	0,0028
3	A	G	A	L	C	T	G	C	C	0,0892	1,32 (0,80 - 2,17)	0,280
4	A	G	A	VL	C	T	G	T	C	0,075	1,14 (0,64 - 2,02)	0,660
5	A	A	A	S	C	C	A	T	T	0,0265	6,53 (2,54 - 16,79)	0,0001
6	A	A	A	L	T	T	G	C	C	0,0256	2,31 (0,90 - 5,95)	0,083
7	G	A	A	VL	C	T	G	T	T	0,0231	0,59 (0,22 - 1,57)	0,290
8	A	G	G	S	T	C	A	T	C	0,0197	4,38 (1,51 - 12,73)	0,0067
9	A	A	A	VL	C	T	G	T	C	0,0175	1,54 (0,45 - 5,24)	0,490
10	A	A	A	VL	T	C	A	T	C	0,0163	0,52 (0,15 - 1,82)	0,310
11	A	A	G	S	T	C	A	T	T	0,0123	1,71 (0,40 - 7,33)	0,470
12	G	A	G	S	T	C	A	T	C	0,0121	0,80 (0,22 - 2,89)	0,730
Другие	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,0704	0,72 (0,36 - 1,44)	0,360

Примечания – р –уровень значимости, OR – отношение шансов, 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

3.2.4 Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с количественными признаками

Для оценки состояния сердечно-сосудистой системы в выборке больных с ОКС и контрольной выборке были выбраны следующие количественные показатели: САД, ДАД, ОХ, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, ТГ, глюкоза натощак, значения ИМТ. Кроме того, в выборке больных дополнительно были включены такие показатели как толщина комплекса интима-медиа, значения фракции выброса, а также значения глюкозы при поступлении в стационар.

Поиск значимых ассоциаций проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа для признаков, соответствующих нормальному распределению. В случае ненормального распределения признака или неравенства дисперсий изучаемого признака расчет проводился с применением критерия Краскела-Уоллиса.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов в контрольной выборке.

Анализ ассоциаций значений количественных признаков в контроле проводили как в общей выборке, так и отдельно в подгруппах мужчин и женщин.

В результате анализа вариабельности количественных признаков были выявлены ассоциации полиморфных вариантов rs741780 и rs1160985 с уровнями триглицеридов в общей выборке. Причем наибольшие уровни ТГ были у носителей гетерозиготных генотипов СТ rs741780 и СТ rs1160985. Для полиморфного варианта rs7412 гена *АРОЕ* были показаны ассоциации с уровнями общего холестерина в сыворотке крови ($p=0,001$) и холестерина в составе липопротеидов низкой плотности ($p=0,008$). Наибольшие уровни ОХ и ХС ЛПНП были у носителей гомозиготного генотипа частого аллеля С ($5,99 \pm 1,39$ ммоль/л и $4,07 \pm 1,23$ ммоль/л, соответственно). Кроме того, была выявлена ассоциация с уровнем глюкозы у носителей длинного аллеля L полиморфного варианта rs10524523 гена *ТОММ40* ($p=0,027$). Наибольшие уровни были у носителей аллеля

L rs10524523 ($6,27 \pm 3,09$ ммоль/л) по сравнению с гомозиготой XX rs10524523 ($5,35 \pm 0,77$ ммоль/л) [Салахов и др., 2014].

При анализе количественных показателей в подгруппе мужчин показаны ассоциации с уровнями ХС ЛПНП полиморфных вариантов rs2075650 ($p=0,002$) и rs429358 ($p=0,014$). Значения уровня ХС ЛПНП у носителей аллеля G (GG+GA) rs2075650 ($4,55 \pm 0,97$ ммоль/л) были выше по сравнению с гомозиготами AA ($3,86 \pm 0,98$ ммоль/л). В случае с полиморфным вариантом rs429358 наибольшие значения уровня ХС ЛПНП наблюдались у носителей аллеля C (CC + CT) ($4,57 \pm 1,03$ ммоль/л). Кроме того, для варианта rs429358 была выявлена ассоциация с уровнем ОХ в сыворотке крови ($p=0,013$): носители минорного аллеля C имеют более высокие значения ОХ по сравнению с гомозиготой по аллелю T (Таблица 16).

Помимо ассоциаций с показателями липидного спектра, в подгруппе мужчин были выявлены ассоциации полиморфных вариантов rs2075650 и rs10524523 с уровнями систолического артериального давления ($p=0,049$ и $p=0,009$, соответственно). Так, у носителей аллеля G (GA+GG) rs2075650 отмечались наиболее высокие значения САД по сравнению с другими генотипами. Для варианта rs10524523 наибольшие значения САД отмечались у носителей длинного аллеля L (LL+LX) (Таблица 16).

У женщин из контрольной выборки значимые ассоциации были получены только для показателей липидного спектра. Полиморфный вариант rs8106922 был ассоциирован с уровнями ТГ в сыворотке крови ($p=0,036$). И как и в случае с ассоциациями в общей выборке наибольшие значения наблюдались у носителей гетерозиготного генотипа. Кроме того, были выявлены ассоциации полиморфного варианта rs7412 у женщин с ОХ и ХС ЛПНП ($p=0,002$ и $p=0,006$, соответственно) (Таблица 16).

Таблица 16 – Ассоциации полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с количественными признаками в контрольной выборке

Группа	SNP	Признак	Генотип (n)			p
Общая	rs741780	ТГ, ммоль/л	CC (70)	CT (114)	TT (94)	0,031
			1,33 ± 0,70	1,75 ± 1,38	1,52 ± 0,81	
	rs1160985	ТГ, ммоль/л	TT(69)	CT (118)	CC (90)	0,044
			1,33 ± 0,71	1,73 ± 1,36	1,53 ± 0,82	
	rs7412	ОХ, ммоль/л	CC (295)	CT+TT (48)		0,001
			5,99 ± 1,39	5,30 ± 1,25		
	rs7412	ХС ЛПНП, ммоль/л	CC (225)	CT+TT (38)		0,008
			4,07 ± 1,23	3,51 ± 0,97		
rs10524523	Глюкоза, ммоль/л	XX (61)	LL+LX (17)		0,027	
		5,35 ± 0,77	6,27 ± 3,09			
Мужчины	rs2075650	САД, мм. рт. ст.	AA (76)	GA+GG (45)		0,049
			125,24 ± 13,96	130,76 ± 16,07		
	rs2075650	ХС ЛПНП, ммоль/л	AA (57)	GA±GG (31)		0,002
			3,86 ± 0,98	4,55 ± 0,97		
	rs429358	ОХ, ммоль/л	TT (93)	CC+CT (27)		0,013
			5,55 ± 1,20	6,21 ± 1,25		
	rs429358	ХС ЛПНП, ммоль/л	TT (69)	CC+CT (22)		0,014
			3,97 ± 0,97	4,57 ± 1,03		
rs10524523	САД, мм. рт. ст.	XX(90)	LX+LL (27)		0,009	
		125,43 ± 14,19	134,09 ± 16,87			
Женщины	rs8106922	ТГ, ммоль/л	AA (67)	GA (74)	GG (38)	0,036
			1,60 ± 0,93	2,00 ± 1,58	1,44 ± 0,62	
	rs7412	ОХ, ммоль/л	CC (199)	CT+TT (24)		0,002
			6,09 ± 1,48	5,14 ± 0,94		
	rs7412	ХС ЛПНП, ммоль/л	CC (152)	CT+TT (20)		0,006
			4,02 ± 1,32	3,18 ± 0,90		

Примечания – n – объем выборки, p – уровень значимости.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов в выборке больных с ОКС

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с количественными признаками в выборке больных с ОКС был проведен как в общей выборке, так и при разделении по гендерному признаку. Кроме того, анализ вклада изученных полиморфных вариантов в фенотипическую изменчивость количественных признаков был проведен также с учетом факторов риска сердечно сосудистого континуума: курением, наличием у пациентов артериальной гипертензии и гиперхолестеролемии.

В ходе анализа вариабельности количественных признаков в выборке больных с ОКС показаны ассоциации полиморфного варианта rs2075650 гена *ТОММ40* со значениями ДАД ($p=0,019$), наибольшие значения которого наблюдались у носителей генотипа GG. Помимо этого показана ассоциация варианта rs7412 гена *АРОЕ* с индексом массы тела ($p=0,017$). Наибольшие средние показатели ИМТ были у носителей минорного аллеля Т (Таблица 17).

При разделении выборки больных в зависимости от гендерной принадлежности было установлено, что в подгруппе мужчин значения показателя ИМТ ассоциированы с двумя полиморфными вариантами: rs7412 и rs8106922. В случае ассоциации с полиморфным rs7412 наибольшие уровни отмечались у носителей минорного аллеля Т (СТ+ТТ) ($29,52 \pm 3,94$ кг/м²), а в случае полиморфного варианта rs8106922 наибольшие значения ИМТ отмечались у генотипа АА ($28,38 \pm 4,64$ кг/м²). Для полиморфного варианта rs429358 у мужчин показана ассоциация со значениями ХС ЛПВП ($p=0,037$), относящегося к группе антиатерогенных липидов. Наиболее высокие значения наблюдались у носителей генотипа ТТ (Таблица 17).

Ассоциация полиморфного варианта rs2075650 со значениями диастолического артериального давления показанная в общей выборке, наблюдалась также и у женщин ($p=0,047$). Кроме того, у женщин установлена ассоциация с уровнями ХС ЛПНП в сыворотке крови для варианта rs157580 ($p=0,027$). Наиболее высокие значения ХС ЛПНП наблюдались у гомозигот по редкому аллелю Т ($3,99 \pm 0,75$ ммоль/л) (Таблица 17).

Таблица 17 – Ассоциации полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с количественными признаками в выборке больных с ОКС

Группа	Полиморфизм	Признак	Генотип (n)			p
Общая	rs2075650	ДАД, мм.рт.ст.	AA (270)	GA (138)	GG (26)	0,019
			82,79 ± 14,35	80,76 ± 13,54	89,23 ± 11,37	
	rs7412	ИМТ, кг/м ²	CC (367)	CT+TT (54)		0,017
			28,19 ± 4,61	29,78 ± 4,61		
Мужчины	rs7412	ИМТ, кг/м ²	CC (258)	CT+TT (40)		0,002
			27,35 ± 4,25	29,52 ± 3,94		
	rs429358	ХС ЛПВП, ммоль/л	TT (187)	CT+CC (58)		0,037
			1,09 ± 0,25	1,02 ± 0,22		
	rs8106922	ИМТ, кг/м ²	AA (89)	GA (137)	GG (72)	0,022
			28,38 ± 4,64	27,81 ± 4,64	26,42 ± 3,07	
Женщины	rs2075650	ДАД, мм.рт.ст.	AA (270)	GA (138)	GG (26)	0,047
			82,79 ± 14,35	80,76 ± 13,54	89,23 ± 11,37	
	rs157580	ХС ЛПНП, ммоль/л	AA (59)	GA (42)	GG (9)	0,027
			3,63 ± 1,06	3,13 ± 1,03	3,99 ± 0,75	

Примечания – n – объем выборки, p – уровень значимости.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с количественными признаками в зависимости от факторов риска ССК

В ходе анализа оценки вклада изученных полиморфных вариантов в фенотипическую изменчивость количественных признаков при наличии такого фактора риска как курение была получена ассоциация полиморфного варианта rs2075650 со значениями ИМТ ($p=0,006$). Наиболее высокие значения средних показателей ИМТ наблюдались у носителей генотипа AA по сравнению с остальными генотипами. Кроме того, при анализе было установлено наличие ассоциаций трех полиморфных вариантов: rs741780, rs7259620 и rs10524523 с таким количественным показателем как уровень глюкозы при поступлении в стационар (Таблица 18).

При анализе количественных признаков у пациентов, имеющих артериальную гипертензию, была получена только одна ассоциация полиморфного варианта rs429358 с уровнем ХС ЛПВП ($p=0,028$). Наибольшие значения ХС ЛПВП были у носителей самого распространенного генотипа TT ($1,11 \pm 0,26$ ммоль/л).

У группы пациентов, характеризующихся наличием гиперхолестеролемии, выявлены ассоциации полиморфных вариантов rs741780 ($p=0,027$) и rs1160985 ($p=0,047$) с ИМТ. Наибольшие значения ИМТ наблюдались у носителей гетерозиготных генотипов в обоих случаях: СТ rs741780 ($30,05 \pm 5,60$ кг/м²) и СТ rs1160985 ($30,01 \pm 5,62$ кг/м²). Помимо этого, у лиц с гиперхолестеролемией установлено наличие ассоциаций полиморфного варианта rs10524523 с уровнями глюкозы натощак ($p=0,023$) и ОХ ($p=0,041$).

