

На правах рукописи

Шевченко Алла Владимировна

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ  
ЦИТОКИНОВ, МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА  
РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПРИ РЯДЕ  
МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Новосибирск 2015 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» (НИИКЭЛ)

**Научный консультант:**

академик РАН доктор медицинских наук, профессор Владимир Иосифович Коненков

**Официальные оппоненты:**

**Гуляева Людмила Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

**Меркулова Татьяна Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

**Бубнова Людмила Николаевна**, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории иммуногематологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России».

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Государственного научного центра «Институт иммунологии» ФМБА России»

Защита состоится «15» октября 2015 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт Фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт Фундаментальной и клинической иммунологии» и на сайте организации: <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук Белогородцев Сергей Николаевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Мультифакториальные заболевания (МФЗ) представляют собой самую многочисленную и разнообразную группу болезней, составляющую более 90% от всех соматопатологий человека, характеризующихся наиболее высокими темпами роста заболеваемости, смертности и инвалидизации трудоспособного населения в современных популяциях [Бочков Н.П., 2011]. Проблема низкой эффективности лечебно-профилактических мероприятий таких заболеваний связана со сложностью и отсутствием полной ясности в понимании особенностей ключевых механизмов развития процессов [Weiss K.M., 2000]. В развитии таких социально-значимых МФЗ, как ишемическая болезнь сердца (ИБС), сазарный диабет 2 типа (СД2), рак молочной железы (РМЖ), ревматоидный артрит (РА), лежит сочетание внешнесредовых и генетических факторов, определяющих особенности иммунного ответа организма на процессы воспаления, характерные для анализируемых заболеваний, реализующиеся через сложные взаимодействия клеток различной специфичности. Регулируя иммунный ответ, они продуцируют широкий спектр цитокинов и других медиаторов воспаления, обладающих аутокринной, паракринной и эндокринной активностью, образующих регуляторную сеть, в которой отдельные элементы обладают синергическим или антагонистическим действием, что влияет на патологический процесс, варианты его течения и исхода [Middleton D., 2003]. Особенности синтеза, сложность сетевых взаимодействий и плейотропных эффектов ключевых медиаторов воспаления - цитокинов у конкретного индивида, может лежать в основе МФЗ [Симбирцев АС, 2004; Lusic AJ, -2004; Sosnoski DM, 2012]. Получены убедительные доказательства участия цитокинов в процессах повреждения коронарной бляшки в результате ее воспаления и разрыва, что является основным механизмом, приводящим на фоне ишемической болезни сердца к развитию острых коронарных событий (ОКС). Выявлена корреляция индивидуальных особенностей уровня секреции цитокинов у больных сахарным диабетом, одним из важнейших факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Получены данные о ключевой роли цитокинов в иммунном ответе на процесс воспаления при ревматологических болезнях и в развитии онкопатологий [Srinivas G 2009; Sosnoski D 2012]. Причем, в каждом конкретном случае именно баланс про- и-противовоспалительных цитокинов определяет характер иммунного ответа на развитии воспалительного процесса в МФЗ [Яременко ОБ, 2005; Dimitrova P, 2002].

Секреция цитокинов в месте формирования атеросклеротической бляшки, в области деструктивных процессов при ревматических болезнях, в

процессах ангиогенеза и метастазирования стимулирует большинство клеток к образованию матричных металлопротеиназ - протеолитических ферментов, которые, во-первых, разрушают окружающий внеклеточный матрикс, создавая тем самым «дороги» для миграции клеток, а во-вторых, обеспечивают конверсию неактивных форм цитокинов, депонированных на матриксе, в активные формы [Shah PK, 2000; Jezierska A, 2009]. Активность матричных металлопротеиназ в иммунном ответе рассматривается как значимый маркер прогрессии мультифакториальных заболеваний [Rybakowski J, 2009; Chen Y, 2012].

При прогрессивном росте опухоли происходит образование новых кровеносных сосудов. Ключевая роль в этом процессе принадлежит семейству факторов роста эндотелия сосудов (VEGF). Процессы, связанные с образованием новых кровеносных сосудов, аналогичные происходящим в опухолевых тканях, наблюдаются и при острых коронарных синдромах и при воспалительных процессах в костных тканях, причем, активность процессов коррелирует с уровнем определяемого в тканях белка [Angelo LS, 2007] и взаиморегулируется и цитокинами, и матричными металлопротеиназами [Ferrara N, 2003; Lynn K, 2010].

Индивидуальные особенности иммунной системы конкретного индивида определяются генетическими особенностями организма и опосредованы генетическим полиморфизмом ответственных за формирование иммунного ответа генов. Регуляция экспрессии генов осуществляется, прежде всего на транскрипционном уровне, в промоторных или 3' фланкирующих регуляторных регионах генов, причем определенные аллельные варианты, а чаще особенности генотипов, включающие несколько полиморфных позиций регуляторной последовательности ответственны за уровень и функциональную активность кодирующих их белков [Bidwell J, 2001]. Чрезвычайно высокая степень полиморфизма генов цитокинов, матричных металлопротеиназ и факторов роста эндотелия сосудов, в том числе и в регуляторных регионах, обосновывает возможность их использования в качестве генетических предикторов предрасположенности к развитию МФЗ. Однако, несмотря на достигнутые успехи мирового научного сообщества в области изучения генома человека и в разработке новых методов анализа ДНК, по-прежнему только частично можно объяснить отдельные звенья иммунопатогенеза некоторых МФЗ. При этом, данные проводимых мета-анализов по результатам исследований ассоциаций иммуногенетических маркеров с предрасположенностью к МФЗ, зачастую противоречивы в различных популяциях мира. Поэтому не стоит забывать, что распределение определенных полиморфных вариантов генов среди больных МФЗ имеет свои

этногеографические особенности [Пузырев ВП, 2007; Meenagh A. 2002]. Кроме того, нельзя не учитывать сложные сетевые взаимодействия медиаторов воспаления.

Исследование роли иммуногенетических факторов при МФЗ является одним из наиболее перспективных направлений современной иммунологии и приоритетной областью современного здравоохранения. В настоящее время накоплено достаточно данных о вовлеченности различных полиморфных генов, продукты которых принимают непосредственное участие в процессах регуляции иммунного ответа при воспалении, в формирование предрасположенности к МФЗ [Hollegaard MV, 2006]. При этом, механизм их развития чрезвычайно сложен, так как в его основе лежит куммулятивный полигенный компонент и полиморфность сети медиаторов воспаления. Анализ ассоциаций МФЗ с сочетанной встречаемостью генотипов различных генов иммунного ответа в настоящее время остается неразработанным направлением исследований. Во многом это связано с тем, что увеличение числа рассматриваемых генов ведет к экспоненциальному росту числа сочетаний их аллельных вариантов, что делает анализ стандартными методами перебора практически невозможным [Lvovs D, 2012].

Предложенный в работе полилокусный анализ генов, продукты которых принимают активное участие в иммунном ответе при развитии воспаления, деструкции и ангиогенеза в решении этой проблемы представляется современным, перспективным и позволяющим наиболее глубоко и четко выявлять ассоциации иммуногенетических комплексов с МФЗ. Обращает на себя внимание и то, что при неоспоримом наличии общих закономерностей иммунных реакций на воспалительный процесс при различных МФЗ, не выявлено общих генетических детерминант предрасположенности к развитию коморбидных заболеваний. Предлагаемый в работе методический подход, основанный на полилокусном анализе генетических особенностей пациента, позволяет подойти к решению принципиально нового класса задач клинической иммуногенетики, связанных, во-первых, с проблемами выявления индивидуальных специфических иммуногенетических комплексов для определенного МФЗ, и, во-вторых, выявлении общих генетических детерминант, синтропных одновременно для нескольких МФЗ, в патогенезе которых ответ на воспаление играет немаловажную роль. Это позволит, во-первых, более точно прогнозировать степень риска развития определенного МФЗ и его осложнений у конкретного индивида и на основе прогноза проводить ранние профилактические мероприятия, т.е. вплотную подойти к решению задач «персонифицированной медицины». Во-вторых, выявить сложные синтропные генетические компоненты, общие для разных МФЗ,

предрасполагающие к определенному типу реагирования иммунной системы на воспаление, что даст новые знания в развитии концепции синтропных генов [Пузырев ВП 2006; 2009]. Таким образом, использование технологий индивидуального анализа генных сетей регуляции воспаления может помочь в создании систем прогнозирования, основанных на персонализированных предикторах предрасположенности/резистентности к развитию социально значимых заболеваний человека, что является актуальной научной и практической задачей. Исходя из этого, сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

**Цель исследования:** проведение комплексного сравнительного анализа полиморфизма генов ключевых цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста сосудистого эндотелия при таких мультифакториальных заболеваниях человека, как ишемическая болезнь сердца, ревматоидный артрит, сахарный диабет второго типа и рак молочной железы.