Таблица 18 – Анализ ассоциации количественных признаков у больных с ОКС при наличии факторов риска сердечно-сосудистого континуума

Фактор риска	Признак	Полиморфизм	Генотип (n)			p
Курение	Глюкоза при поступлении, ммоль/л	rs741780	CC (48)	CT (87)	TT (54)	0,047
			$9,37 \pm 4,63$	$9,42 \pm 4,18$	$7,63 \pm 2,21$	
		rs7259620	AA (50)	AG (85)	GG (54)	0,037
			$9,51 \pm 4,62$	$9,44 \pm 4,21$	$7,63 \pm 2,21$	
		rs10524523	SS (44)	SX (89)	XX (52)	0,013
			$9,26 \pm 4,48$	$9,68 \pm 4,31$	$7,60 \pm 2,23$	
	ИМТ, кг/м ²	rs2075650	AA (118)	AG (56)	GG (13)	0,006
			$29,24 \pm 4,79$	$27,53 \pm 4,47$	$25,79 \pm 3,93$	
Артериальная гипертензия	ХС ЛПВП, ммоль/л	rs429358	CC+CT (73)		TT (217)	0,028
			$1,03 \pm 0,24$		$1,11 \pm 0,26$	
Гиперхолестеролемия	ИМТ, кг/м ²	rs741780	CC (28)	CT (60)	TT (37)	0,027
			$27,33 \pm 4,09$	$30,05 \pm 5,60$	$29,68 \pm 3,62$	
		rs1160985	TT (27)	CT (62)	CC (38)	0,047
			$27,48 \pm 4,46$	$30,01 \pm 5,62$	$29,55 \pm 3,32$	
	Глюкоза натощак, ммоль/л	rs10524523	SS (20)	SX (44)	XX (32)	0,023
			$6,15 \pm 1,98$	$8,43 \pm 3,87$	$7,75 \pm 2,95$	
	ОХ, ммоль/л	rs10524523	SS (24)	SX (56)	XX (37)	0,041
			$5,74 \pm 1,34$	$5,49 \pm 1,06$	$6,21 \pm 1,43$	

Примечания – n – объем выборки, p –уровень значимости.

3.2.5 Анализ ассоциаций частот полиморфных вариантов в зависимости от анамнестических данных и тяжести течения заболевания

Анализ ассоциаций с наличием стенокардии или инсульта в анамнезе

При сравнительном анализе частот полиморфных вариантов в зависимости от наличия или отсутствия у больных с ОКС в анамнезе стенокардии были выявлены значимые различия в частотах полиморфных вариантов rs741780, rs1160985 и rs2075650 гена *ТОММ40* (Таблица 19). Так, гетерозиготные генотипы СТ rs741780 в группе без стенокардии встречались значимо реже, чем в группе больных ОКС со стенокардией в анамнезе, проявляя протективный эффект в отношении развития ОКС ($p=0,026$; 0,59 (0,41 - 0,87)). Для полиморфного варианта rs1160985 ассоциация носила схожий характер. Частота гетерозигот в группе со стенокардией была выше по сравнению с группой без стенокардии в анамнезе ($p=0,029$; 0,60 (0,41 - 0,88)). Значимые отличия в частотах генотипов между группами больных с ОКС с наличием или отсутствием в анамнезе стенокардии были выявлены и для полиморфного варианта rs2075650 ($p=0,020$; 0,30 (0,12 - 0,76)). Гомозиготный генотип GG rs2075650 встречался реже в группе больных с ОКС со стенокардией в анамнезе. Кроме того для полиморфного варианта rs2075650 были получены значимые различия между частотами генотипов в группах больных, имевших или не имевших в анамнезе инсульт ($p=0,031$; OR=0,29 (0,11 - 0,78)). Генотип GG rs2075650 реже регистрировался в группе больных без инсультов в анамнезе, по сравнению с группой с инсультами. Тем самым можно предположить, что генотип GG является фактором риска развития сердечно-сосудистых событий

Анализ ассоциаций со значением класса сердечной недостаточности по шкале Killip

Сравнительный анализ частот генотипов полиморфных вариантов проводили в зависимости от наличия или отсутствия сердечной недостаточности по шкале Killip. В результате анализа были получены значимые различия в

частотах генотипов между группами с классом сердечной недостаточности >1 и группой без сердечной недостаточности для полиморфного варианта rs741780 ($p=0,029$). Доля генотипов, содержащих минорный аллель С, была выше в группе с классом по шкале Killip >1 ($OR=2,39$ ($0,67 - 4,60$)). Аналогичные результаты были получены и при сравнении частот генотипов полиморфного варианта rs7259620 в зависимости от значения класса сердечной недостаточности ($p=0,023$; $OR= 2,23$ ($1,15 - 4,30$)) (Таблица 19).

Анализ ассоциаций с Q-инфарктом

В ходе сравнительного анализа частот генотипов в группах пациентов, имевших или не имевших патологический зубец Q на момент выписки из стационара, получены значимые различия для полиморфного варианта rs7259620 гена *APOE* ($p=0,030$; $OR=1,81$ ($1,14 - 2,87$)). В группе больных с Q-инфарктом частота генотипов, несущих в себе минорный аллель А, встречается чаще, чем в другой группе (Таблица 19).

Полученные данные позволяют предположить, что полиморфные варианты гена *ТОММ40* вносят в развитие сердечно-сосудистой патологии.

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *APOE* не показал значимых ассоциаций с риском раннего инфаркта, МФА, а также риском ССО в течение года после госпитализации.

Таблица 19 – Ассоциации частот полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ* с анамнестическими данными и тяжестью течения заболевания у больных с ОКС

Полиморфизм	Генотип	Признак, n (%)		Р	OR (95% ДИ)
		Стенокардия в анамнезе			
		Есть	Нет		
rs741780	CC	49 (21,97%)	61(28,77%)	7,30 0,026	0,59 (0,41 - 0,87)
	CT	116 (52,02%)	83 (39,15%)		
	TT	58 (26,01%)	68 (32,08%)		
rs1160985	TT	51(22,67%)	63 (29,86%)	7,08 0,029	0,60 (0,41 - 0,88)
	CT	118 (52,44%)	84 (39,81%)		
	CC	56 (24,89%)	64 (30,33%)		
rs2075650	AA	140 (62,22%)	133(62,74%)	0,020	0,30 (0,12 - 0,76)
	AG	65 (28,89%)	73 (34,43%)		
	GG	20 (8,89%)	6 (2,83%)		
		Класс острой сердечной недостаточности по Killip			
		>1	1		
rs741780	CC	22 (29,73%)	88 (24,38%)	7,04 0,029	2,39 (1,24 - 4,60)
	CT	40 (54,05%)	159 (44,04%)		
	TT	12 (16,21%)	114 (31,58%)		
rs7259620	AA	18 (24,66%)	95 (26,32%)	7,58 0,023	2,23 (1,15 - 4,30)
	AG	43 (58,90%)	156 (43,21%)		
	GG	12 (16,44%)	110 (30,47%)		
		Инсульт в анамнезе			
		Да	Нет		
rs2075650	AA	21 (53,85%)	252 (63,31%)	6,93 0,031	0,29 (0,11 - 0,78)
	AG	12 (30,77%)	126 (31,66%)		
	GG	6 (15,38%)	20 (5,03%)		
		Q-инфаркт			
		Есть	Нет		
rs7259620	AA	82 (26,20%)	28 (24,78%)	6,99 0,030	1,81 (1,14 - 2,87)
	AG	154 (49,20%)	43 (38,05%)		
	GG	77 (24,60%)	42 (37,17%)		

Примечания – n – объем выборки, p –уровень значимости, OR – отношение шансов, 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

В нашем исследовании мы выявили ассоциацию полиморфного варианта rs8106922 гена *ТОММ40* с уровнями ТГ в контрольной выборке у женщин: более низкий уровень ТГ был у гомозигот по редкому аллелю G. Сывороточные концентрации липидов (ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ОХ, ТГ) являются факторами, влияющими на риск сердечно-сосудистых заболеваний. Известные на сегодняшний день гены определяют только до 5% дисперсии уровня липидных фракций [Manolio, 2009]. В GWAS при анализе ассоциации уровней липидов с 50 тыс. SNP из 2 тысяч кандидатных генов у американцев европейского и африканского происхождения значения уровней значимости ассоциации rs8106922 с ХС ЛПНП были близки к достоверным [Musunuru et al., 2012]. В исследованиях Roses A. D. и соавт. было продемонстрировано, что данный вариант приводит к разделению на две эволюционно-родственные клады в филогенетическом древе гена *ТОММ40*, причем только в кладе А, определяемой аллелем А встречается аллель *АРОЕ* ε4 в сочетании с длинным полиТ аллелем L [Roses et al., 2010]. Данный факт, возможно, может иметь значение для предрасположенности к ССЗ, поскольку носители аллеля G могут быть менее подвержены атерогенному действию белка АРОЕ4. Структура гаплотипов, полученных нами в настоящем исследовании, подтверждает эти результаты: вариант *АРОЕ* ε4 (rs429358C + rs7412C) сцеплен с L-аллелем политиминового повтора и аллелем А rs8106922 (Таблица 15).

В последнее время во многих исследованиях отмечается наличие ассоциаций полиморфного варианта rs2075650 с уровнями липидов. В ходе выполнения работы мы выявили ассоциацию полиморфного варианта rs2075650 с ХС ЛПНП у мужчин в контроле, причем наибольшие значения наблюдались у носителей редкого аллеля G, что согласуется с данными из других исследований. Так, при анализе липидов у больных с поражением каротидных артерий было показано, что полиморфный вариант rs2075650 ассоциирован с уровнями ХС ЛПНП. Минорный аллель G характеризовался повышенным уровнем этого показателя и риском развития стеноза каротидных артерий [Ronald et al., 2009]. Аналогичные данные об ассоциации полиморфного варианта rs2075650 с ХС

ЛПНП были получены и в ряде полногеномных исследований [Aulchenko et al., 2009; Talmud et al., 2009; Meddelberg et al., 2011]. В исследовании Aulchenko Y. S. и соавт. этот полиморфный вариант был ассоциирован с уровнями общего холестерина и триглицеридов [Aulchenko et al., 2009]. А в исследовании Middelberg R. P. была показана также ассоциация его с уровнем С-реактивного белка, ХС ЛПВП и ТГ [Middelberg et al., 2011]. В японской популяции вариант rs2075650 также был ассоциирован с гипер-ЛПНП-холестеролемией [Abe et al., 2015]. Кроме того, в ряде исследований полиморфный вариант rs2075650 был ассоциирован с продолжительностью жизни. Так, в работе Schurf N. и соавт. показано, что аллель G варианта rs2075650 реже встречается среди долгожителей, и возможно, приводит к снижению продолжительности жизни наряду с $\epsilon 4$ аллелем гена *APOE* [Schupf et al., 2013]. Однако, в другом исследовании, ассоциации варианта rs2075650 с долголетием не установлено и его эффект, по мнению авторов, возможно, связан с умеренным неравновесием по сцеплению с полиморфным вариантом rs429358 гена *APOE* [Deelen et al., 2011]. При поиске ассоциаций полиморфных вариантов с ишемическим инсультом показано, что минорный аллель G rs2075650 оказывает протективный эффект в отношении инсульта [Yamase et al., 2015]. Нами также показано, что данный аллель G реже встречался у пациентов с ОКС имевших в анамнезе инсульт или ТИА. Однако в отношении стенокардии в анамнезе этот аллель имел противоположный эффект. Гомозиготы по аллелю G в 3 раза чаще встречались в подгруппе больных, имевших в анамнезе приступы стенокардии.

Полиморфный вариант rs2075650 ассоциирован и с таким заболеванием как болезнь Альцгеймера. В исследовании при анализе пациентов с БА с атрофией гиппокампа, установлено, что минорный аллель G полиморфного варианта rs2075650 встречался в 2 раза чаще у больных по сравнению с контролем [Potkin et al., 2009]. В другой работе выявлена ассоциация изменений в правом хвостатом теле на МРТ (магнитно-резонансная томография) с этим полиморфным вариантом [Moon et al., 2015].

При анализе ассоциаций полиморфных вариантов гена *ТОММ40* с артериальным давлением было показано, что полиморфный вариант rs2075650 был ассоциирован с уровнями АД как в группе больных, так и в контрольной выборке. Причем в контроле выявлена ассоциация полиморфного варианта rs2075650 с САД у мужчин. В то время как у больных было показано наличие ассоциации с ДАД, как в целом в выборке больных с ОКС, так и в подгруппе женщин. Насколько нам известно в других работах ассоциаций полиморфных вариантов гена *ТОММ40* с значениями артериального давления не было выявлено.

Носительство определенных аллелей полиморфного варианта rs157580 также можно рассматривать как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Мы установили наличие ассоциации варианта rs157580 с более высокими значениями ХС ЛПНП в подгруппе женщин носителей гомозиготного генотипа по редкому аллелю G. В литературе встречаются противоречивые данные о направленности действия аллеля G в отношении уровня липидов. Например, в одном полногеномном исследовании rs157580 связан с более низкими уровнями ХС ЛПНП ($p=2,1 \cdot 10^{-19}$), аналогичный благоприятный профиль был характерен для ТГ и ОХ [Aulchenko et al., 2009]. Похожие данные были в другом исследовании, в котором аллель G был связан с более низкими значениями ХС ЛПНП [Sabatti et al., 2009]. Однако в исследовании, выполненном на двух независимых выборках людей (в США и Дании), было показано что, аллель G связан с более высокими уровнями ТГ по сравнению с генотипом AA в группе больных по сравнению с группой контроля [Jiang et al., 2013]. Похожую зависимость значений ТГ от носительства аллеля G была получена для китайской популяции [Zhang et al., 2011] и для больных с сахарным диабетом 2 типа [Kong et al., 2015]. Кроме того, вариант rs157580 ассоциирован с уровнем липидов у больных с хронической почечной недостаточностью в японской популяции [Hishida et al., 2014].