**задачи исследования:**

1. Оценить особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов *TNF $\alpha$*  (позиции -863,-308,- 238), *IL1 $\beta$*  (позиция -511, -31), *IL 4* (позиция-590), *IL6* (позиция -174) и *IL10* (позиция -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2(-1562)*, *MMP3(-1171)*, *MMP9(-1309)*, регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF(-2578,+936)* у практически здоровых жителей Западной Сибири в сопоставлении с данными по другим этническим группам.
2. Оценить особенности комплексных генотипов генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, гена фактора роста эндотелия сосудов в половой и возрастной структуре популяции.
3. Провести анализ ассоциированности полиморфизма генов ключевых цитокинов с уровнем их спонтанной и стимулированной ConA продукции в культурах МНК.
4. Проанализировать характер ассоциированности генотипов генов цитокинов *TNF $\alpha$*  (позиции -863,-308,- 238), *IL1 $\beta$*  (позиция -511, -31), *IL 4* (позиция-590), *IL6* (позиция -174) и *IL10* (позиция -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2(-1562)*, *MMP3(-1171)*, *MMP9(-1309)*, регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF(-2578,+936)* с риском развития ишемической болезни сердца и ее осложнений и оценить комплексные генотипы, как прогностические критерии риска развития патологии и ее осложнений.
5. Провести анализ ассоциированности комбинаций генотипов промоторных регионов генов цитокинов *TNF $\alpha$*  (позиции-863,- 308, -238), *IL1 $\beta$*  (позиция -31), *IL2* (позиция -330), *IL4*(позиция -590), *IL6* (позиция -174), *IL10*(позиции -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2(-*

- 1562), *MMP3*(-1171), *MMP9*(-1309), регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*(-2578,+936) с сывороточным уровнем таких лабораторных показателей, как TNF- $\alpha$ , IL-1B, IL-1RA, IL6, IL-8, СРБ, CD40, *MMP3*, *MMP9* у пациентов с ангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом.
6. Оценить особенности полиморфизма генов цитокинов *TNF $\alpha$*  (позиции-863, -308, -238), *IL1 $\beta$*  ( позиция -31), *IL4*( позиция -590), *IL6* ( позиция -174), *IL10*( позиции -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2*(-1562), *MMP3*(-1171), *MMP9*(-1309), регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*(-2578,+936) и их комплексных генотипов в развитии сахарного диабета второго типа; их ассоциированность с уровнем сывороточной продукции основных маркеров инсулинорезистентности у пациенток с СД2.
  7. Проанализировать особенности распределения генотипов генов цитокинов *TNF  $\alpha$* ( позиции-863, -308,- 238), *IL1 $\beta$*  ( позиция -31), *IL4*( позиция -590), *IL6* ( позиция -174), *IL10*( позиции -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2*(-1562), *MMP3*(-1171), *MMP9*(-1309), регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*(-2578,+936) у пациенток с раком молочной железы; оценить их ассоциированность с фактором наследственности, сопутствующими заболеваниями, тяжестью течения, метастазированием; выявить комплексные генотипы, ассоциированные с предрасположенностью и резистентностью к заболеванию.
  8. Провести анализ ассоциированности генотипов генов цитокинов *TNF $\alpha$*  ( позиции-863, -308, -238), *IL1 $\beta$*  ( позиция -31), *IL4*( позиция -590), *IL6* ( позиция -174), *IL10*( позиции -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2*(-1562), *MMP3*(-1171), *MMP9*(-1309), регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*(-2578,+936) у пациенток с ревматоидным артритом, выявить ассоциированные с заболеванием комплексные генотипы и их ассоциированность с уровнем сывороточной продукции РФ и СРБ у пациенток с РА.
  9. Выявить общие комплексные генотипы, позитивно либо негативно ассоциированные с несколькими из проанализированных МФЗ.

**Научная новизна:** Впервые выявлены половые различия комплексных генотипов и показано значительное снижение, либо полное отсутствие ряда комплексных генотипов в возрастных группах старше 55 лет по сравнению с группой до 55 лет у практически здоровых жителей Западной Сибири.

Впервые выявлены общие и частные закономерности развития некоторых клинических проявлений таких социально-значимых заболеваний, как ИБС, РМЖ, СД2 типа, РА при проведении сравнительного анализа ассоциированности полиморфизма регуляторных регионов генов *TNF $\alpha$*  (позиции-863, -308, -238), *IL1 $\beta$*  (позиция -511, -31), *IL4* (позиция -590), *IL6* (позиция -174), *IL10* (позиции -1082, -592), матричных металлопротеиназ *MMP2*(-1562), *MMP3*(-1171), *MMP9*(-1309), регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*(-2578,+936).

Впервые получены данные ассоциированности полиморфизма ансамбля генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, фактора роста эндотелия сосудов, находящихся в сложных сетевых внутренних взаимодействиях при реализации иммунного ответа при развитии СД2, РА, РМЖ, ИБС.

Впервые выявлена ассоциированность комплексных полиморфных маркеров воспаления, деструкции и ангиогенеза с сывороточными уровнями кардиологических маркеров *TNF- $\alpha$* , *IL-1B*, *IL-1RA*, *IL6*, *IL-8*, *СРБ*, *MMP3*, *MMP9* на примере пациентов с атеросклерозом, верифицированным ангиографически.

Впервые среди жителей Западной Сибири выявлены ассоциативные связи между сывороточным уровнем факторов инсулинорезистентности и комплексными генотипами, в состав которых входят полиморфные позиции генов *TNF- 863,-308,-238; IL1B-31; IL6-174; IL10-592;VEGF2578*.

Впервые среди жителей Западной Сибири показана ассоциированность РФ и *СРБ* с полиморфными комплексами генов цитокинов *TNF- 863,-308,-238; IL1B-31; IL4-590; IL6-174; IL10-592*, гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*.

Впервые на основе многомерного анализа выявлены индивидуально ассоциированные с заболеванием комплексные генотипы предрасположенности и резистентности к определенным анализируемым МФЗ.

Впервые выявлены комплексные генотипы, синтропные для развития ИБС, СД2, РМЖ, РА.

**Теоретическая и практическая значимость исследования:** На основе современных молекулярно-генетических технологий получены новые данные об ассоциированности генов, продукты которых принимают непосредственное участие в иммунном ответе, с развитием ишемической болезни сердца, сахарного диабета 2 типа, рака молочной железы, ревматоидного артрита. Выявлены полиморфные маркеры, ассоциированные с клиническими характеристиками анализируемых МФЗ, способствующие лучшему пониманию их иммунопатогенеза. Разработан новый методологический подход к анализу: сопряженный индивидуальный анализ определенных позиций генома человека,

при котором несколько полиморфных позиций анализируются как единый генетический признак, что является шагом к персонализированной медицине. Выявлены индивидуальные для конкретного МФЗ комплексные генотипы, позволяющие более точно выявлять группы повышенного риска их развития. Выявлены комплексные генотипы, позитивно или негативно ассоциированные одновременно с несколькими из анализируемых МФЗ, что свидетельствует об их синтропности в отношении этих МФЗ. Результаты исследования внедрены в научный процесс лабораторий эндокринологии и патологии соединительной ткани НИИ клинической и экспериментальной лимфологии «НИИКЭЛ», в работу терапевтического и консультативного отделений клиники «НИИКЭЛ», научный и лечебный процесс НИИ терапии и профилактической медицины «НИИТПМ» как дополнительный критерий выявления РА, СД2, ИБС и вариантов их течения.

**Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Полиморфизм регуляторных регионов исследованных генов ключевых цитокинов, матричных металлопротеинах, фактора роста эндотелия сосудов ассоциирован с развитием и клиническими проявлениями таких мультифакториальных заболеваний, как ИБС, РА, СД 2 типа и РМЖ.
2. Важная роль комплекса анализируемых генов в процессах поддержания жизнедеятельности человека и состояния его здоровья проявляется в таких основополагающих характеристиках демографической структуры населения Сибири, как продолжительность жизни и ассоциированность с развитием мультифакториальных заболеваний различной природы.
3. Полиморфизм исследованных генов в регуляторных областях носит функциональный характер и проявляет свое влияние на течение МФЗ через детерминированность уровня синтеза белковых продуктов с высокой регуляторной активностью.
4. Анализ комплексных генотипов всех исследуемых генов, в качестве единых генетических признаков, существенно повышает степень их ассоциированности с наличием исследованных МФЗ, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных дополнительных лабораторных признаков в клинической практике.
5. Определенные комплексные генотипы анализируемых генов ассоциированы одновременно с несколькими из анализируемых МФЗ.

**Степень достоверности:** Достоверность и обоснованность результатов исследования обеспечена репрезентативной выборкой групп пациентов и групп сравнения; соответствием дизайна исследования поставленным целям и

задачам; использованием современных методов анализа и статистической обработки информации. обработки полученных результатов; научной аргументированностью заключения выводов.

**Апробация работы:** основные положения диссертации представлены на межлабораторных семинарах и ежегодных отчетах НИИ Клинической и Экспериментальной лимфологии (2008-2014гг., Новосибирск), научных советах Межрегионального центра эндозекологической реабилитации (ЦЭЭР), (2010-2012 гг, Новосибирск), а также на российских и международных конференциях: «Проблемы экспериментальной, клинической и профилактической лимфологии». I Сибирский съезд лимфологов с международным участием (2006 г., Новосибирск); «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» Международная конференция (2008г., 2011г., 2013г., Новосибирск); «Профилактика сердечно сосудистых заболеваний в первичном звене здравоохранения» Российская научно-практическая конференция (2008г., Новосибирск); «Опыт и перспективы развития сотрудничества между российскими и тайваньскими учеными в области изучения молекулярно-генетических механизмов развития злокачественных новообразований», Международный симпозиум (2009 г., Томск); «Актуальные проблемы профилактики, диагностики и лечения болезней внутренних органов», городская научно-практическая конференция (2009 г., Новосибирск); V Съезд ревматологов России (2009г., Москва); IV Российский конгресс по остеопорозу (2010 г., Санкт-Петербург); «Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии», Всероссийская научно-практическая конференция (2010 г., Кемерово); УШ Всероссийская конференция по патологии клетки (2010 г, Москва); Всероссийский диабетологический конгресс (2013г., Москва); «Фундаментальные науки - медицине: Актуальные проблемы молекулярной медицины», научная конференция (2013г., Новосибирск); «Инновационные технологии в эндокринологии», Всесоюзный конгресс с участием стран СНГ (2014 г., Москва); VII Всероссийский диабетологический конгресс «Сахарный диабет в 21 веке – время объединения усилий» (2015 г., Москва)

**Публикации:** по теме диссертации опубликовано 76 работ, в том числе 41 статья в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, 29 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций, 6 статей в сборниках.

**Структура и объем работы:** диссертационная работа изложена на 388 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов, и приложения. Работа содержит 112

таблиц. Библиографический список включает 594 источника, из них 74 работ отечественных авторов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

***Пациенты с ишемической болезнью сердца.*** В исследование включены 353 образца ДНК мужчин в возрасте от 35 до 84 лет (средний возраст 53,7 года) с диагнозом ишемическая болезнь сердца (ИБС), из них 223 с острым коронарным синдромом (ОКС) в анамнезе, полученных в НИИ Терапии и профилактической медицины, г Новосибирск. Набор больных осуществлялся на базе 3 кардиологических отделений больниц Новокузнецка в период 2003 - 2004 г.г.

***Пациенты со стенозирующим коронарным атеросклерозом.*** В исследование включены 83 образца ДНК мужчин в возрасте 42-70 лет (средний возраст 56,1 лет) со стенозирующим коронарным атеросклерозом, верифицированным при проведении селективной коронароангиографии (КАГ), полученные в НИИ Терапии и профилактической медицины, г Новосибирск.

***Пациенты с диабетом 2 типа.*** Пациентки с диабетом 2 типа проходили обследование и лечение в Клинике НИИ Клинической и Экспериментальной Лимфологии, Новосибирск. В исследование включены 316 женщин с СД 2 типа в возрасте от 28 до 70 лет (средний возраст 64,79). У 136 (43,04 %) пациентки диагностирована ИБС, у 23 (7,28 %) пациенток в анамнезе инфаркт миокарда (ИМ).

***Пациентки с раком молочной железы.*** В исследование включены образцы ДНК больных инфильтрирующим операбельным раком молочной железы (РМЖ) стадии T1-4N0-3M0 (395 женщин), которые получали оперативное лечение в НИИ онкологии ГНЦ СО РАМН, г. Томск в 1996-2006 годах. возраст женщин на момент заболевания составил 20–79 лет (средний 52,59 лет).

***Пациенты с ревматоидным артритом.*** Пациенты с ревматоидным артритом (РА) проходили обследование в Клинике НИИ клинической и Экспериментальной Лимфологии, Новосибирск. В исследование включены 162 женщины, средний возраст 54,72 лет.

***Группа практически здоровых доноров.*** Группу составили 603 человека, длительное время проживающих на территории Сибирского Федерального округа, европеоидной внешности, идентифицирующих себя и своих родителей как русские, языком общения которых является русский язык. Среди обследованных лиц 193 мужчины и 410 женщины в возрасте от 18 до 69 лет.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, при наличии информированного согласия пациентов.

На поведение исследований получено разрешение локального этического комитета НИИКЭЛ, локальных этических комитетов организаций, предоставивших образцы ДНК.

**Генотипирование.** Геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови стандартными методами. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли спектрофотометрическим методом. Генотипирование генов цитокинов *TNF-A863C*, *TNF-A308G*, *TNF-A238G*, *IL1 $\beta$ -C511T*, *IL1 $\beta$ -C-31T*, *IL2-T-330G*, *IL4-C590T*, *IL6-C174G*, *IL10A-1082G* и *IL10-A592C*; матричных металлопротеиназ *MMP2-C1306T*, *MMP3-5A1167 6A*, *MMP 9 C -1562 T*; гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF A-2578C* и *C+936T* проводили методом ПДРФ анализа, с детекцией в агарозных гелях; в режиме реального времени (Real-Time PCR) с использованием красителя SYBR Green и методики Tag man.

**МНК периферической крови** выделяли на градиенте плотности фиколл/верографин. МНК культивировали в течение 72 часов при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в среде RPMI-1640 с 10% FCS дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина. Культивирование проводили в присутствии конканавалина А (Con A), и в отсутствие митогенной стимуляции.

**Оценку сывороточного уровня** продукции маркеров инсулинорезистентности методом проточной флюорометрии в кондиционной среде МНК проводили с применением технологии xMAP (селективное связывание определяемых цитокинов и сорбированных на поверхности микрочастиц антител) по стандартному протоколу Bio-Plex на проточном флюориметре Bio-Plex (Bio-Rad, США) с использованием тест-системы Bio-Rad. В сыворотке крови больных СД 2 определяли содержание 12 биомаркеров инсулинорезистентности - инсулина, С-пептида, висфатина, резистина, лептина, глюкагона, IL6, TNF- $\alpha$ , грелина, глюкагонподобного пептида (GLP-1), ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), глюкозозависимого пептида (GIP).

**Определение уровня белковых продуктов методом твердофазного иммуноферментного анализа** осуществляли на ИФА анализаторе для планшетов ELx800 (BioTek, Тайвань). У здоровых доноров определялись концентрации воспалительных и провоспалительных цитокинов в спонтанной и стимулированной культуре МНК с использованием стандартизованных наборов: FNOA (пг/мл), ИЛ-1 $\beta$  (пг/мл), ИЛ-4 (пг/мл), ИЛ-6 (пг/мл), ИЛ-10 (пг/мл) производства «Вектор-Бест», Новосибирск. У пациентов с РА проводили количественное определение в сыворотке суммарного ревматоидного фактора (РФ) классов IgG, IgA, IgM, С-реактивного белка (СРБ), с использованием стандартизованных наборов ELISA, Rheumatoid Factor Screen, Orgentec и Bioscience, Bender MedSystems. Данные о концентрации

воспалительных цитокинов и вчСРП в сыворотке крови у пациентов с атеросклерозом проведены и предоставлены НИИ Терапии и профилактической медицины, Новосибирск (Лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний) с использованием стандартизованных наборов ELISAs: TNF- $\alpha$  (пг/мл), ИЛ-1 $\beta$  (пг/мл), IL-1-RA (пг/мл) – Biosource наборы (USA), ИЛ-6 (пг/мл), ИЛ-8 (пг/мл) - Cytimmune наборы (USA), sCD40L (нг/мл) - Bender MedSystems наборы (USA), вчСРП (мг/л) - Biosource набор(USA).