Нами получена ассоциация полиморфных вариантов rs741780 и rs1160985 с ИМТ у пациентов, имеющих гиперхолестеролемию. Аналогичные ассоциации с ИМТ получены для полиморфного варианта rs2075650, но только у курящих

пациентов. Помимо этого показаны ассоциации rs741780 и rs7259620, а также аллеля S rs10524523 со значениями глюкозы при поступлении у курящих больных. Несмотря на то, что гиперхолестеролемиа и курение являются самостоятельными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [Knight-Lozano et al., 2002; Пузырев и др., 2006], их наличие, возможно, усиливает вариабельность количественных признаков наряду с генетическими факторами.

Для полиморфного варианта rs741780 гена *ТОММ40* характерно наличие ассоциации с болезнью Альцгеймера, при которой он наряду с несколькими вариантами проявляет протективный эффект в отношении БА [Roses et al., 2010; Bekris et al., 2012]. Кроме того, в работе Clark D. С соавт. показано, что у пациентов, принимающих антипсихотические лекарства, при оценке факторов риска развития ССЗ полиморфный вариант rs741780 имеет тренд к наличию ассоциации с ИМТ [Clark et al., 2009].

Мы показали наличие ассоциации варианта rs1160985 с уровнями ТГ в контрольной выборке. Кроме того, данный полиморфный вариант ассоциирован с наличием стенокардии в анамнезе у больных. При поиске общих и отличных генетических компонент, влияющих на уровень липидов у женщин в разных этнических группах населения, было показано наличие ассоциации rs1160985 с ХС ЛПНП у афроамериканцев [Coram et al., 2013]. Аналогичную ассоциацию получила и другая группа исследователей среди афроамериканцев, проводя аналогию с европейскими популяциями и рассматривая полиморфный вариант rs1160985 как потенциально новый значимый SNP в отношении уровня липидов [Lettre et al., 2011]. При анализе вклада полиморфных вариантов в развитие БА rs1160985 не проявлял связи с данной патологией в европейских популяциях [Potkin et al., 2009; Roses et al., 2010]. Противоположные данные были в китайской популяции, где аллель С полиморфного варианта rs1160985 был отнесен к рисковому [Ma et al., 2013; Jiao et al., 2015]. Кроме того, аллель С реже встречался среди долгожителей китайского региона [Lin et al. 2015].

Вклад полиморфного варианта rs7259620 гена *АРОЕ* в развитие различных заболеваний мало изучен. Нами получены ассоциации варианта rs7259620 с

показателями тяжести течения ОКС. Установлено, что редкий аллель А ассоциирован с классом острой сердечной недостаточности и Q-инфарктом. Группа японских исследователей при анализе 260 SNP из области гена *APOE* (200 кб), у пожилых японцев с болезнью Альцгеймера, установила, что ряд полиморфных вариантов ассоциирован с данной патологией (35 SNP). В их числе оказались такие варианты как: rs7259620, rs741780, rs157580, 1160985 и rs429358 [Takei et al., 2009].

В ходе работы получены ассоциации полиморфных вариантов rs429358 и rs7412 с уровнями ОХ и ХС ЛПНП в контрольной выборке. Помимо этого, вариант rs429358 показал ассоциации с уровнем ХС ЛПВП в подгруппе мужчин с ОКС и больных имеющих артериальную гипертензию. Также нами показана ассоциация полиморфного варианта rs7412 с ИМТ. При исследовании генов-кандидатов у пожилого населения с риском развития возраст зависимых заболеваний и состояний было показано наличие ассоциаций с низкими значениями ОХ и ХС ЛПНП с полиморфным вариантом rs7412 [Mazzotti et al., 2014]. В исследовании Smolkova B. и соавторов при изучении факторов риска ССЗ показано, что полиморфные варианты rs7412 и rs429358 были сильно связаны с риском дислипидемий [Smolková et al., 2015]. При исследовании 4660 европейцев без ССЗ полиморфный вариант rs7412 показал ассоциации с такими важными показателями как ИМТ ($p=0,018$), причем наибольшие значения были у носителей генотипа ТТ, что согласуется с нашими результатами. Кроме того, в этом же исследовании показана ассоциация с уровнями ТГ и ОХ как для варианта rs7412, так и для rs429358, которые проявляют независимый эффект в отношении липидов [Tejedor et al., 2014]. Причем вклад данных полиморфных вариантов усиливается при наличии таких факторов риска как курение, употребление насыщенных жиров, артериальной гипертензии [Petkeviciene et al., 2012; Tejedor et al., 2014]. В нашем исследовании эти факторы также вносили вклад в наличие ассоциации изученных вариантов с липидами. В целом полиморфные варианты rs429358 и rs7412 определяющие $\epsilon 2$ - $\epsilon 4$ гаплотипы вносят существенный вклад в

развитие ССЗ. В большинстве исследований Е4 изоформа белка связана с тяжелыми метаболическими состояниями [Sima et al., 2007; Povel et al., 2011].

Полученные данные позволяют предположить, что полиморфные варианты генов *ТОММ40* и *АРОЕ*, а также полиморфизм мтДНК вносят вклад в изменчивость основных количественных признаков сердечно-сосудистой системы: липиды, уровень глюкозы, артериальное давление, толщину КИМ и ИМТ. Кроме того, проведенное исследование установило наличие связи с факторами риска ССЗ и показателями тяжести течения заболевания, а также исходов заболевания с изучаемыми генами и мтДНК.

Все изученные в нашем исследовании полиморфные варианты гена *ТОММ40* являются tagSNP, которые позволяют выявить генетические вариации и ассоциации полиморфизмов с фенотипами без генотипирования большого количества отдельно взятых SNP. Возможно, их значимый вклад в отношении показателей липидного спектра опосредован сцеплением с функционально значимыми SNP в кластере генов кодирующих аполипопротеиды *АРОЕ-АРОС1-АРОС2-АРОС4* и расположенных в непосредственной близости к гену *ТОММ40*. Ген *ТОММ40* расположен рядом с геном *АРОЕ*, что вызывает вопросы о независимом эффекте гена *ТОММ40*. Bekris L. M. и соавторы в своем исследовании показали, что промотор *АРОЕ* находится под значительным влиянием интронов 2-4 гена *ТОММ40*. В свою очередь активность промотора гена *ТОММ40* зависит от интрона 6, в котором находится полиТ повтор. В итоге было сделано предположение, что некоторые регионы гена *ТОММ40* оказывают влияние на промотерную деятельность генов *АРОЕ* и *ТОММ40* in vitro в зависимости от гаплотипа и типа клеток [Bekris et al., 2012].

Два из трех изученных полиморфных вариантов гена *АРОЕ* являются миссенс-заменами: rs429358 и rs7412. Они являются наиболее изученными вариантами, сочетания их генотипов определяют три изоформы белка АРОЕ: Е2, Е3 и Е4. Роль гена АРОЕ в аномалиях уровней липидов в крови и развития сердечно-сосудистых заболеваний реализуется за счет изменения всасывания хиломикронов и липопротеидов очень низкой плотности из кровотока в печень.

Полиморфный вариант rs7412 приводит к дефекту белка АРОЕ, что в свою очередь приводит к повышенным уровням липидов крови. Накопление остатков липидов может привести к появлению раннего поражения коронарных и периферических сосудов [Breslow et al., 1982].

Следует заметить, что из исследованных нами полиморфизмов этого генного кластера, только SNP в гене *ТОММ40* были ассоциированы с повышенным риском развития ОКС. В то же время SNP в гене *АРОЕ* показали ассоциации с изменчивостью количественных признаков (общий холестерол, ЛПНП). При этом статистически значимые различия были выявлены только для двух из трех исследованных SNP - а именно для тех, которые определяют E2, E3 и E4 изоформы белка. Это указывает на независимый эффект гена *ТОММ40* в определении подверженности к развитию острого коронарного синдрома.

В нескольких исследованиях показано, что у нокаутных по гену *АРОЕ* $-/-$ мышей происходит повреждение мтДНК в артериях в циркулирующих клетках крови и других органах при атерогенезе [Ballinger et al., 2002; Mercer et al., 2010; Yu et al. 2013]. Причем повреждение мтДНК происходит на ранних стадиях атерогенеза, когда еще не сформировались атеросклеротические бляшки, предполагая, что повреждения мтДНК могут быть причиной, а не поздним следствием действия АФК и повреждения тканей бляшками. Согласно их результатам, повреждение мтДНК способствует атерогенезу, за счет воздействия на ГМК и увеличения сывороточных липидов [Ballinger et al., 2002; Yu, Bennett, 2014].

В ряде работ было выявлено, что белок АРОЕ4 гена *АРОЕ* ухудшает функцию митохондрий. Так Chang S. с соавторами показали в исследованиях *in vitro*, что гиперэкспрессия укороченного фрагмента АРОЕ4, локализованного в митохондриях, приводит к нарушению функционирования митохондрий [Chang et al., 2005]. На клеточных линиях показано, что АРОЕ4 ингибирует комплексы III и IV по сравнению с нормальным белком, однако на производство АТФ и выживаемость это не влияло [Nakamura et al., 2009].

Белок ТОМ40 играет ключевую роль в функционировании митохондрий. Являясь ключевым элементом транслоказы внешней мембраны митохондрий (ТОМ-комплекс), через который проникает до 99% предшественников митохондриальных белков, белок ТОМ40 жизненно необходим для деятельности митохондрий, что было показано на *S. cerevisiae* [Baker et al., 1990], *C. elegans* [Taylor et al., 2003], мышей [Gottschalk et al., 2014] и культуре клеток человека [Kozjak-Pavlovic et al., 2007]. Нокаутные мыши по гену *ТОММ40* погибают на ранних стадиях эмбриогенеза. А в случае гемизигот наблюдалась увеличенная на 30% смертность по сравнению с нормальными гомозиготами. Кроме того, у этих мышей наблюдалось нарушение сердечной проводимости в начале жизни, а также нарушение эффективности работы комплексов III и IV ко второму году жизни за счет снижения окислительного фосфорилирования [Gottschalk et al., 2014]. Белок ТОМ40 играет важную роль в транспорте амилоида бета, который имеет сродство с ТОМ40 и накапливается в межмембранном пространстве митохондрий, вызывая нарушения их функционирования: нарушение окислительного фосфорилирования [Anandatheerthavarada et al., 2006; Manczak et al., 2006; Rhein et al., 2009], нарушение межмембранного потенциала [Anandatheerthavarada et al., 2006; Cha et al., 2012; Mossmann et al., 2014], нарушение регуляции АФК [Devi et al., 2006; Cha et al., 2012], а также развитие апоптоза [Cha et al., 2012].

Несмотря на то, что механизм атеросклеротического поражения до конца не изучен, несомненным остается факт, что нарушение нормального функционирования митохондрий является одним из важнейших факторов атерогенеза. Исследованные гены *ТОММ40* и *АРОЕ* могут вносить существенный вклад в функционирование митохондрий через механизмы нарушения транспорта необходимых митохондриальных белков и функционирования комплексов дыхательной цепи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проведен анализ ассоциаций 8 полиморфных вариантов в локусе генов *ТОММ40* и *АРОЕ*, а также полиморфизма мтДНК с анамнестическими данными, количественными показателями сердечно-сосудистой системы и осложнениями у больных с острым коронарным синдромом и в контрольной выборке.

Впервые нами получены данные о распространенности полиморфных вариантов гена *ТОММ40* в популяции русских.

При сравнении частот аллелей полиморфных вариантов гена *ТОММ40* в группах больных и контроле нами было показано значимое отличие в частотах аллелей полиморфного варианта rs8109922 между группами больных с ОКС и контролем. Значимые отличия этого же варианта были получены как для генотипов, так и аллелей при сравнении групп мужчин с ОКС и мужчин из контроля. Кроме того, выявлены значимые отличия частот аллелей между подгруппами мужчин с ОКС и мужчин из контроля для rs1160985.

Выявлена ассоциация полиморфных вариантов гена *ТОММ40* с наличием стенокардии (rs741780, rs1160985, rs2075650) и инсультом (rs2075650). Наличие ассоциаций с анамнестическими данными показывает, что учет генетической компоненты может помочь в прогнозировании риска развития повторных сердечно-сосудистых критических состояний.

Кроме того, при оценке тяжести течения заболевания мы сравнили классы острой сердечной недостаточности по шкале Killip (класс первый против остальных классов) в зависимости от генотипов полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ*. В результате сравнения нами были получены ассоциации полиморфных вариантов rs741780 гена *ТОММ40* и rs7259620 гена *АРОЕ* с острой сердечной недостаточностью.

Одним из важных показателей течения ОКС является значение фракции выброса. В нашей работе установлено, что гаплогруппа U мтДНК значимо чаще встречалась в группе с низким значением ФВ. Ее субгаплогруппа U5 имела

пограничные значения уровня значимости со значениями ФВ. Однако при сравнении подгрупп больных, разделенных по наличию раннего или позднего первого инфаркта, гаплогруппа U5 проявила протективный эффект, реже встречаясь у больных с ранним инфарктом. В то же время другая ветвь гаплогруппы U - U2e, была ассоциирована с ранним инфарктом. Помимо этого полиморфный вариант T16189C мтДНК также значимо чаще встречался у пациентов с ранним инфарктом.