**Методы статистической обработки.** При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели как частота встречаемости аллелей, генотипов и их комбинаций, отношение шансов (OR,) с расчетом 95% доверительного интервала, чувствительность, специфичность. Распределение генотипов исследованных полиморфных локусов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга [Вейр Б.,1995; Реброва О.Ю.,2002]. Для сравнения частот генотипов между группами использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность или точный двусторонний тест Фишера для значений меньше пяти. При множественных сравнениях применялась поправка Бенджамини-Хохберга [Benjamini Y,1995]. Математическую обработку связи генетических признаков с количественными лабораторными показателями проводили методом квантильного анализа [Гланц С., 1998]. Анализ уровня таких показателей, как масса тела, индекс массы тела, систолическое и диастолическое артериальное давление, у носителей разных генотипов проводили с помощью теста Манна-Уитни. Использовался пакет прикладных программ SPSS 13.0.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ЖИТЕЛЕЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**

Существенной проблемой оценки роли любого полиморфизма в развитии патологий является его неоднородность в отдельных популяциях. В связи с этим, популяционный анализ кандидатных генов первичный шаг при исследовании значимости полиморфизма. Проведенный анализ полиморфизма SNP промоторных регионов генов цитокинов *TNF $\alpha$*  -863, (rs1800630), *TNF $\alpha$* -308 (rs1800629), *TNF $\alpha$* -238 (rs 361525), *IL1 $\beta$*  -511 ( rs16944), *IL1 $\beta$* ,-31 (rs1143627), *IL 4* -590 ( rs2243250), *IL6* -174 (rs 1800795), *IL10*-1082 (rs1800896) , *IL10* ,-592 (rs 1800872) и их генотипов среди практически здоровых жителей Западной Сибири европеоидного происхождения в

сопоставлении с данными по другим этническим группам, представленных в электронных базах данных NCBI, Allele Frequencies in Worldwide populations, Opensnp выявил преимущественно европеоидный характер распределения аллелей и генотипов в анализируемой группе, однако наблюдается и ряд этногеографических особенностей, выраженных в смещении распределения частот генотипов *IL4-590*, *MMP3-1171* в сторону их распределения в монголоидных популяциях

Анализ распределения комплексных генотипов генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, фактора роста эндотелия сосудов, образующих генную сеть, в совокупности с половозрастными характеристиками европеоидного населения сибирского региона выявил комплексы, достоверно различающихся по их частоте встречаемости в группе мужчин и женщин. Из 300 статистически значимо преобладающих у женщин, 12 комбинаций не встретились у мужчин ни разу. Аналогично, из 789 преобладающих в группе мужчин, 135 комбинаций не встречаются у женщин. В составе комбинаций, полностью отсутствующих у мужчин, *IL4-590CC* и *IL10-1082 AA*, в составе генотипов, отсутствующих у женщин *IL4-590TT* и *IL10-1082GG*. Провоспалительные цитокины отличаются тем, что в генотипы, отсутствующие у мужчин включен только генотип *IL1β-31CT*, в то время, как среди генотипов, отсутствующих у женщин только гомозиготный генотип дикого типа *IL1β-31TT*. На основании полученных данных можно предположить, что иммунорегуляторный тип мужчин может существенно отличаться от женского типа, что необходимо учитывать при иммуногенетических исследованиях.

Наиболее интегральным и надежным признаком состояния здоровья индивида является продолжительность жизни. Неоднократно были предприняты попытки оценить значимость в процессах долголетия человека различных полиморфизмов фактора роста эндотелия сосудов и генов цитокинов [Capri M.,2006; Del Vo R.,2008]. С использованием квантильного подхода из общей группы обследованных, выделена группа молодого возраста (103 человека) – менее 35 лет и старшего возраста - 55 лет и более – (116 человек). Ряд комбинированных генетических признаков, включающих генотипы генов цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста эндотелия сосудов, которые встречаются в группе молодых лиц с частотой от 10,53% до 44,44 % полностью отсутствуют среди людей старшего возраста. Полностью отсутствующих генотипов в старшей возрастной группе выявлено 736. В группе комбинированных генетических признаков, которые не встречаются в старшей возрастной группе, и представлены с высокой частотой в младшей возрастной группе, *IL10 -1082AG*, *-592CA*, *IL6-174CG*, *VEGF-2578 CA*, *VEGF +936 CC*, *MMP2-1306 TC*, *MMP9-1562CC*. Полученные данные

свидетельствуют в пользу не случайности выбывания определенных комплексных генетических признаков в старшей возрастной категории и предполагают возможную ассоциированность выбывших генетических признаков с рядом широко распространенных в популяции заболеваний, обладающих предрасположенностью к их развитию и ограничивающих продолжительность жизни.

***Комплексная оценка уровня спонтанной и ConA стимулированной продукции цитокинов в кондиционной среде МНК в популяционной группе.***

Цитокины являются участниками сложных сетевых взаимодействий, проявляющихся, в том числе и на уровне их функционального полиморфизма [Koss K., 2000; Reynard M., 2000]. При использовании квантильного подхода, для анализа распределения генотипов анализируемых генов в группах с максимальными значениями концентрации спонтанной и стимулированной продукции TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 (персентиль 75% и выше), с их минимальными значениями (персентиль 25% и ниже) у практически здоровых доноров выявлена корреляция высокой продукции IL-1 $\beta$  с *IL-1 $\beta$ -31 C* аллельным вариантом гена (OR = 5,19 P = 0,0163). Кроме того, показана ассоциированность продукции цитокинов с полиморфизмом ряда каскадно синтезирующихся белковых продуктов. Так, высокий уровень TNF- $\alpha$  позитивно ассоциирован с аллельным вариантом *T* и с гомозиготным генотипом *TT* в позиции *C -590 T* цитокина *IL 4* (OR= 4,40 P=0,0193 и OR= 14,67 P= 0,0379 соответственно). С этим же аллельным вариантом гена *IL4 C-590 T* ассоциирован высокий уровень IL 6 (OR= 4,67 P=0,0401 ) и IL 10 (OR=30,33 P=0,0029), что может быть примером синергического взаимодействия. С низким уровнем IL-1 $\beta$  ассоциирован *C* аллельный вариант гена *IL4* (OR= 6,57 P=0,0147).

В ConA стимулированной продукции высокий уровень продукции IL10 ассоциирован с *IL4 -590 T* аллельным вариантом и *IL4 -590 TT* генотипом (OR= 3,86 P=0,0036 и OR= 9,80 P=0,0069 соответственно), что было показано и для спонтанной продукции этого цитокина. В свою очередь, высокий уровень IL4 наблюдается при наличии *IL10-592 A* аллельного варианта гена и при гомозиготном носительстве *IL10-592 AA* (OR= 2,59 P=0,0264 и OR= 6,48 P=0,0392 соответственно). Аналогичные результаты связи полиморфизма *IL4 C-590T* с продукцией IL10 у здоровых получены чешскими исследователями. При этом, как и в нашей группе, достоверной связи полиморфизма *IL4 C-590T* непосредственно с продукцией IL4 ими выявлено не было [Bartova I., 2014].

Учитывая взаимосвязанность уровней продукции цитокиновой сети мы проанализировали ассоциированность полиморфизма анализируемых генов с высоким/низким уровнем нескольких цитокинов одновременно. В спонтанной

продукции показана ассоциированность одновременно высоких уровней TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  с *IL1 $\beta$ -31C* аллельным вариантом (OR= 5,61 P=0,0351) и обоюдно высокий уровень IL-1 $\beta$  и IL-10 с *IL4-590T* аллельным вариантом гена (OR=29,00 P=0,0096). При анализе ConA стимулированной продукции показана позитивная ассоциированность аллельного варианта гена *IL10-592 A* с высоким уровнем одновременно двух провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL1 $\beta$  (OR= 22,89 P=0,0384). Эта же полиморфная позиция достоверно выше при одновременно высоком уровне стимулированной продукции IL1 $\beta$  и низком уровне IL4 (OR= 13,16 P=0,0302). При одновременно низком уровне IL4 и высоком уровне IL10 достоверно повышена частота *IL4 -590 T* аллельного варианта гена (OR=22,87 P=0,0031). Полученные нами результаты подтверждают данные, выявленные в ряде исследований, где показано, что полиморфизм генов, кодирующих некоторые цитокины или их рецепторы может быть связан не только с собственной продукцией, но и с уровнем других медиаторов [Wallis S., 2011] и может быть следствием сетевых генетических взаимодействий [Liew F., 2002].

#### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**

*Сравнительный анализ полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов у пациентов с ишемической болезнью сердца.* Распределение частот генотипов TNF- $\alpha$  в позициях -863,-308 и -238, IL-1 $\beta$  в позиции -511, -31, IL-6 в позиции -174, IL-10 в позиции -592 практически идентично в группах мужчин, больных ИБС и здоровых мужчин. Частота минорного генотипа *IL-4-590TT* и частота гетерозиготного генотипа *IL-10-1082AG* снижены в группе мужчин с ИБС относительно контрольной группы (OR=0,33 P=0,0110 и OR=0,52 P= 0,0121 соответственно).

Из общей группы пациентов с ИБС были выделены пациенты, перенесшие разные формы ИМ – с зубцом Q и без зубца Q. В группе пациентов с ИМ с зубцом Q достоверно снижена частота *IL4-590TT* генотипа и частота *IL10 -1082AG* гетерозиготного варианта относительно здоровых (OR=0,18 P=0,0012 и OR=0,53 P=0,0207 соответственно). Наличие у пациентов с ИБС *IL10 -1082GG* генотипа противовоспалительного цитокина можно считать фактором риска развития ИМ с зубцом Q (OR=3,97 P= 0,0345).

В последние десятилетия прослеживается отчетливая тенденция увеличения удельного веса молодых пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), начиная с 45-летнего возраста [Оганов РГ.,2012]. У пациентов с генотипом провоспалительного цитокина TNF -863CC и генотипом противовоспалительного цитокина *IL4 -590TT* риск острого коронарного

случая в более раннем возрасте снижается (OR=0,46 P= 0,0367 и OR=0,22 P= 0,0156 соответственно), что подтверждается ранее проведенными исследованиями [Paffen E.,2008]. Учитывая, что в анализируемой нами группе мужчин с ИМ в анамнезе у ряда пациентов наблюдался не один, а от 2 до 5 случаев ИМ в анамнезе в возрасте до 54 лет, была проанализирована ассоциированность генетических особенностей про – и противовоспалительных цитокинов с более высокой предрасположенностью к острому коронарному событию (неоднократному ИМ) ( таблица 1). Показано, что генотип *IL1 -31CC* ассоциирован с повторными ИМ у пациентов, в то время как частота *IL6 -174CC* другого провоспалительного цитокина в группе пациентов с множественными случаями ИМ достоверно снижена (OR=6,69 P= 0,0064 и OR=0,14 P= 0,0429 соответственно).

Таблица 1.

Анализ полиморфизма генов цитокинов у пациентов до 54 лет включительно с несколькими случаями ИМ относительно пациентов с 1 случаем ИМ.

Полиморфная позиция	генотипы	Пациенты с 2-5 случаями ИМ до 54 лет включительно (%)	Пациенты с 1 случаем ИМ до 54 лет включительно (%)	OR	95% CI
		1	2		
<i>IL1 T-31C</i> N <sup>1</sup> =20 N <sup>2</sup> =83	<i>TT</i>	6(30,00)	34(40,96)	0,62	0,19-1,95
	<i>TC</i>	8(40,00)	44(53,01)	0,59	0,20-1,76
	<i>CC</i>	6(30,00)	5(6,02)	6,69*	1,52-30,24
<i>IL6 G-174C</i> N <sup>1</sup> =20 N <sup>2</sup> =112	<i>GG</i>	7(35,00)	28(25,00)	1,62	0,52-4,92
	<i>GC</i>	12(60,00)	54(48,21)	1,61	0,56-4,72
	<i>CC</i>	1(5,00)	30(26,79)	0,14**	0,01-0,99

Примечание. \*  $X^2 = 7,36$  p 0,0064, \*\*  $X^2 = 3,35$  p 0,0429 по двустороннему критерию Фишера

Выявлена ассоциированность ряда генотипов генов цитокинов и с классическими факторами риска развития ИМ. Разница в уровнях систолического АД между больными и здоровыми выявляется только для пациентов с *IL-6 -174CG* и *IL-6 -174GG* генотипами (таблица 2), что связывают, в том числе, и с ассоциированностью полиморфизма с плазменным уровнем IL-6, влияющим на усиление синтеза коллагена и уменьшение его деградации в сосудистой стенке с атеросклеротическим повреждением, приводящее к повышению артериального давления [Signorelli S., 2003]. Кроме того, частота генотипа *IL-1b-31CC* достоверно снижена в группе пациентов с нормальным индексом массы тела относительно здоровых, что дает возможность предполагать протективную роль данного генотипа относительно развития ИМ (OR=0,34 P= 0,0113). Показано, что у носителей *IL1 β -31 CC* генотипа уровни сывороточного общего холестерина и

триглицеридов ниже, а HDL-холестерина выше, чем у носителей *IL1 β -31 TT* генотипа, что может вносить свой вклад в развитие ИМ [Steinbrugger I.,2009 ].

Таблица 2.

Анализ отдельных факторов риска между группой ИМ пациентов и группой здоровых лиц с разными генотипами.

параметры	Пациенты с ИМ	Здоровые лица	p
	Генотип <i>IL-6-174 CC</i>		
	N=43	N=12	
Индекс массы тела	26,29±3,868	23,941±2,885	0,049
АД Систолическое	136,416±17,896	126,360±8,090	0,107
АД диастолическое	89,041±9,406	78,940±5,983	0,002
	Генотип <i>IL-6-174 CG</i>		
	N=106	N=47	
Индекс массы тела	26,59±4,987	24,857±2,854	0,038
АД Систолическое	145,530±25,578	122,660±9,883	0,000
АД диастолическое	93,172±13,851	79,921±3,015	0,000
	Генотип <i>IL-6-174 GG</i>		
	N=51	N=35	
Индекс массы тела	26,72 ±3,505	25,242±2,962	0,047
АД Систолическое	145,00±27,336	125,57±9,217	0,006
АД диастолическое	94,857±14,447	79,861±5,397	0,000

**Сравнительный анализ полиморфизма промоторных регионов генов матричных металлопротеиназ у пациентов с ишемической болезнью сердца.** Не выявлено каких-либо достоверных различий при анализе распределения генотипов *MMP2*, *MMP3* и *MMP9* в группах с ИБС относительно контрольной группы. Анализ ассоциированности полиморфизма *MMP* с развитием ИМ у мужчин в более раннем возрасте (до 54 лет включительно) относительно здоровых мужчин в возрасте до 54 лет включительно показал, что риск развития ИМ достоверно выше у носителей генотипа *MMP35A5A* (OR=2,43 P=0,0455). Показано, что носители аллеля 5A более предрасположены к развитию нестабильных бляшек [Beyzade S., 2003]. Частота *MMP2-1306TT* генотипа в группе пациентов с множественными случаями ИМ достоверно повышена (OR=4,29 P=0,0218).

**Распределение генотипов регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов у пациентов с ишемической болезнью сердца.** Проведенный анализ показал снижение частоты *VEGF-2578AA* генотипа в группах с ИБС и ИМ относительно контрольной группы (OR=0,54 P=0,0413 и OR=0,54 P=0,0434 соответственно)

Выявлено достоверное увеличение в группе пациентов *VEGFA-2578 AC* генотипа и снижение *VEGFA-2578 AA* генотипа относительно здоровых этой же возрастной категории (OR=2,01 P=0,0278, OR=0,48 P=0,0472 ). Эти данные

подтверждаются результатами экспериментальных исследований, в которых показано, что защитными протективными свойствами обладают именно низкие уровни VEGF [Tsutsumi Y.,2005; Zachary I.,2000].

**Комплексный анализ полиморфизма исследуемых генов у пациентов с ишемической болезнью сердца.** Анализ распределения в группах здоровых и мужчин с ИБС комбинированных генетических признаков, представленных в виде комплекса генотипов целого ряда исследованных генов цитокинов *TNF-A863C; TNF-A308G; TNF-A238G;; IL1 $\beta$  T-511C; IL1 $\beta$  C-31T; IL4-C590T; IL6-C174G; IL10- A 1082G* и *IL10-A592C*, матричных металлопротеиназ *MMP2 T-1306C, MMP3-5A6A, MMP9 C-1562T*, фактора роста эндотелия сосудов *VEGF C-2578A, VEGF C+936T* выявил 240 комбинаций позитивно ассоциированных с патологией. Негативно ассоциированных с ИБС комбинаций выявляется 2584, Все позитивно ассоциированные комбинации с высоким уровнем достоверности различий между группами и высоким отношением шанса развития патологии имеют в своем составе *IL4-590CC, IL10-1082AA* и *VEGF2578 CA* генотипы. Негативно ассоциированные комбинации с высоким отношением шанса развития патологии и высоким уровнем достоверности отличает наличие в составе комбинаций *IL4-590TT, IL10-592CC , IL10-1082AG*. В комбинациях, в которых отсутствуют *IL4-590, IL10-1082* выявляются *IL1 $\beta$ -511CC* и *IL1 $\beta$ -31TT* генотипы, в то время как в позитивно ассоциированных генотипах эти полиморфные позиции представлены только гетерозиготами.