Нами получены данные о значимом вкладе полиморфизма мтДНК в развитие сердечно-сосудистых осложнений (повторный инфаркт, инсульт, декомпенсация сердечной недостаточности) в течение года после госпитализации по поводу ОКС. Так, показано, что полиморфный вариант T16189C мтДНК ассоциирован с риском развития ССО. Кроме того, мы провели анализ сравнения встречаемости основного показателя тяжести исхода острого коронарного синдрома: наличие или отсутствие патологического зубца Q на ЭКГ. Полиморфный вариант rs7256920 в гетерозиготном состоянии показал значимую ассоциацию с данным показателем: частота гетерозигот у пациентов с Q-инфарктом была значимо выше, чем у лиц без него. Гаплогруппа U4 мтДНК встречалась с частотой 5,56 % в группе с Q-инфарктом, а в группе без Q-инфаркта не встречалась вообще (статистически значимые различия между выборками по точному критерию Фишера). Также нами показана ассоциация гаплогруппы HV0 мтДНК с ОКС как при коронарном, так и при мультифокальном атеросклерозе.

В нашей работе выявлен ряд ассоциаций полиморфизма генов *ТОММ40*, *АРОЕ* и мтДНК с наиболее важными количественными показателями сердечно-сосудистой системы (липидный профиль, значения уровней глюкозы, САД и ДАД, толщины КИМ, ИМТ). Если роль гена *АРОЕ* в отношении количественных показателей сердечно-сосудистой системы хорошо изучена, то вклад гена *ТОММ40* практически не исследован, за исключением информации в полногеномных исследованиях. Таким образом, мы впервые верифицировали результаты GWAS, указывающие на роль полиморфизма *ТОММ40* в детерминации уровня липидов, в российской популяции.

Нами проведена оценка неравновесия по сцеплению между полиморфными вариантами генов *ТОММ40* и *АРОЕ*. Выявлен один блок сцепления протяженностью от 7 до 10 кб. Также установлены три гаплотипа полиморфных вариантов генов *ТОММ40* и *АРОЕ*, ассоциированные с риском развития ОКС.

Выявленные ассоциации изученного полиморфизма с фенотипами сердечно-сосудистого континуума схематически представлены на рисунке 14. Из рисунка видно, что три генетических локуса, являющихся предметом нашего исследования (*ТОММ40*, *АРОЕ* и мтДНК) зачастую проявляют независимые эффекты, будучи ассоциированы с разными признаками (за исключением, пожалуй, ИМТ). Такое распределение ассоциаций указывает на то, что данные локусы могут осуществлять свой вклад на различных стадиях патогенеза атеросклероза и определяют различные пути развития событий в пространстве сердечно-сосудистого континуума.

Полученные результаты исследования позволяют расширить понимание вклада генетических факторов развития атеросклеротического процесса путем оценки роли митохондриальной функции в отношении ишемической болезни сердца и ее обострения в виде острого коронарного синдрома. Результаты исследования позволят помочь в прогнозировании риска развития повторных инфарктов миокарда и профилактике осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Ассоциации фенотипов ИБС с генами, продукты которых участвуют в обеспечении функционирования митохондрий, указывают на значительную роль митохондриальной дисфункции в патогенезе атеросклероза (Рисунок 14).

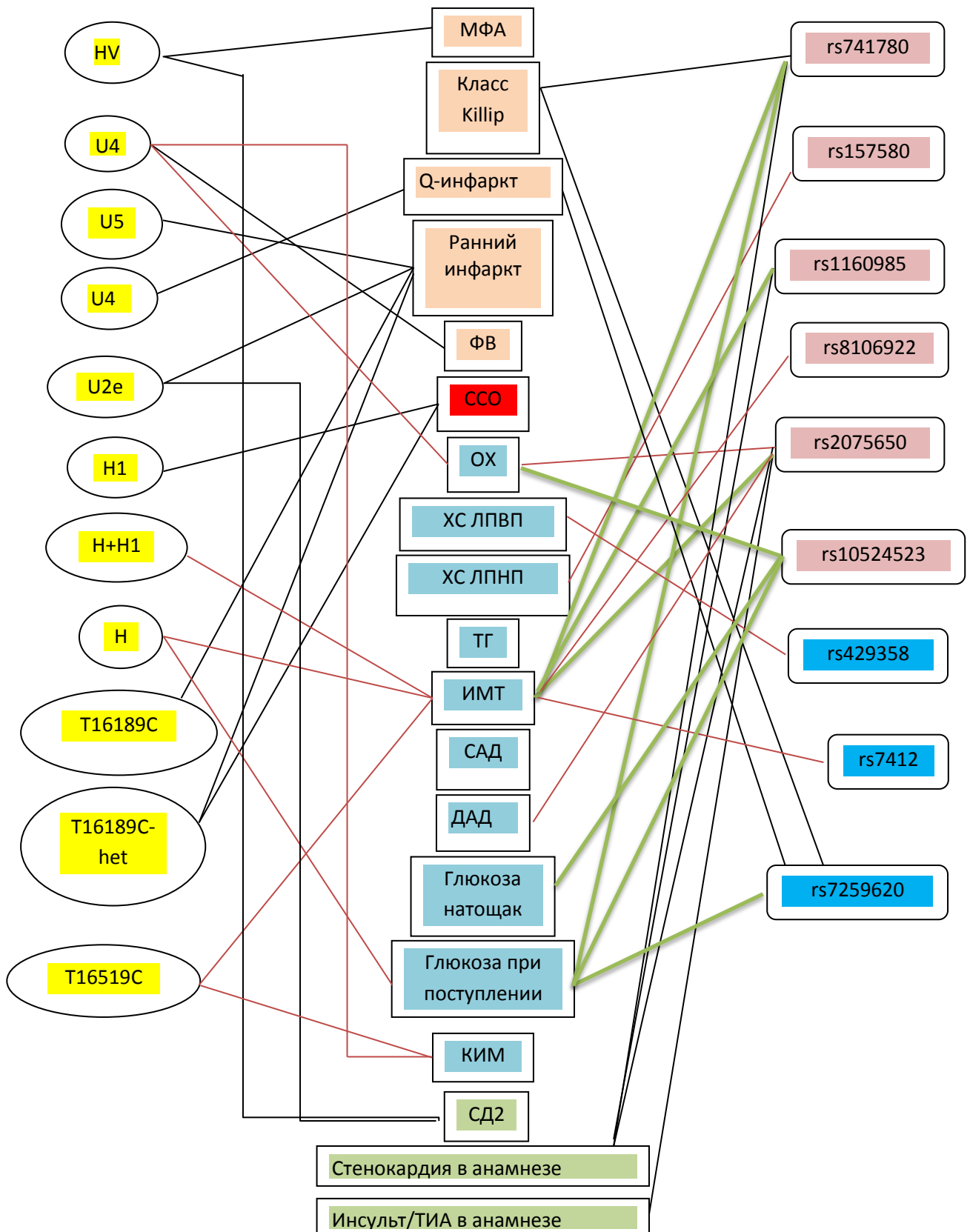


Рисунок 14 – Общая схема ассоциаций исследованных локусов генов и полиморфизма мтДНК в формирование важнейших фенотипов и количественных признаков ОКС. Черными стрелками указаны связи полиморфных вариантов изученных генов и полиморфизма мтДНК, оказывающих влияние на фенотипы

ССЗ; красными – на количественные признаки; зелеными – вклад полиморфизмов с факторами риска (АГ, дислипидемии, курение) на количественные признаки. Синими ячейками отмечены полиморфные варианты гена *APOE*; розовыми – гена *ТОММ40*; голубыми - количественные признаки; оранжевыми – фенотипы ОКС; красными – осложнения; зелеными - факторы риска и анамнестические данные.

ВЫВОДЫ

1. Аллель G полиморфного варианта rs8106922 гена *ТОММ40* ($p=0,022$; $OR=1,27$) и гаплогруппа HV0 мтДНК являются факторами риска развития острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST ($p=0,015$; $OR=2,59$).
2. В результате анализа мтДНК показано, что гаплогруппа H1 ассоциирована с сердечно-сосудистыми осложнениями в течение года после инфаркта миокарда ($p=0,002$; $OR=4,62$). Гаплогруппа U2e и вариант 16189C ассоциированы с риском раннего инфаркта, в то время как гаплогруппа U5 проявляет протективный эффект в отношении раннего инфаркта. Гаплогруппа U2e встречается чаще по сравнению с контролем при наличии у пациентов сахарного диабета 2 типа ($p=0,024$; $OR=5,66$).
3. Выявлена связь полиморфизма мтДНК с эндотипами сердечно-сосудистой системы. Гаплогруппа H и вариант 16519C вносят вклад в изменчивость индекса массы тела у больных с ОКС ($p=0,025$ и $p=0,034$, соответственно). В группе пациентов с ОКС и наличием сахарного диабета 2 типа гаплогруппа H ассоциирована с более высокими значениями глюкозы натощак. Выявлена ассоциация гаплогруппы U с толщиной комплекса «интима-медиа» ($p<0,001$) и уровнем общего холестерина у женщин ($p=0,045$). В подгруппе женщин с ОКС показана ассоциация гаплогруппы H со значениями глюкозы при поступлении в стационар. В контрольной выборке установлены ассоциации наиболее часто встречающихся гаплогрупп мтДНК и полиморфизма некодирующих областей с изменчивостью показателей липидного спектра, артериального давления и индекса массы тела.
4. В контрольной выборке полиморфные варианты в локусе генов *ТОММ40/APOE* вносят вклад в изменчивость показателей липидного спектра и артериального давления; редкие аллели rs741780 и rs1160985 ассоциированы с более низкими уровнями триглицеридов ($p=0,031$ и $p=0,044$, соответственно); длинный аллель (L) поли-Т повтора rs10524523

ассоциирован с более высокими значениями уровня глюкозы ($p=0,027$) по сравнению с другими вариантами по длине; вариант rs7412, определяющий $\epsilon 2$ аллель гена *APOE*, вносит вклад в вариабельность значений общего холестерина и холестерина в составе липопротеидов низкой плотности в контрольной выборке и отдельно в подгруппе женщин; вариант rs2075650 ассоциирован с уровнями систолического артериального давления и холестерином в составе липопротеидов низкой плотности в подгруппе мужчин ($p=0,026$ и $p=0,002$); генотип GG rs8106922 ассоциирован с более низкими уровнями триглицеридов в подгруппе женщин ($p=0,036$); аллель $\epsilon 4$ гена *APOE* и определяющий его rs429358 ассоциирован с уровнем общего холестерина и холестерина в составе липопротеидов низкой плотности ($p=0,002$ и $p=0,006$).

5. В выборке больных с ОКС полиморфизм rs2075650 вносит вклад в вариабельность показателей систолического артериального давления ($p=0,019$), определяющий аллель $\epsilon 2$ гена *APOE* вариант rs7412 ассоциирован с индексом массы тела у больных с ОКС ($p=0,017$), а $\epsilon 4$ аллель *APOE* (вариант rs429358) ассоциирован с холестерином в составе липопротеидов низкой плотности ($p=0,037$). Установлено, что полиморфный вариант rs8106922 гена *ТОММ40* вносит вклад в вариабельность индекса массы тела ($p=0,022$). Отдельно в подгруппе женщин вариант rs2075650 ассоциирован с уровнями диастолического давления, а вариант rs157580 – с уровнем холестерина в составе липопротеидов низкой плотности.
6. Полиморфные варианты локуса *ТОММ40/APOE* (rs741780, rs10524523 и rs7259620) вносят вклад в вариабельность значений уровня глюкозы в подгруппе курящих больных с ОКС ($p=0,047$, $p=0,037$ и $p=0,013$, соответственно), а полиморфизм rs2075650 ассоциирован с индексом массы тела ($p=0,006$). У больных с ОКС в сочетании с артериальной гипертензией аллель C rs429358 гена *APOE* ассоциирован с более низкими значениями холестерина в составе липопротеидов высокой плотности ($p=0,028$). У

пациентов с ОКС и гиперхолестеринемией полиморфные варианты rs741780 и rs1160985 ассоциированы с индексом массы тела. Короткий аллель (S) поли-Т повтора rs10524523 *ТОММ40* ассоциирован с уровнем глюкозы натощак и общим холестерином ($p=0,023$ и $p=0,041$).