**Ассоциированность уровня продукции кардиологических маркеров с полиморфизмом анализируемых генов у пациентов с атеросклерозом, верифицированным ангиографически.** Исследования последних лет показали, что на сывороточные уровни продукции в том числе и кардиологических маркеров влияет множество факторов, включая каскад плеiotропных эффектов, стимулирующих или ингибирующих продукцию того или иного маркера в воспалительном процессе. Исходя из этого, проведен анализ частоты распределения комбинаций генотипов промоторных регионов генов цитокинов *TNF-A863C; TNF-A308G; TNF-A238G; IL1 $\beta$  C-31T; IL2 -T330G, IL4-C590T; IL6-C174G; IL10A-1082G, IL10-A592C*, регуляторных сайтов фактора роста сосудистого эндотелия *VEGF-A2578C, VEGF+T936* с сывороточным уровнем таких лабораторных показателей, как TNFa, IL-1B, IL-1RA, IL6, IL-8, СРБ, CD40 у пациентов с атеросклерозом, верифицированным ангиографически.

Выявлено 23 комплексные генетические комбинации анализируемых полиморфных позиций, позитивно ассоциированные с высокой продукцией TNFa. В большинстве генотипов присутствует генотип *IL10-1082 AA*. Эксперименты *in vitro* показали, что экспрессия *IL-10* в *LPS*-стимулированных моноцитах связана с *TNF- $\alpha$*  по типу отрицательной обратной связи и

свидетельствует о том, что *IL-10* вызывает по принципу отрицательной обратной связи замедление продукции воспалительных цитокинов [Tedgui A, 2001]. Максимальные значения отношения шансов наличия высокой продукции TNF $\alpha$  у этих пациентов достигаются при сочетании в генотипе *IL2 TT -330/IL10-1082 AA/VEGF+936CC* (OR=21,39 P= 0,0058). Два генотипа достоверно ассоциированы с высокими значениями IL-1 $\beta$ . Наличие в генотипе *TNF $\alpha$  -308 GG/ IL1 $\beta$  31TT*, является достоверным фактором наличия у пациентов высокой продукции IL-6 (OR=10,00 P=0,0448). Данное сочетание присутствует во всех трех комплексных генотипах, достоверно ассоциированных с высокими уровнями этого цитокина. С регуляцией высокого уровня IL-8 достоверно ассоциированы 13 сложных генотипов. Примечательно, что ни в одном из генотипов, ассоциированных с высоким уровнем анализируемых белковых продуктов, за исключением именно IL-8 не встречается какой либо из генотипов *IL-6 -174*. Из 13 генотипов, достоверно ассоциированных с высокой продукцией IL-8 генотип *IL-6 CC* входит в состав 4 генотипов, причем именно *IL-6 CC* ассоциирован с высокой продукцией IL-8 и в виде моногенотипа (OR=10,50 P=0,0422). Причем наличие в этих генотипах *IL-6 CC/ TNF-238GG* значительно увеличивает вероятность высокой продукции IL-8 в этой группе пациентов (OR=23,40 P=0,0080). Высокий уровень С-реактивного белка также ассоциирован с рядом комплексных генотипов. Максимальный уровень вероятности высокой продукции CRP обеспечивается у пациентов с генотипами *IL2-330TG/VEGF-2578CA/VEGF+936CC* и *TNF-238GG/IL2-330TT/IL10-1082AG* (OR=10,86 P= 0,0221). Показана ассоциированность высокой продукции CD40 с рядом генотипов. Так, вероятность высокой продукции CD40 у пациента достоверно возрастает при наличии в генотипе *IL2-330TG* (OR=6,93 P= 0,0187). При наличии в генотипе *IL2-330TG/ IL-1 $\beta$  TT* эта вероятность возрастает (OR=12,67 P= 0,0197), а наличие более сложного генотипа *IL2-330TG/ IL-1 $\beta$  TT / TNF-863CC* приводит к еще более чем двукратному увеличению вероятности высокой продукции CD40 (OR=27,88 P= 0,0033). Ряд генотипов ассоциированы с низким уровнем продукции анализируемых кардиомаркеров.

### **ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА**

*Сравнительный анализ полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов у пациенток с сахарным диабетом второго типа.* Распределение частот генотипов *TNF- $\alpha$*  в позиции -238, *IL-1 $\beta$*  -31, *IL-4-590*, *IL-6* - практически идентично в группах женщин, страдающих СД 2 типа и здоровых женщин.

Частота генотипов дикого типа *TNF-α-863CC* и *TNF-α-308 GG* снижена у пациенток с СД2 (OR=0,67 P=0,0193 и OR=0,62 P=0,0141 соответственно), а частота гетерозиготного генотипа *TNF-α-308 GA*, напротив, возрастает до 24,37% у больных относительно 16,04% у здоровых и является фактором риска развития заболевания (OR=1,64 P=0,0084 соответственно). Показано, что у носителей *TNF- 308A* аллельного варианта - при риске развития ожирения на 23 % выше относительно контрольной группы, значительно выше плазменные уровни инсулина [Sookoian S., 2005]. Частоты генотипов противовоспалительного цитокина *IL-10* достоверно различаются в группах в двух анализируемых полиморфных позициях, причем у пациентов возрастают частоты гомозиготных генотипов *IL-101082AA* и *IL-10-592AA* (OR=1,79 P=0,0052 и OR=3,91 P= 0,0007 соответственно) и снижены частоты *IL-101082AG* (OR=0,59 P=0,0054). Эти закономерности сохраняются в группе с отягощенным семейным анамнезом по сахарному диабету 2 типа относительно здоровых. В группе больных женщин, ближайшие родственники которых не страдали этим заболеванием, повышена частота типа *TNFα-863AA* генотипа относительно здоровых (OR=4,92 P= 0,0296).

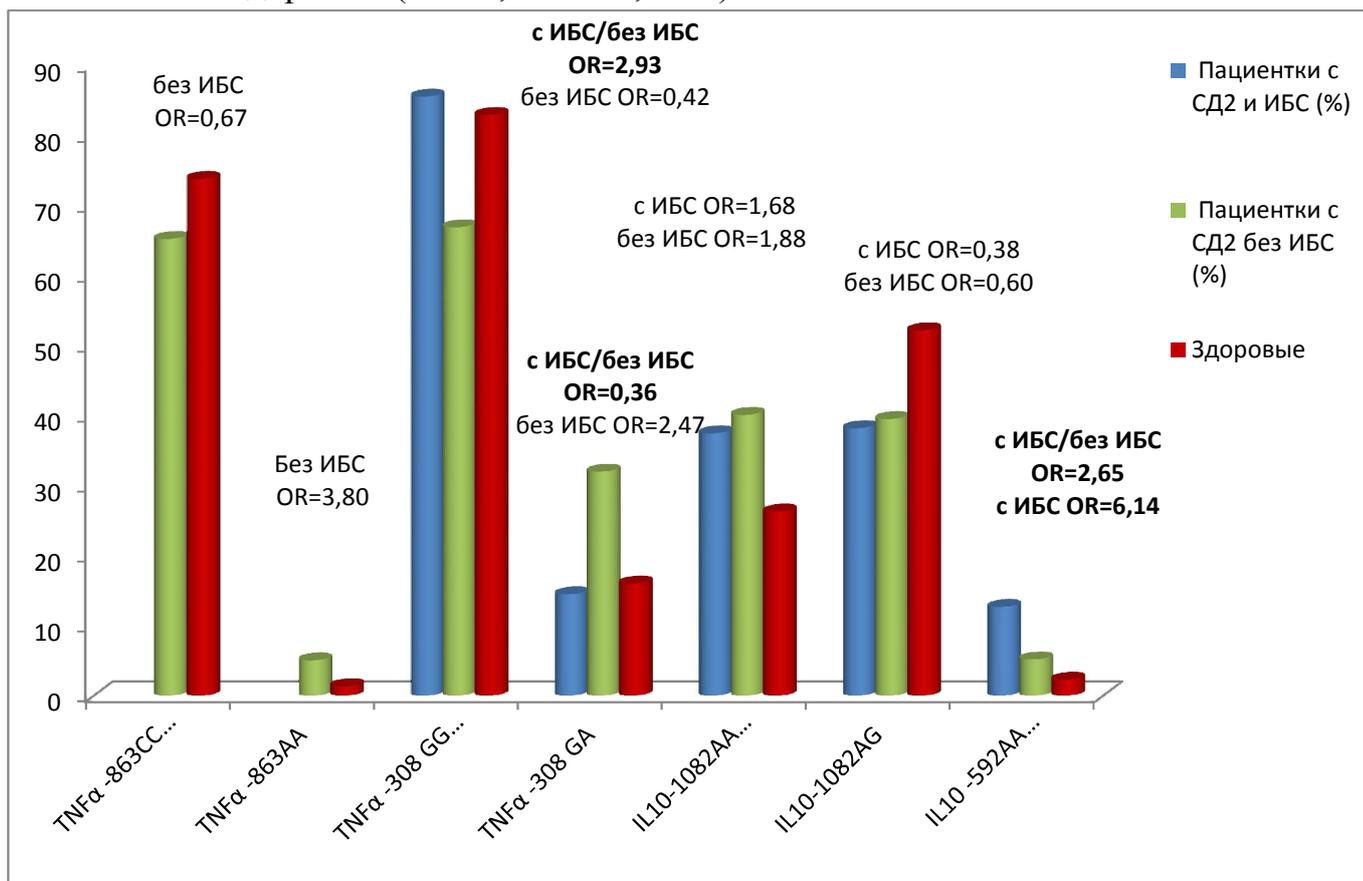


Рисунок 1. Анализ полиморфизма генов цитокинов у пациенток сСД2 и ИБС в анамнезе

У пациенток без признаков ИБС относительно здоровых ( рисунок 1) снижена частота *TNF $\alpha$ -863 CC* и *TNF $\alpha$ -308 GG* (OR=0,67 P=0,0493 и OR=0,42 P=0,00003 соответственно), возрастает частота *TNF $\alpha$ -308 GA* и *TNF $\alpha$ -863 AA* генотипов (OR=2,47 P= 0,00002 и OR=3,80 P= 0,0183соответственно). Между субгруппами пациенток с СД 2 типа с наличием и отсутствием ИБС выявлены инвертированные различия. В субгруппе с ИБС относительно СД2 пациенток без ИБС частота *TNF $\alpha$ -308 GG* генотипа увеличена (OR=2,93 P=0,0002), а частота гетерозиготного варианта гена снижена (OR=0,36 P= 0,0005). Частота *IL-10-592AA* достоверно выше в субгруппе с наличием ИБС относительно пациенток без признаков ИБС ( OR=2,65 P= 0,0332). Ряд авторов, однако, связывают полиморфизм генов воспаления не с развитием непосредственно заболевания, а с факторами с ним ассоциированными, такими, как, например, ожирение [Chang Y.H., 2004; Sookoian S.C., 2005]

**Сравнительный анализ полиморфизма промоторных регионов генов матричных металлопротеиназ у пациенток с сахарным диабетом второго типа.** Анализ ассоциированности полиморфизма промоторных регионов генов *MMP 2*, *MMP3* и *MMP 9* выявил, что в группе пациенток с СД2 достоверно реже встречается гомозиготный генотип *MMP3 6A6A*, (OR =0,46, P= 0,0004), в то время, как гомозиготный генотип *MMP3 5A5A* является фактором риска развития патологии (OR =2,02, P= 0,0165) (таблица 3).

Таблица 3

Анализ частоты генотипов *MMP 2*, *MMP3* и *MMP 9* у пациенток с СД 2 типа относительно здоровых женщин.

полиморфизм	СД 2 типа (%)	Здоровые (%)	OR	95%CI
<i>MMP3-1171</i>	N=296	N=128		
<i>6A6A</i>	87(29,39)	61(47,66)	0,46*	0,29-0,72
<i>5A6A</i>	132(44,59)	48(37,50)	1,34	0,86-2,10
<i>5A5A</i>	77(26,01)	19(14,84)	2,02**	1,13-3,64

Примечание. \* $\chi^2=12,33$  P 0,0004, \*\* $\chi^2=5,74$  P 0,0165, с учетом поправки Йетса

Однако полиморфизм *MMP* генов рассматривают скорее не как фактор риска развития заболевания, а как фактор риска развития сосудистых осложнений [Abilleira S., 2006]. При анализе особенностей генотипов субгрупп пациенток с СД 2 типа с наличием/ отсутствием ИБС выявлено, что частота генотипа дикого типа *MMP3-11715A5A* повышена только у пациенток с СД и ИБС относительно здоровых женщин ( OR =2,38, P =0,0082).

**Сравнительный анализ распределения генотипов регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов** с развитием и особенностями сахарного диабета второго типа не выявил статистически значимых различий.

**Комплексный анализ полиморфизма исследуемых генов у пациенток с**

**сахарным диабетом второго типа.** 746 комплексных генотипа позитивно ассоциированы с заболеванием, из них 32 с высоким уровнем достоверности менее 0,001, 129 позитивно ассоциированных с СД 2 типа комбинаций имеют отношения шансов развития патологии выше 10. Негативно ассоциированных с заболеванием комбинация выявилось 1274, из них 29 комбинаций с уровнем достоверности менее 0,001 и 50 комбинаций со значениями отношения шансов развития заболевания менее 0,05. Среди генов цитокинов, которые вошли в состав позитивно ассоциированных с СД2 комбинированных генетических признаков, высока доля гомозиготных вариантов *IL10-1082AA* и *IL4-590 CC*, *IL1 $\beta$  -31 CC* и *IL6 -174 GG*. Негативно ассоциированные комбинации отличает наличие в составе комбинаций гетерозиготных вариантов указанных выше генов. Кроме того, в позитивно ассоциированных с СД 2 комбинациях полиморфная позиция регуляторного региона *VEGF +936* гена регуляции ангиогенеза присутствует только в виде гомозиготного варианта дикого типа, в то время, как в негативно ассоциированных комбинациях преимущественно в виде гетерозигот. Поскольку данные генетические варианты ассоциированы с различной интенсивностью транскрипции генов, можно предполагать, что комплексный генотип косвенно отражает, в том числе и баланс продукции про/противовоспалительных цитокинов при развитии СД 2 [Spranger J., 2003].

**Анализ ассоциированности комплексных генотипов исследуемых генов с сывороточным уровнем основных лабораторных показателей, анализируемых при сахарном диабете второго типа.** В настоящее время показано, что цитокины могут включаться в патогенез СД2, участвуя в развитии воспаления жировой ткани и в формировании инсулинорезистентности [Шварц В., 2009]. В сыворотке крови больных определяли содержание 12 биомаркеров инсулинорезистентности - инсулина, С-пептида, висфатина, резистина, лептина, глюкагона, IL6, TNF- $\alpha$ , грелина, глюкагонподобного пептида (GLP-1), ингибитора активатора плазминогена (РАI-1), глюкозозависимого пептида (GIP). Из 12 исследованных показателей лишь у 3 из них высокие уровни исследованных лабораторных показателей ассоциированы с генотипами генов цитокинов (таблица 4).

Таблица 4.

Генотипы, ассоциированные с высокими уровнями биологически активных пептидов у пациентов с СД2.

Лабораторный показатель	Полиморфная позиция	генотип	OR	OR_CI95
Лептин	IL6-174:VEGF2578	GC-CA	9,44	1.69 - 52.73
Лептин	TNF-238:IL6-174:VEGF2578	GG-GC-CA	7,65	1.37 - 42.71
РАI1	TNF-238:IL6-174	GG-GC	7,80	1.69 - 36.06
РАI1	TNF-863:TNF-238:IL6-174	CC-GG-GC	7,80	1.69 - 36.06
РАI1	TNF-238:IL6-174:VEGF2578	GG-GC-CA	5,25	1.09 - 25.21

Резистин	TNF-308	GA	12,00	1.33 - 108.68
Резистин	TNF-308:TNF-238	GA-GG	10,50	1.14 - 96.58
Резистин	IL6-174:VEGF2578	GC-CA	7,65	1.37 - 42.71