7. При анализе гаплотипов в локусе *ТОММ40/APOE* (rs157580-rs2075650-rs8106922-rs10524523-rs1160985-rs741780-rs7259620-rs429358-rs7412), показано, что гаплотипы G-A-A-VL-C-T-G-T-C ($p=0,0028$, OR=1,75), A-A-A-S-C-C-A-T-T ($p=0,0001$, OR=6,53) и A-G-G-S-T-C-A-T-C ($p=0,0067$, OR=4,38) являются рисковыми в отношении развития острого коронарного синдрома.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APAF-1 – apoptotic protease activating factor 1

АПОЕ –аполипопротеид Е

APP – amyloid precursor protein – белок-предшественник амилоида

A β – амилоид β

dNTP – дезоскинуклеотидтрифосфаты

GIP – главная импортирующая пора

GWAS – Genome–Wide Association Study – полногеномное ассоциативное исследование

HVR – hypervariable region

LDL – low density lipoprotein

MAF – minor allele frequency – частота минорного аллеля

OR – Odds ratio – отношение шансов

PCR – Polymerase Chain Reaction – полимеразная цепная реакция;

rCRC – revised Cambridge Reference Sequence – кембриджская референсная последовательность

SDS – sodium dodecyl sulfate – раствор додецилсульфата натрия

SNP – Single–nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

SSC– standart saline citrate solution – раствор солевой раствор цитрата

TIM – translocase of inter mitochondrial membrane – транслоказа внутренней мембраны митохондрий

ТОММ40 –translocase of outer mitochondrial membrane 40 – ген субъединицы транслоказы внешней мембраны митохондрий 40

ТОМ–комплекс – translocase of outer mitochondrial membrane – комплекс транслоказы внешней мембраны митохондрий

TPR – tetratricopeptide repeat – тетратрикопептидный повтор

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БА – болезнь Альцгеймера

ГВС – гипервариабельный сегмент

ГМК – гладкомышечные клетки

ДАД – диастолическое артериальное давление

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ИМТ – индекс массы тела

КА – коронарный атеросклероз

Кб – килобаза

КИМ – толщина комплекса интима-медиа

ЛПВП – липопротеид высокой плотности

ЛПНП – липопротеид низкой плотности

ЛПОНП – липопротеид очень низкой плотности

МРТ – магнитно-резонансная томография

мтДНК – митохондриальная ДНК

МФА – мультифокальный атеросклероз

МФЗ – многофакторные заболевания

НС – нестабильная стенокардия

ОКС – острый коронарный синдром

омЛПНП – окислительно модифицированные ЛПНП

ОХ – общий холестерол

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

САД – систолическое артериальное давление

СД2 – сахарный диабет 2 типа

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ССК – сердечно-сосудистый континуум

ССО – сердечно-сосудистые осложнения

ССС – сердечно-сосудистая система

ТГ – триглицериды

тРНК – транспортная РНК

ТХ А₂ – тромбоксан А₂

ФВ – фракция выброса

ФК – функциональный класс

ХС ЛПВП – холестерол в составе ЛПВП

ХС ЛПНП – холестерол в составе ЛПНП

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭКГ – электрокардиограмма

ЭхоКГ – эхокардиограмма

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аничков, Н. Н. Об этиологии и патогенезе атеросклероза / Н. Н. Аничков // Архив биол. наук. – 1935. – Т. 39. – С. 51–85.
2. Вейр, Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр. – М. : Мир, 1995. – с.400.
3. Голубенко, М. В. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза / М. В. Голубенко, Р. Р. Салахов, О. А. Макеева и др. // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49. – № 6. – С. 968–976.
4. Жейкова, Т.В. Генетическая основа регуляции окислительного стресса: связь с продолжительностью жизни и ишемической болезнью сердца: автореф. дисс. ... канд. мед. наук : 03.02.07 / Т.В. Жейкова. – Томск, 2013. – 23 с.
5. Зайчик, А. Ш. Патохимия (эндокринно-метаболические нарушения) / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – 3-е изд., доп. и исп. – СПб. : ЭЛБИ–СПб, 2007. – 768 с.
6. Каретникова, В.Н. Уровень гликемии как фактор прогноза у больных инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST / В.Н. Каретникова, Ю.А. Беленькова, М.В. Зыков и др. // Кардиология. – 2012. – Т. 52. – № 1. – С. 26–31.
7. Лакин, Г.Ф.Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : Наука, 1990. – 300 с.
8. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование : монография / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
9. Пузырев, В.П. Гены синтропий и сердечно–сосудистый континуум / В.П. Пузырев, О. А. Макеева, М. В. Голубенко // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т. 10. – №3. – С. 479–490.
10. Пузырев, В. П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии человека / В. П. Пузырев // Мед. Генетика. – 2008. – № 9. – С. 3–9.
11. Пузырев, В. П. Синтропные гены болезней сердечно–сосудистого континуума / В. П. Пузырев, В. А. Степанов, О. А. Макеева // Медицинская генетика. – 2009. – № 3. – С. 31–38.

12. Пузырев, В. П. Феномо–геномные отношения и патогенетика многофакторных заболеваний / В. П. Пузырев // Вестник Российской АМН. – 2011. – № 9. – С. 17–27.
13. Салахов, Р. Р. Ассоциация полиморфного варианта 16519 митохондриальной ДНК с индексом массы тела у больных с острым коронарным синдромом / Р. Р. Салахов, М. В. Голубенко, О. А. Макеева и др. // Теоретические и прикладные аспекты современной науки : сборник научных трудов по материалам III международной науч.–практ. конф. / ИП Петрова М.Г. ; под общ. ред. М. Г. Петровой. – Белгород, 2014. – Ч. 2. – С. 168–171.
14. Салахов, Р. Р. Полиморфизм гена *ТОММ40* и его ассоциации с показателями липидного спектра / Р. Р. Салахов, И. А. Гончарова, О. А. Макеева и др. // Генетика. – 2014. – Т. 50. – № 2. – С. 222–229.
15. Салахов, Р. Р. Ассоциации полиморфизма митохондриального генома с количественными признаками при инфаркте миокарда и сахарном диабете / Р. Р. Салахов, О. А. Макеева, В. В. Кашталап и др. // Медицинская генетика. – 2015. – Т. 14. – № 10. – С. 21–24.
16. Сафронов, И.Д. Роль жирорастворимых антиоксидантов в патогенезе атеросклероза / И.Д. Сафронов, Ю.И. Рагино, В.Ю. Куликов // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – № 2. – С. 43–46.
17. Северин, Е. С. Биохимия / Е. С. Северин. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР–Медиа, 2005. – 454 с.
18. Скворцов, В.В. Неврологические аспекты церебрального атеросклероза / В.В. Скворцов, А.В. Тумаренко // Болезни сердца и сосудов – 2009. – № 9. – С. 17–22.
19. Фрейдин, М. Б. Связь полиморфизма некодирующих областей митохондриального генома человека с изменчивостью уровня артериального давления и величин интервальных оценок ЭКГ / М. Б. Фрейдин, В. П. Пузырев, В. Б. Салюков и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 127. – № 1. – С. 82–84.

20. Abe, S. Association of genetic variants with dyslipidemia / S. Abe, F. Tokoro, R. Matsuoka et al. // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 12. – № 4. – P. 5429–5436.
21. Abu–Amero, K. K. The mitochondrial DNA variant 16189 TNC is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs / K. K. Abu–Amero, O. M. Al–Boudari, A. Mousa et al // *Genet. Test Mol. Biomarkers.* – 2010. – Vol. 14. – № 1. – P. 43–47.
22. Achar, S. A. Diagnosis of Acute Coronary Syndrome / S. A. Achar, S. Kundu, W. A. Norcross // *Am. Fam. Physician.* – 2005. – Vol. 72. – № 1. – P. 119–126.
23. Adams, K. L. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus / K. L. Adams, J. D. Palmer // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2003. Vol. 29. – № 3. – P. 380–395.
24. Adeyemo, A. A genome–wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans / A. Adeyemo, N. Gerry, G. Chen et al. // *PLoS Genet.* – 2009. – Vol. 5. – № 7. – e1000564.
25. Afanas'ev, I. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging – Free Radical Theory, Hormesis, and TOR / I. Afanas'ev // *Aging Dis.* – 2010. Vol. 1. – № 2. – P. 75–88.
26. Aggarwal, B. Recent advances in treatment of acute coronary syndromes / B. Aggarwal, V. Menon // *F1000Prime Rep.* – 2013. – Vol. 3. – № 5. – P. 56–66.
27. Allen, A. M. Mitochondrial function is involved in regulation of cholesterol efflux to apolipoprotein (apo) A–I from murine RAW 264.7 macrophages / A. M. Allen, A. Graham // *Lipids Health Dis.* – 2012. – № 11. – P. 169.
28. Al–Mehdi, A. B. Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant–rich nuclear domain required for hypoxia–induced transcription / A. B. Al–Mehdi, V. M. Pastukh, B. M. Swiger et al. // *Sci. Signal.* – 2012. – Vol. 5. – № 231. – P. ra47.
29. Ameer, A. Ultra–deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: mutational patterns and their origins / A. Ameer, J. B. Stewart, C. Freyer et al. // *PLoS Genet.* – 2011. – Vol. 7. – № 3. – e1002028.
30. Anandatheerthavarada, H. K. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in

- neuronal cells / H. K. Anandatheerthavarada, G. Biswas, M. A. Robin et al. // *J. Cell. Biol.* – 2003. – V. 161. – № 1. – P. 41–54.
31. Ankarcrona, M. Rethinking Alzheimer's disease therapy: are mitochondria the key / M. Ankarcrona, F. Mangialasche, B. Winblad // *J. Alzheimers. Dis.* – 2010. – V. 20. – P. 579–590.
 32. Anoop, S. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases / S. Anoop, A. Misra, K. Meena et al. // *Indian. J. Med. Res.* – 2010. – V. 132. – P. 363–378.
 33. Aral, C. Investigation of relationship of the mitochondrial DNA 16189 T>C polymorphism with metabolic syndrome and its associated clinical parameters in Turkish patients / C. Aral, M. Akkiprik, S. Caglayan et al. // *Hormones (Athens).* – 2011. – V. 10. – № 4. – P. 298–303.
 34. Arbustini, E. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy / E. Arbustini, M. Diegoli, R. Fasani et al. // *Am. J. Pathol.* – 1998. – V. 153. – № 5. – P. 1501–1510.
 35. Atamna, H. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease / H. Atamna, W. H. Frey // *Mitochondrion.* – 2007. – V. 7. – № 5. – P. 297–310.
 36. Aulchenko, Y.S. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts / Y.S. Aulchenko, S. Ripatti, I. Lindqvist et al. // *Nat Genet.* – 2009. – № 41. – P. 47–55.
 37. Badimón, L. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis / L. Badimón, G. Vilahur, T. Padró // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2009. – V. 62. – № 10. – P. 1161–1178.
 38. Baker, K. P. A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability / K. P. Baker, A. Schaniel, D. Vestweber et al. // *Nature.* – 1990. – V. 348. – № 6302. – P. 605–609.
 39. Balci, B. The modification of serum lipids after acute coronary syndrome and importance in clinical practice / B. Balci // *Curr. Cardiol. Rev.* – 2011. – Vol. 7. – № 4. – P. 272–276.

40. Ballinger, S. W. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis / S. W. Ballinger, C. Patterson, C. A. Knight–Lozano et al. // *Circulation*. – 2002. – V. 106. – № 5. – P. 544–549.
41. Beekman, M. Genome–wide association study (GWAS)–identified disease risk alleles do not compromise human longevity / M. Beekman, C. Nederstigt, H. E. Suchiman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – V. 107. – № 42. – P. 18046–18049.
42. Bekris, L. M. Functional analysis of APOE locus genetic variation implicates regional enhancers in the regulation of both *TOMM40* and *APOE* / L. M. Bekris, F. Lutz, C. E. Yu // *J. Hum. Genet.* – 2012. – V. 57. – № 1. – P. 18–25.
43. Benn, M. Mitochondrial haplogroups: ischemic cardiovascular disease, other diseases, mortality, and longevity in the general population / M. Benn, M. Schwartz, B. G. Nordestgaard et al. // *Circulation*. – 2008. – V. 117. – № 19. – P. 2492–2501.
44. Botto, N. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease / N. Botto, S. Berti, S. Manfredi et al. // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 570. – № 1. – P. 81–88.
45. Breslow, J. L. Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the APOE phenotype E2/2 / J. L. Breslow, V. I. Zannis, T. R. SanGiacomo et al. // *J. Lipid. Res.* – 1982. – V. 23. – № 8. – P. 1224–1235.
46. Brodbeck, J. Rosiglitazone increases dendritic spine density and rescues spine loss caused by apolipoprotein E4 in primary cortical neurons / J. Brodbeck, M. E. Balestra, A. M. Saunders et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 4. – P. 1343–1346.
47. Brohall, G. Carotid artery intima–media thickness in patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review / G. Brohall, A. Od, B. Fagerberg // *Diabet. Med.* – 2006. – V. 23. – № 6. – P. 609–616.
48. Browser of project «1000 Genomes» [Электронный ресурс] – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/> (дата обращения: 20.01.2016).

49. Canoy, D. Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study / D. Canoy, S. M. Boekholdt, N. Wareham et al. // *Circulation*. – 2007. – V. 116. – № 25. – P. 2933–2943.
50. Caroppi, P. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein / P. Caroppi, F. Sinibaldi, L. Fiorucci et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – V. 16. – № 31. – P. 4058–4065.
51. Cha, M. Y. Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death / M. Y. Cha, S. H. Han, S. M. Son et al. // *PLoS. One*. – 2012. – V. 7. – № 4. – e34929.
52. Chacinska, A. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms / A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic et al. // *Cell*. – 2009. – V. 138. – № 4. – P. 628–644.
53. Chambless, L. E. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study / L. E. Chambless, A. R. Folsom, L. X. Clegg et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2000. – V. 151. – № 5. – P. 478–487.
54. Chang, S. Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity / S. Chang, T. Ma, R. D. Miranda et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – V. 102. – № 51. – P. 18694–18699.
55. Chen, J. B. Lack of association between mutations of gene-encoding mitochondrial D310 (displacement loop) mononucleotide repeat and oxidative stress in chronic dialysis patients in Taiwan / J. B. Chen, T. K. Lin, S. C. Liao et al. // *J. Negat. Results. Biomed.* – 2009. – V. 8. – P. 10.
56. Clark, D. Apolipoprotein-E gene variants associated with cardiovascular risk factors in antipsychotic recipients / D. Clark, O. A. Skrobot, I. Adebisi et al. // *Eur. Psychiatry*. – 2009. – V. 24. – № 7. – P. 456–463.

57. Coram, M. A. Genome-wide characterization of shared and distinct genetic components that influence blood lipid levels in ethnically diverse human populations / M. A. Coram, Q. Duan, T. J. Hoffmann et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2013. – V. 92. – № 6. – P. 904–916.
58. Corder, E. H. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families / E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter et al. // *Science.* – 1993. – V. 261. – № 5123. – P. 921–923.
59. Crimi, M. Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical features in patients with single mtDNA macrodeletion / M. Crimi, R. Del Bo, S. Galbiati et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2003. – V. 11. – № 11. – P. 896–898.
60. Culic, O. Energy turnover of vascular endothelial cells / O. Culic, M. L. Gruwel, J. Schrader // *Am. J. Physiol.* – 1997. – V. 273. – C. 205–213.
61. Czeizel, A. The baseline data of the Hungarian Congenital Malformation Register, 1970–1976 / A. Czeizel // *Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung.* 1978. – Vol. 19. – № 2. – P. 149–156.
62. Davis, N. E. Atherosclerosis—an inflammatory process. / N. E. Davis. // *Journal of Insurance Medicine.* – 2005. – №37. – P. 72–75.
63. Dedoussis, G. V. Association between TNF- α –308G>A polymorphism and the development of acute coronary syndromes in Greek subjects: the CARDIO2000–GENE Study / G. V. Dedoussis, D. B. Panagiotakos, N. V. Vidra et al. // *Genet. Med.* – 2005. – V. 7. – № 6. – P. 411–416.
64. Deelen, J. Genome-wide association study identifies a single major locus contributing to survival into old age; the APOE locus revisited / J. Deelen, M. Beekman, H. W. Uh et al. // *Aging. Cell.* – 2011. – V. 10. – № 4. – P. 686–698.
65. Deloukas, P. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease / P. Deloukas, S. Kanoni, C. Willenborg et al. // *Nat. Genet.* – 2013. – V. 45. – № 1. – P. 25–33.
66. Devi, L. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial

- dysfunction / L. Devi, B. M. Prabhu, D. F. Galati et al. // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – № 35. – P. 9057–9068.
67. DiMauro, S. Mitochondrial respiratory-chain diseases / S. DiMauro, E. A. Schon // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – V. 348. – № 26. – P. 2656–2668.
 68. Dodds, C. Influence of myocardial infarction on plasma-lipoprotein concentration / C. Dodds, G. L. Mills // *Lancet.* – 1959. – V. 1. – № 7084. – P. 1160–1163.
 69. Dolezal, P. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria / P. Dolezal, V. Likic, J. Tachezy et al. // *Science.* – 2006. – V. 313. – № 5785. – P. 314–318.
 70. Dominic, E. A. Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease / E. A. Dominic, A. Ramezani, S. D. Anker et al. // *Heart.* – 2014. – V. 100. – № 8. – P. 611–618.
 71. Dong, L. M. Human apolipoprotein E4 domain interaction / L. M. Dong, K. H. Weisgraber // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – № 32. – P. 19053–19057.
 72. Dromparis, P. Mitochondria in vascular health and disease / P. Dromparis, E. D. Michelakis // *Annu. Rev. Physiol.* – 2013. – V. 75. – P. 95–126.
 73. Dzau, V. J. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease) / V. J. Dzau, E. M. Antman, H. R. Black et al. // *Circulation.* – 2006. – V. 114. – № 25. – P. 2850–2870.
 74. Dzau, V. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement / V. Dzau, E. Braunwald // *Am. Heart. J.* – 1991. – Vol. 121. – P. 1244–1263.
 75. Eichler, E. E. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease / E. E. Eichler, J. Flint, G. Gibson et al. // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – V. 11. – № 6. – P. 446–450.
 76. El Assar, M. Oxidative stress and vascular inflammation in aging / M. El Assar, J. Angulo, L. Rodríguez-Mañas // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2013. – V. 65. – P. 380–401.

77. Ellis, K. L. Association of genetic variation in the natriuretic peptide system with cardiovascular outcomes / K. L. Ellis, C. Newton–Cheh, T. J. Wang et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – V. 50. – № 4. – P. 695–701.
78. Elshourbagy, N. A. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets / N. A. Elshourbagy, W. S. Liao, R. W. Mahley et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1985. – V. 82. – № 1. – P. 203–207.
79. Embley, T. M. Eukaryotic evolution, changes and challenges / T. M. Embley, W. Martin // *Nature.* – 2006. – V. 440. – № 7084. – P. 623–630.
80. Fatini, C. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T–786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes / C. Fatini, F. Sofi, E. Sticchi et al. // *Am. Heart. J.* – 2004. – V. 147. – № 3. – P. 516–521.
81. Fernández–Caggiano, M. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population / M. Fernández–Caggiano, I. Barallobre–Barreiro, I. Rego–Pérez et al. // *Mitochondrion.* – 2013. – V. 13. – № 4. – P. 263–268.
82. Ferreira–González, I. The Epidemiology of Coronary Heart Disease / I. Ferreira–González // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2014. – Vol. 67. – № 2. – P. 139–144.
83. Fuster, V. Acute coronary syndromes: pathology, diagnosis, genetics, prevention, and treatment / V. Fuster, J. C. Kovacic // *Circ. Res.* – 2014. – V. 114. – № 12. – P. 1847–1851.
84. Gabriel, S. B. The structure of haplotype blocks in the human genome / S. B. Gabriel, S. F. Schaffner, H. Nguyen et al. // *Science.* – 2002. – V. 296. – № 5576. – P. 2225–2229.
85. Gatz, M. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease / M. Gatz, C. A. Reynolds, L. Fratiglioni et al. // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 2006. – V. 63. – № 2. – P. 168–174.
86. Gill–Randall, R. Analysis of a polycytosine tract and heteroplasmic length variation in the mitochondrial DNA D–loop of patients with diabetes, MELAS

- syndrome and race-matched controls / R. Gill-Randall, E. J. Sherratt, A. W. Thomas et al. // *Diabet. Med.* – 2001. – V. 18. – № 5. – P. 413–416.
87. Gleissner, C. A. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis / C. A. Gleissner, N. Leitinger, K. Ley // *Hypertension.* – 2007. – V. 50. – № 2. – P. 276–283.
 88. Goldstein, J. L. The LDL pathway in human fibroblasts: a receptor-mediated mechanism for the regulation of cholesterol metabolism / J. L. Goldstein, M. S. Brown // *Curr. Top. Cell. Regul.* – 1976. – V. 11. – P. 147–181.
 89. Gottschalk, W. K. The Broad Impact of TOM40 on Neurodegenerative Diseases in Aging / W. K. Gottschalk, M. W. Lutz, Y. T. He et al. // *J. Parkinsons. Dis. Alzheimers. Dis.* – 2014. – V. 1. – № 1. – P. 12.
 90. Grossman, I. Alzheimer's disease: diagnostics, prognostics and the road to prevention / I. Grossman, M. W. Lutz, D. G. Crenshaw et al. // *EPMA. J.* – 2010. – V. 1. – № 2. – P. 293–303.
 91. Gutierrez, J. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells / J. Gutierrez, S. W. Ballinger, V. M. Darley-Usmar et al. // *Circ. Res.* – 2006. – V. 99. – № 9. – P. 924–932.
 92. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // *J. Gerontol.* – 1956. – Vol. 11. – P. 298–300.
 93. Harman, D. The biologic clock: the mitochondria? / D. Harman // *Journal of the American Geriatrics Society.* – 1972. – Vol. 20. – № 4. – P. 145–147.
 94. Harris, F. M. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice / F. M. Harris, W. J. Brecht, Q. Xu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100. – № 19. – P. 10966–10971.
 95. Heather, L. C. Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction / L. C. Heather, C. A. Carr, D. J. Stuckey et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – V. 85. – № 1. – P. 127–136.

96. Hebebrand, J. Molecular genetic aspects of weight regulation / J. Hebebrand, A. Hinney, N. Knoll et al. // *Dtsch. Arztebl. Int.* – 2013. – V. 110. – № 19. – P. 338–344.
97. Hegele, R. A. A common mtDNA polymorphism associated with variation in plasma triglyceride concentration / R. A. Hegele, B. Zinman, A. J. Hanley et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – V. 60. – № 6. – P. 1552–1555.
98. Hishida, A. Polymorphisms of genes involved in lipid metabolism and risk of chronic kidney disease in Japanese – cross-sectional data from the J-MICC study / A. Hishida, K. Wakai, M. Naito et al. // *Dis.* – 2014. – V. 13. – P. 162.
99. Hong, M. G. Genome-wide pathway analysis implicates intracellular transmembrane protein transport in Alzheimer disease / M. G. Hong, A. Alexeyenko, J. C. Lambert et al. // *J. Hum. Genet.* – 2010. – V. 55. – № 10. – P. 707–709.
100. Hotchkiss, J. W. Adiposity has differing associations with incident coronary heart disease and mortality in the Scottish population: cross-sectional surveys with follow-up / J. W. Hotchkiss, C. A. Davies, A. H. Leyland // *Int. J. Obes. (Lond.)*. – 2013. – V. 37. – № 5. – P. 732–739.
101. Humphries, A. D. Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human TOM40 / A. D. Humphries, I. C. Streimann, D. Stojanovski et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – № 12. – P. 11535–11543.
102. Iglesias del Sol, A. Carotid intima-media thickness at different sites: relation to incident myocardial infarction; The Rotterdam Study / A. Iglesias del Sol, M. L. Sol, D. E. Bots et al. // *Eur. Heart. J.* – 2002. – V. 23. – № 12. – P. 934–940.
103. Innerarity, T. L. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins / T. L. Innerarity, R. W. Mahley // *Biochemistry.* – 1978. – V. 17. – № 8. – P. 1440–1447.
104. Jenuth, J. P. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice / J. P. Jenuth, A. C. Peterson, E. A. Shoubridge // *Nat. Genet.* – 1997. – V. 16. – № 1. – P. 93–95.

105. Jiang, R. Chronic family stress moderates the association between a TOMM40 variant and triglyceride levels in two independent Caucasian samples / R. Jiang, B. H. Brummett, E. R. Hauser et al. // *Biol. Psychol.* – 2013. – V. 93. – № 1. – P. 184–189.
106. Jiao, B. Polygenic Analysis of Late-Onset Alzheimer's Disease from Mainland China / B. Jiao, X. Liu, L. Zhou et al. // *PLoS. One.* – 2015. – V. 10. – № 12. – e0144898.
107. Johnson, S. C. The effect of TOMM40 poly-T length on gray matter volume and cognition in middle-aged persons with APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype / S. C. Johnson, A. La Rue, B. P. Hermann et al. // *Alzheimers. Dement.* – 2011. – V. 7. – № 4. – P. 456–465.
108. Kathiresan, S. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia / S. Kathiresan, C. J. Willer, G. M. Peloso et al. // *Nat. Genet.* – 2009. – V. 41. – № 1. – P. 56–65.
109. Kathiresan, S. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants / S. Kathiresan, B.F. Voight, S. Purcell et al. // *Nat. Genet.* – 2009. – V. 41. – № 3. – P. 334–341.
110. Kelly, D. P. Cell biology: ageing theories unified / D. P. Kelly // *Nature.* – 2011. – Vol. 470. – № 7334. – P. 342–343.
111. Kenney, M. C. Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration / M. C. Kenney, M. Chwa, S. R. Atilano et al. // *PLoS. One.* – 2013. – V. 8. – № 1. – e54339.
112. Kenney, M. C. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases / M. C. Kenney, M. Chwa, S. R. Atilano et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1842. – № 2. – P. 208–219.
113. Kim, S. Genome-wide association study of CSF biomarkers A $\beta 1-42$, t- τ , and p- $\tau 181p$ in the ADNI cohort / S. Kim, S. Swaminathan, L. Shen et al. // *Neurology.* – 2011. – V. 76. – № 1. – P. 69–79.

114. Kluge, M. A. Mitochondria and endothelial function / M. A. Kluge, J. L. Fetterman, J. A. Vita // *Circ. Res.* – 2013. – V. 112. – № 8. – P. 1171–1188.
115. Knight–Lozano, C. A. Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues / C. A. Knight–Lozano, C. G. Young, D. L. Burow et al. // *Circulation.* – 2002. – V. 105. – № 7. – P. 849–854.
116. Kofler, B. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study / B. Kofler, E. E. Mueller, W. Eder et al. // *BMC. Med. Genet.* – 2009. – V. 10. – P. 35.
117. Kong, X. Genetic Variants Associated with Lipid Profiles in Chinese Patients with Type 2 Diabetes / X. Kong, Q. Zhao, X. Xing et al. // *PLoS. One.* – 2015. – V. 10. – № 8. – e0135145.
118. Kozjak–Pavlovic, V. Conserved roles of Sam50 and metaxins in VDAC biogenesis / V. Kozjak–Pavlovic, K. Ross, N. Benlasfer et al. // *EMBO. Rep.* – 2007. – V. 8. – № 6. – P. 576–582.
119. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87. – № 1. – P. 99–163.
120. Kröller–Schön, S. Peroxisome proliferator–activated receptor γ , coactivator 1 α deletion induces angiotensin II–associated vascular dysfunction by increasing mitochondrial oxidative stress and vascular inflammation / S. Kröller–Schön, T. Jansen, A. Schöler et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – V. 33. – № 8. – P. 1928–1935.
121. Kuipers, F. Impaired secretion of very low density lipoprotein–triglycerides by apolipoprotein E– deficient mouse hepatocytes / F. Kuipers, M. C. Jong, Y. Lin et al. // *J. Clin. Invest.* – 1997. – V. 100. – № 11. – P. 2915–2922.
122. Kujoth, G. C. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging / G. C. Kujoth, A. Hiona, T. D. Pugh et al. // *Science.* – 2005. – V. 309. – № 5733. – P. 481–484.
123. Kumar, A. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I / A. Kumar, C. P. Cannon // *Mayo Clin. Proc.* – 2009. – Vol. 84. – № 10 – P. 917–38.

124. Larsson, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging / N. G. Larsson // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – Vol. 79. – P. 683–706.
125. Lettre, G. Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE Project / G. Lettre, C. D. Palmer, T. Young et al. // *PLoS. Genet.* – 2011. – V. 7. – № 2. – e1001300.
126. Li, H. Physiology and pathophysiology of mitochondrial DNA / H. Li, D. Liu, J. Lu et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – V. 942. – P. 39–51.
127. Lin, R. Association of common variants in TOMM40/APOE/APOC1 region with human longevity in a Chinese population / R. Lin, Y. Zhang, D. Yan et al. // *J. Hum. Genet.* – 2015. (принята в печать).
128. Linnertz, C. Characterization of the poly-T variant in the TOMM40 gene in diverse populations / C. Linnertz, A. M. Saunders, M. W. Lutz et al. // *PLoS. One.* – 2012. – V. 7. – № 2. – e30994.
129. Liou, C. W. Association between a common mitochondrial DNA D-loop polycytosine variant and alteration of mitochondrial copy number in human peripheral blood cells / C. W. Liou, T. K. Lin, J. B. Chen et al. // *J. Med. Genet.* – 2010. – V. 47. – № 11. – P. 723–728.
130. Liu, X. Association study of candidate gene polymorphisms with amnesic mild cognitive impairment in a Chinese population / X. Liu, C. Yue, Z. Xu et al. // *PLoS. One.* – 2012. – V. 7. – № 7. – e41198.
131. Lorenz, M. W. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis / M. W. Lorenz, H. S. Markus, M. L. Bots et al. // *Circulation.* – 2007. – V. 115. – № 4. – P. 459–467.
132. Lutz, M. W. Genetic variation at a single locus and age of onset for Alzheimer's disease / M. W. Lutz, D. G. Crenshaw, A. M. Saunders et al. // *Alzheimers. Dement.* – 2010. – V. 6. – № 2. – P. 125–131.
133. Ma, X. Y. Association of TOMM40 polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease in a Northern Han Chinese population / X. Y. Ma, J. T. Yu, W. Wang et al. // *Neuromolecular. Med.* – 2013. – V. 15. – № 2. – P. 279–287.

134. Madamanchi, N. R. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis / N. R. Madamanchi, M. S. Runge // *Circ. Res.* – 2007. – V. 100. – № 4. – P. 460–473.
135. Magnusson, P. K. Familial resemblance of body mass index and familial risk of high and low body mass index / P. K. Magnusson, F. Rasmussen // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* – 2002. – V. 26. – № 9. – P. 1225–1231.
136. Mahley, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology / R. W. Mahley // *Science.* – 1988. – Vol. 240. – № 4852. – P. 622–630.
137. Mahley, R. W. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein / R. W. Mahley, S. C. Jr. Rall // *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* – 2000. – V. 1. – P. 507–537.
138. Mahley, R. W. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease / R. W. Mahley, K. H. Weisgraber, A. Huang et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – № 15. – P. 5644–5651.
139. Mahley, R. W. Development of accelerated atherosclerosis. Concepts derived from cell biology and animal model studies / R. W. Mahley // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1983. – Vol. 107. № 8. – P. 393–399.
140. Majamaa, K. The common MELAS mutation A3243G in mitochondrial DNA among young patients with an occipital brain infarct / K. Majamaa, J. Turkka, M. Kärppä et al. // *Neurology.* – 1997. – V. 49. – № 5. – P. 1331–1334.
141. Mancuso, M. Is there a primary role of the mitochondrial genome in Alzheimer's disease / M. Mancuso, V. Calsolaro, D. Orsucci et al. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2009. – V. 41. – № 5. – P. 411–416.
142. Manczak, M. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression / M. Manczak, T. S. Anekonda, E. Henson et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2006. – V. 15. – № 9. – P. 1437–1449.
143. Manolio, T. A. Cohort studies and the genetics of complex disease. / T. A. Manolio // *Nat. Genet.* – 2009. – Vol. 41. – № 1. – P. 5–6.

144. Martínez–Redondo, D. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO₂max consumer—is it a paradox / D. Martínez–Redondo, A. Marcuello, J. A. Casajús et al. // *Mitochondrion*. – 2010. – V. 10. – № 2. – P. 102–107.
145. Mayer, A. MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19 / A. Mayer, F. E. Nargang, W. Neupert et al. // *EMBO. J.* – 1995. – V. 14. – № 17. – P. 4204–4211.
146. Mazzotti, D. R. Association of APOE, GCPII and MMP9 polymorphisms with common diseases and lipid levels in an older adult/elderly cohort / D. R. Mazzotti, C. C. Singulane, V. K. Ota et al. // *Gene*. – 2014. – V. 535. – № 2. – P. 370–375.
147. MEDLINE database of references and abstracts on life sciences and biomedical topics [Электронный ресурс] – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (дата обращения: 20.01.2016).
148. Meisinger, C. The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane / C. Meisinger, M. Rissler, A. Chacinska et al. // *Dev. Cell*. – 2004. – V. 7. – № 1. – P. 61–71.
149. Mendis, S. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control / S. Mendis, P. Puska, B. Norrving editors // World Health Organization. Geneva. – 2011.
150. Mercer, J. R. DNA damage links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis and the metabolic syndrome / J. R. Mercer, K. K. Cheng, N. Figg et al. // *Circ. Res.* – 2010. – V. 107. – № 8. – P. 1021–1031.
151. Méthot, J. ACE–DD genotype is associated with the occurrence of acute coronary syndrome in postmenopausal women / J. Méthot, B. A. Hamelin, P. Bogaty, et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2005. – V. 105. – № 3. – P. 308–314.
152. Middelberg, R. P. Genetic variants in LPL, OASL and TOMM40/APOE–C1–C2–C4 genes are associated with multiple cardiovascular–related traits / R. P. Middelberg, M. A. Ferreira, A. K. Henders et al. // *BMC. Med. Genet.* – 2011. – V. 12. – P. 123.

153. Mikhed, Y. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction / Y. Mikhed, A. Daiber, S. Steven // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – V. 16. – № 7. – P. 15918–15953.
154. Miller, J. D. MnSOD protects against COX1-mediated endothelial dysfunction in chronic heart failure / J. D. Miller, V. A. Peotta, Y. Chu et al. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2010. – V. 298. – № 5. – P. H1600–H1607.
155. Mitra, K. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase / K. Mitra, C. Wunder, B. Roysam et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – V. 106. – № 29. – P. 11960–11965.
156. Monsalve, M. Mitochondrial dysfunction in human pathologies / M. Monsalve, S. Borniquel, I. Valle et al. // *Front. Biosci.* – 2007. – V. 12. – P. 1131–1153.
157. Montiel-Sosa, F. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages / F. Montiel-Sosa, E. Ruiz-Pesini, J. A. Enr et al. // *Gene.* – 2006. – V. 368. – P. 21–27.
158. Moon, S. W. Structural Neuroimaging Genetics Interactions in Alzheimer's Disease / S. W. Moon, I. D. Dinov, J. Kim et al. // *J. Alzheimers. Dis.* – 2015. – V. 48. – № 4. – P. 1051–1063.
159. Mossmann, D. Amyloid- β peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation / D. Mossmann, F.N. Vögtle, A. A. Taskin et al. // *Cell. Metab.* – 2014. – V. 20. – № 4. – P. 662–669.
160. Mueller, E. E. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations / E. E. Mueller, W. Eder, S. Ebner et al. // *PLoS. One.* – 2011. – V. 6. – № 1. – e16455.
161. Murphy, N. F. Long-term cardiovascular consequences of obesity: 20-year follow-up of more than 15 000 middle-aged men and women (the Renfrew-Paisley study) / N. F. Murphy, K. MacIntyre, S. Stewart et al. // *Eur. Heart. J.* – 2006. – V. 27. – № 1. – P. 96–106.
162. Musunuru, K. Multi-ethnic analysis of lipid-associated loci: the NHLBI CARE project / K. Musunuru, S. P. Romaine, G. Lettre et al. // *PLoS. One.* – 2012. – V. 7. – № 5. – e36473.

163. Naghavi, M. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I / M. Naghavi, P. Libby, E. Falk et al. // *Circulation*. – 2003. – V. 108. – № 14. – P. 1664–1672.
164. Nakamura, T. Apolipoprotein E4 (1–272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells / T. Nakamura, A. Watanabe, T. Fujino et al. // *Mol. Neurodegener.* – 2009. – V. 4. – P. 35.
165. Nei, M. *Molecular population genetics and evolution.* / M. Nei. – N. Y. : Oxford American Elsevier published company, 1975. – 288 p.
166. Neupert, W. Translocation of proteins into mitochondria / W. Neupert, J. M. Herrmann // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – V. 76. – P. 723–749.
167. Niedziela, J. The obesity paradox in acute coronary syndrome: a meta-analysis / J. Niedziela, B. Hudzik, N. Niedziela et al. // *Eur. J. Epidemiol.* – 2014. – V. 29. – № 11. – P. 801–812.
168. Nishigaki, Y. Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males / Y. Nishigaki, Y. Yamada, N. Fuku et al. // *Hum. Genet.* – 2007. – V. 120. – № 6. – P. 827–836.
169. Oelze, M. Glutathione peroxidase–1 deficiency potentiates dysregulatory modifications of endothelial nitric oxide synthase and vascular dysfunction in aging / M. Oelze, S. Kröller–Schön, S. Steven et al. // *Hypertension*. – 2014. – V. 63. – № 2. – P. 390–396.
170. Palacín, M. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H / M. Palacín, V. Alvarez, M. Martín et al. // *Mitochondrion*. – 2011. – V. 11. – № 1. – P. 176–181.
171. Palmer, B. R. Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort / B. R. Palmer, M. D. Jarvis, A. P. Pilbrow et al. // *Am. Heart. J.* – 2008. – V. 156. – № 4. – P. 752–758.

172. Palmieri, V. O. T16189C mitochondrial DNA variant is associated with metabolic syndrome in Caucasian subjects / V. O. Palmieri, D. De Rasmio, A. Signorile et al. // *Nutrition*. – 2011. – V. 27. – P. 773–777.
173. Park, K. S. Study Group of Molecular Diabetology in Asia / K. S. Park, J. C. Chan, L. M. Chuang et al. // *Diabetologia*. – 2008. – V. 51. – № 4. – P. 602–608.
174. Perk, J. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) / J. Perk, G. De Backer, H. Gohlke et al. // *Eur. Heart. J.* – 2012. – V. 33. – № 13. – P. 1635–1701.
175. Petkeviciene, J. Associations between apolipoprotein E genotype, diet, body mass index, and serum lipids in Lithuanian adult population / J. Petkeviciene, A. Smalinskiene, D. I. Luksiene et al. // *PLoS. One*. – 2012. – V. 7. – № 7. – e41525.
176. Pfanner, N. Versatility of the mitochondrial protein import machinery / N. Pfanner, A. Geissler // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* - 2001. – V. 2. – № 5. – P. 339–349.
177. Pitt, B. Lipid levels after acute coronary syndromes / B. Pitt, J. Loscalzo, J. Ycas et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – V. 51. – № 15. – P. 1440–1445.
178. Pliss, L. The link between mitochondrial DNA hypervariable segment I heteroplasmy and ageing among genetically unrelated Latvians / L. Pliss, A. Brakmanis, R. Ranka et al. // *Exp. Gerontol.* – 2011. – V. 46. – № 7. – P. 560–568.
179. Potkin, S. G. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative / S. G. Potkin, G. Guffanti, A. Lakatos et al. // *PLoS. One*. – 2009. – V. 4. – № 8. – e6501.
180. Poulton, J. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study / J. Poulton, J. Luan, V. Macaulay et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – V. 11. – № 13. – P. 1581–1583.
181. Povel, C. M. Genetic variants in lipid metabolism are independently associated with multiple features of the metabolic syndrome / C. M. Povel, J. M. Boer, S. Imholz et al. // *Lipids. Health. Dis.* – 2011. – V. 10. – P. 118.

182. Pulkes, T. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria / T. Pulkes, M. G. Sweeney, M. G. Hanna // *Lancet*. – 2000. – V. 356. – № 9247. – P. 2068–2069.
183. Qin, Z. S. Partition–ligation–expectation–maximization algorithm for haplotype inference with single–nucleotide polymorphisms / Z. S. Qin, T. Niu, J. S. Liu // *Am. J. Hum. Genet.* – 2002. – V. 71. – № 5. – P. 1242–1247.
184. Radmanesh F. Rare Coding Variation and Risk of Intracerebral Hemorrhage / F. Radmanesh, G. J. Falcone, C. D. Anderson et al. // *Stroke*. – 2015. – V. 46. – № 8. – P. 2299–2301.
185. Rall, S. C. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects / K. H. Rall, T. L. Jr, A. Weisgraber et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1982. – V. 79. – № 15. – P. 4696–4700.
186. Rao, G. American Heart Association Obesity Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health. Identification of Obesity and Cardiovascular Risk in Ethnically and Racially Diverse Populations: A Scientific Statement From the American Heart Association / G. Rao, T. M. Powell–Wiley, I. Ancheta et al. // *Circulation*. – 2015. – V. 132. – № 5. – P. 457–472.
187. Rehling, P. Mitochondrial import and the twin–pore translocase / P. Rehling, K. Brandner, N. Pfanner // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V. 5. – № 7. – P. 519–530.
188. Rhein, V. Amyloid–beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells / V. Rhein, G. Baysang, S. Rao et al. // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2009. – V. 29. – P. 1063–1071.
189. Roberts, R. Genetics of coronary artery disease / R. Roberts // *Circ. Res.* – 2014. Vol. 114. – № 12. – P. 1890–1903.
190. Ronald, J. Analysis of recently identified dyslipidemia alleles reveals two loci that contribute to risk for carotid artery disease / J. Ronald, R. Rajagopalan, J. E. Ranchalis et al. // *Lipids. Health. Dis.* – 2009. – V. 8. – P. 52.

191. Rosa, A. Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients / A. Rosa, B. V. Fonseca, T. Krug et al. // BMC. Med. Genet. – 2008. – V. 9. – P. 57.
192. Roses, A. D. A TOMM40 variable-length polymorphism predicts the age of late-onset Alzheimer's disease / A. D. Roses, M. W. Lutz, H. Amrine-Madsen et al. // Pharmacogenomics. J. – 2010. – V. 10. – № 5. – P. 375–384.
193. Ross, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. / R. Ross // The New England Journal of Medicine. – 1999. – Vol. 340. – № 2. – P. 115–126.
194. Ross, R. Response to injury and atherogenesis / R. Ross, J. Glomset, L. Harker // Am. J. Pathol. – 1977. – V. 86. – № 3. – P. 675–684.
195. Rosvall, M. Incident coronary events and case fatality in relation to common carotid intima-media thickness / M. Rosvall, L. Janzon, G. Berglund et al. // J. Intern. Med. – 2005. – V. 257. – № 5. – P. 430–437.
196. Sabatti, C. Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population / C. Sabatti, S. K. Service, A. L. Hartikainen et al. // Nat. Genet. – 2009. – V. 41. – № 1. – P. 35–46.
197. Saitoh, T. Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states / T. Saitoh, M. Igura, T. Obita et al. // EMBO. J. – 2007. – V. 26. – № 22. – P. 4777–4787.
198. Sawabe, M. Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients / M. Sawabe, M. Tanaka, K. Chida et al. // J. Atheroscler. Thromb. – 2011. – V. 18. – № 2. – P. 166–175.
199. Schnabel, R. B. Next steps in cardiovascular disease genomic research--sequencing, epigenetics, and transcriptomics / R. B. Schnabel, A. Baccarelli, H. Lin et al. // Clin. Chem. – 2012. – V. 58. – № 1. – P. 113–126.
200. Schneider, W. J. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows / W. J. Schneider, P.

- T. Kovanen, M. S. Brown et al. // *J. Clin. Invest.* – 1981. – V. 68. – № 4. – P. 1075–1085.
201. Schupf, N. Apolipoprotein E and familial longevity / N. Schupf, S. Barral, T. Perls et al. // *Neurobiol. Aging.* – 2013. – V. 34. – № 4. – P. 1287–1291.
 202. Seferović, J. P. The role of glycemia in acute heart failure patients / J. P. Seferović, I. Milinković, M. Tesić et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2014. – V. 52. – № 10. – P. 1437–1446.
 203. Sena, L. A. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species / L. A. Sena, N. S. Chandel // *Mol. Cell.* – 2012. – V. 48. – № 2. – P. 158–167.
 204. Shen, L. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative / L. Shen, S. Kim, S. L. Risacher et al. // *Neuroimage.* – 2010. – V. 53. – № 3. – P. 1051–1063.
 205. Shore, V. G. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins / V. G. Shore, B. Shore // *Biochemistry.* – 1973. – V. 12. – № 3. – P. 502–507.
 206. Sima, A. Apolipoprotein E polymorphism—a risk factor for metabolic syndrome / A. Sima, A. Iordan, C. Stancu // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2007. – V. 45. – № 9. – P. 1149–1153.
 207. Smolková, B. Genetic determinants of quantitative traits associated with cardiovascular disease risk / B. Smolkov, S. Bonassi, V. Buocikov et al. // *Mutat. Res.* – 2015. – V. 778. – P. 18–25.
 208. Sobenin, I. A. Mutations of mitochondrial DNA in atherosclerosis and atherosclerosis-related diseases / I. A. Sobenin, A. V. Zhelankin, K. Y. Mitrofanov et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2015. – V. 21. – № 9. – P. 1158–1163.
 209. Solé, X. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies / X. Solé, E. Guinó, J. Valls et al. // *Bioinformatics.* – 2006. – V. 22. – № 15. – P. 1928–1929.
 210. Sorensen, T. I. Adoption study of environmental modifications of the genetic influences on obesity / T. I. Sorensen, C. Holst, A. J. Stunkard // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* – 1998. – V. 22. – № 1. – P. 73–81.
 211. Strauss, K. A. Severity of cardiomyopathy associated with adenine nucleotide translocator-1 deficiency correlates with mtDNA haplogroup / K. A. Strauss, L.

- DuBiner, M. Simon et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – № 9. – P. 3453–3458.
212. Sugamura, K. Reactive oxygen species in cardiovascular disease / K. Sugamura, J. F. Jr. Keaney // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2011. – V. 51. – № 5. – P. 978–992.
 213. Swerdlow, R. H. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria / R. H. Swerdlow // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1812. – № 12. – P. 1630–1639.
 214. Takei, N. Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease / N. Takei, A. Miyashita, T. Tsukie et al. // *Genomics.* – 2009. – V. 93. – № 5. – P. 441–448.
 215. Talmud, P. J. Gene-centric association signals for lipids and apolipoproteins identified via the HumanCVD BeadChip / P. J. Talmud, F. Drenos, S. Shah et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. – V. 85. – № 5. – P. 628–642.
 216. Taylor, A. E. Comparison of the associations of body mass index and measures of central adiposity and fat mass with coronary heart disease, diabetes, and all-cause mortality: a study using data from 4 UK cohorts / A. E. Taylor, S. Ebrahim, Y. Ben-Shlomo et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2010. – V. 91. – № 3. – P. 547–556.
 217. Taylor, R. D. Characterization of *Neurospora crassa* TOM40-deficient mutants and effect of specific mutations on TOM40 assembly / R. D. Taylor, B. J. McHale, F. E. Nargang // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 2. – P. 765–775.
 218. Tejedor, M. T. The apolipoprotein E polymorphism rs7412 associates with body fatness independently of plasma lipids in middle aged men / M. T. Tejedor, M. P. Garcia-Sobreviela, M. Ledesma et al. // *PLoS. One.* – 2014. – V. 9. – № 9. – e108605.
 219. Torroni, A. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations / A. Torroni, K. Huoponen, P. Francalacci et al. // *Genetics.* – 1996. – V. 144. – № 4. – P. 1835–1850.
 220. Torroni, A. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and

- 14484 / A. Torroni, M. Petrozzi, L. Urbano et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – V. 60. – № 5. – P. 1107–1121.
221. Trerotola, M. Epigenetic inheritance and the missing heritability / M. Trerotola, V. Relli, P. Simeone et al. // *Hum. Genomics.* – 2015. – V. 9. – P. 17.
222. Trifunovic, A. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase / A. Trifunovic, A. Wredenberg, M. Falkenberg et al. // *Nature.* – 2004. – V. 429. – № 6990. – P. 417–423.
223. Van Wilpe, S. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase / S. van Wilpe, M. T. Ryan, K. Hill et al. // *Nature.* – 1999. – V. 401. – № 6752. – P. 485–489.
224. Vazquez, G. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis / G. Vazquez, S. Duval, K. Jacobs et al. // *Epidemiol. Rev.* – 2007. – V. 29. – P. 115–128.
225. Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine / D. C. Wallace // *Annu. Rev. Genet.* – 2005. – Vol. 39. – P. 359–407.
226. Wallace, D. C. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases / D. C. Wallace // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2013. – Vol. 368. – № 1622. – 20120267.
227. Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse / D. C. Wallace // *Science.* – 1999. Vol. 283. – P. 1482–1488.
228. Wallace, D. C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging / D. C. Wallace // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2010. – Vol. 51. – № 5. – P. 440–450.
229. Wang, C. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis / C. Wang, H. Kong, Y. Guan et al. // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – № 13. – P. 4108–4116.

230. Wang, X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease / X. Wang, B. Su, L. Zheng et al. // J. Neurochem. – 2009. – V. 109. – P. 153–159.
231. Weber, L. A. Cardiovascular Imaging for the Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events / L. A. Weber, M. K. Cheezum, J. M. Reese et al. // Curr. Cardiovasc. Imaging. Rep. – 2015. – V. 8. – № 9. – P. 36.
232. Wells, J. C. Height, adiposity and hormonal cardiovascular risk markers in childhood: how to partition the associations / J. C. Wells, T. J. Cole // Int. J. Obes. (Lond). – 2014. – V. 38. – № 7. – P. 930–935.
233. Weng, S. W. Association of mitochondrial deoxyribonucleic acid 16189 variant (T→C transition) with metabolic syndrome in Chinese adults / S. W. Weng, C. W. Liou, T. K. Lin et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – V. 90. – № 9. – P. 5037–5040.
234. Wenzel, P. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction / P. Wenzel, S. Schuhmacher, J. Kienh et al. // Cardiovasc. Res. – 2008. – V. 80. – № 2. – P. 280–289.
235. Williams, K. J. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis / K. J. Williams, I. Tabas // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1995. – V. 15. – № 5. – P. 551–561.
236. Wilson, C. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E / C. Wilson, M. R. Wardell, K. H. Weisgraber et al. // Science. – 1991. – V. 252. – № 5014. – P. 1817–1822.
237. Woollard, K. J. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions / K. J. Woollard, F. Geissmann // Nat. Rev. Cardiol. – 2010. – V. 7. – № 2. – P. 77–86.
238. Wormser, D. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies / D. Wormser, S. Kaptoge, E. Di Angelantonio et al. // Lancet. – 2011. – V. 377. – № 9771. – P. 1085–1095.

239. Yamase, Y. Association of TOMM40 and SLC22A4 polymorphisms with ischemic stroke / Y. Yamase, H. Horibe, C. Ueyama et al. // *Biomed. Rep.* – 2015. – V. 3. – № 4. – P. 491–498.
240. Yang, T. L. Genetic association study of common mitochondrial variants on body fat mass / T. L. Yang, Y. Guo, H. Shen et al. // *PLoS. One.* – 2011. – V. 6. – № 6. – e21595.
241. Ye, Z. The association of the mitochondrial DNA OriB variant (16184–16193 polycytosine tract) with type 2 diabetes in European populations / Z. Ye, C. Gillson, M. Sims et al. // *Diabetologia.* – 2013. – V. 56. – № 9. – P. 1907–1913.
242. Young, J. C. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70 / J. C. Young, N. J. Hoogenraad, F. U. Hartl // *Cell.* – 2003. – V. 112. – № 1. – P. 41–50.
243. Yu, E. Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes and correlates with higher-risk plaques in humans / E. Yu, P. A. Calvert, J. R. Mercer et al. // *Circulation.* – 2013. – V. 128. – № 7. – P. 702–712.
244. Yu, E. P. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis / E. P. Yu, M. R. Bennett // *Trends. Endocrinol. Metab.* – 2014. – V. 25. – № 9. – P. 481–487.
245. Yusuf, S. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study / S. Yusuf, S. Hawken, S. Ounpuu et al. // *Lancet.* – 2005. – V. 366. – № 9497. – P. 1640–1649.
246. Zannis, V. I. Proposed nomenclature of APOE isoproteins, APOE genotypes, and phenotypes / V. I. Zannis, J. L. Breslow, G. Utermann et al. // *J. Lipid. Res.* – 1982. – V. 23. – № 6. – P. 911–914.
247. Zaragoza, M. V. Mitochondrial cardiomyopathies: how to identify candidate pathogenic mutations by mitochondrial DNA sequencing, MITOMASTER and phylogeny / M. V. Zaragoza, M. C. Brandon, M. Diegoli et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2011. – V. 19. – № 2. – P. 200–207.
248. Zhang, Z. Association of genetic loci with blood lipids in the Chinese population / Z. Zhang, L. Tao, Z. Chen et al. // *PLoS. One.* – 2011. – V. 6. – № 11. – e27305.

249. Zhou, R. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation / R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu et al. // *Nature*. – 2011. – V. 469. – № 7329. – P. 221–225.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить искреннюю благодарность своему руководителю, академику РАН, Валерию Павловичу Пузырёву за предоставленную возможность участия в столь интересной работе, за неоценимую помощь, терпение и поддержку во время выполнения работы, а также за мудрые советы и формирование моих научных интересов.

Огромную благодарность хотелось бы выразить Макеевой Оксане Алексеевне, Голубенко Марии Владимировне и Гончаровой Ирине Александровне за чуткое руководство и оказанную помощь при выполнении и обсуждении работы. Их ценные советы и большой опыт методической и научной работы оказали большое влияние на меня и на мое исследование.

Кроме того, хочу поблагодарить за поддержку и помощь сотрудников ФГБНУ «НИИ медицинской генетики» и ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» во время выполнения работы.