Из четырех комплексных генотипов, ассоциированных с низким уровнем IL6, ведущим мотивом является *IL6-174 GG:VEGF- 2578 CA* (OR=0.05 P= 0.0083). Четыре сложных генотипа ассоциированы с низким уровнем TNF-  $\alpha$ , максимальная сила ассоциированности при этом у генотипа *TNF-863 CC:IL10-592 CC:VEGF-2578 CA* (OR=0.13 P= 0.0234). 11 комплексных генотипов ассоциированы с низким уровнем инсулина. При этом в виде моногенотипа с генотипом *IL1 $\beta$ -31 TT* (OR=0.05 P= 0.0060). Этот же генотип входит в состав всех 11 комплексов. Эти данные согласуются с тем, что провоспалительные цитокины ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- $\alpha$ , участвующие в формировании воспалительной реакции, угнетающе действуют на продукцию инсулина бета-клетками поджелудочной железы, вызывая торможение секреции инсулина [Бояджян А., 2008]. У шести комплексных генотипов, ассоциированных с низким уровнем сывороточной продукции лептина два ведущих генотипа: *IL10-592CA* в комплексе с полиморфным генотипам *TNF-238GG, -308GG, -863CC* и *IL6-174 GG* в комплексе с *VEGF-2578 CA* и *TNF-238GG, -308GG, -863CC*. Предполагается, что полиморфизм *TNF G-308A* может быть независимо связан с уровнем лептина, независимо от наличия инсулинорезистентности и гипергликемии [Gupta V., 2012]. Низкие сывороточные уровни резистина и глюкозозависимый пептид (GIP) ассоциированы с единственными комплексами: *TNF-308 GG:TNF-238 GG:IL6-174-GG* и *TNF-238 GG:IL1 $\beta$ -31 TC:VEGF-2578 CA* соответственно (OR=0.10 P= 0.0422 и OR=0.10 P= 0.0422 соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о функциональной значимости изученных полиморфных сайтов, в том числе и для иммунопатологических механизмов, и обосновывает их рассмотрение при развитии СД 2 типа.

### **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И АССОЦИИРОВАННОСТЬ С ХАРАКТЕРОМ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

*Сравнительный анализ распределение аллельных вариантов и генотипов генов цитокинов у женщин с раком молочной железы.* При анализе распределения частот генотипов промоторного региона гена *IL-10* показано, что у пациенток с РМЖ частота генотипа *IL-10-592AA* возрастает в три раза относительно группы здоровых женщин (OR=3,33 P= 0,00331) и является потенциальным фактором риска развития патологического процесса, увеличена частота генотипа *IL-10-1082AA* (OR=2,22 P= 0,000139) при

статистически значимом снижении в группе больных гетерозиготного генотипа в этой позиции (OR=0,37 P= 0,0000005). Показано, что у женщин с более высокой экспрессией *IL-10*, обусловленной генетическим полиморфизмом, риск развития рака молочной железы значительно ниже [Brower V.,2005; Langsenlehner U., 2005]. Частота минорного генотипа *TNFα-863 AA* увеличена в группах с наследственными онкопатологиями и наследственным РМЖ до 3,92% и 7,15% соответственно, относительно группы без наследственной онкоотягощенности (Таблица 5.) Частота этого редкого генотипа достоверно увеличена и у пациенток с РМЖ в семейном анамнезе относительно здоровых женщин (OR=5,49 P= 0,02), что позволяет рассматривать носительство данного генотипа как определенный наследственный фактор предрасположенности к патологии.

Таблица 5.

Распределение генотипов цитокинов у пациенток с наследственной отягощенностью онкопатологиями и без онкоотягощенности

генотипы	РМЖ с отягощ. онкопат..	РМЖ с отягощ. РМЖ	РМЖ без онко отягощ.	OR (1/ 3)	95% CI	OR (2/ 3)	95% CI
<i>TNFα C-863A</i>	1	2	3				
CC	112(73,20)	39(69,64)	139(76,37)	0,85	0,50-1,43	0,71	0,35-1,46
CA	35(22,88)	13(23,21)	43(23,63)	0,96	0,56-1,65	0,98	0,45-2,09
AA	6(3,92)	4(7,15)	0	16,08*	0,00-0,00	31,28**	0,00-0,00

Примечание. N<sup>1</sup>=153, N<sup>2</sup>=56, N<sup>3</sup>=182; \*X<sup>2</sup> 5,21 P=0,0085 , \*\* X<sup>2</sup> 9,25 P=0,0028 точным двусторонним методом Фишера

Сравнительный анализ возрастных групп развития заболевания до 35 лет и после 35 лет относительно здоровых женщин показал увеличение частоты минорного генотипа *IL10-1082AA* у пациенток обеих групп (OR= 4,48 P= 0,02 и OR=2,33 P= 0,00005 соответственно) при снижении гетерозиготности в группах больных (OR=0,08 P=0,005 и OR=0,36 P=0,0000004 соответственно) и увеличение частоты генотипа *IL10-592AA* в старшей возрастной группе относительно здоровых женщин (OR=3,38 P= 0,004), что повторяет картину в общей группе.

**Сравнительный анализ распределение аллельных вариантов и генотипов генов матричных металлопротеиназ у женщин с раком молочной железы.** Одним из главных молекулярных механизмов, лежащих в основе инвазии и метастазирования опухолей, считается разрушение окружающей базальной мембраны и внутриклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами [Hanahan D., 2011]. Анализ

ассоциированности полиморфизма промоторных регионов генов *MMP 2*, *MMP3* и *MMP 9* выявил, что в группе здоровых женщин достоверно чаще встречается гомозиготный генотип дикого типа *MMP36A6A* (OR =0,46, P= 0,0005) и минорный гомозиготный генотип *MMP 9-1562TT* (OR =0,22, P= 0,0067), в то время, как гетерозиготный генотип *MMP3 5A6A* является фактором риска развития патологии (OR =1,61, P= 0,0344) ( таблица 6). Риск лимфатического метастазирования снижен у пациенток с *MMP9-1562CC* генотипом. Напротив, гетерозиготный генотип может рассматриваться как фактор риска метастазирования (OR =0,60, P = 0,0389 и OR =1,66, P= 0,0389 соответственно).

Выявлена асоциированность гетерозиготного варианта *MMP3 5A6A* со степенью злокачественности опухоли. Частота этого генотипа достоверно снижается по мере повышения степени злокачественности (OR =0,23, P= 0,03 и OR =0,19, P= 0,04 III степень злокачественности относительно I и II степени злокачественности опухоли соответственно).

Таблица 6

Анализ частоты генотипов *MMP 2*, *MMP3* и *MMP 9* у пациенток с РМЖ относительно здоровых женщин.

полиморфизм	РМЖ (%)	Здоровые (%)	OR	95%CI
<i>MMP3-1171</i>	N=320	N=128		
<i>6A6A</i>	95(29,68)	61(47,66)	0,46*	0,30-0,72
<i>5A6A</i>	157(49,07)	48(37,50)	1,61**	1,03-2,50
<i>5A5A</i>	68(21,25)	19(14,84)	1,55	0,86-2,81
<i>MMP9-1562</i>	N=390	N=329		
<i>CC</i>	280(71,79)	229(69,60)	1,11	0,79-1,55
<i>CT</i>	106(27,18)	85(25,84)	1,07	0,76-1,52
<i>TT</i>	4(1,03)	15(4,56)	0,22***	0,06-0,71

Примечание. \* $X^2=12,33$  P 0,00047, \*\* $X^2=4,47$  P 0,0344, \*\*\* $X^2=7,34$  P 0,0067 с учетом поправки Йейтса

**Сравнительный анализ распределения генотипов регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов с развитием и особенностями течения рака молочной железы.** Ангиогенез и лимфангиогенез, в котором по последним данным также участвует VEGFA, непосредственно промотирует формирование метастазов в лимфатических узлах в пределах дренажного бассейна опухоли [Yabushita H., 2003]. Сравнение частот *C-2578A* генотипов в группах женщин, больных РМЖ и практически здоровых женщин выявило статистически значимое повышение частоты генотипа *-2578AA* в группе больных РМЖ при достоверном снижении частоты генотипа дикого типа (Таблица 7).

Различий в распределении частот *C+936T* генотипов в оппозитных группах установлено не было.

Таблица 7.

Распределение частот генотипов *VEGFA* в популяции практически здоровых женщин сибирского региона и пациенток с РМЖ

<i>VEGFA</i>		Пациентки и с РМЖ %	Здоровые	OR	95%CI
		1	2		
C-2578A	CC	80(20,56)	82(27,99)	0.66*	0.45-0.95
N <sub>1</sub> =389	AC	202(51,93)	161(54,95)	0.91	0.66-1.24
N <sub>2</sub> =293	AA	107(27,51)	50(17,06)	1.81**	1.22-2.69

Примечание. \* $\chi^2$  5,08 P=0,0241, \*\* $\chi^2$  9,14 P=0,00249, \*\*\* $\chi^2$  5,84 P=0,0156

Частота *-2578CA* генотипа достоверно снижалась в группах пациенток с наследственной отягощенностью онкопатологиями и РМЖ относительно группы пациенток без наследственной онкоотягощенности, (OR=0,50 P= 0,002 и OR=0,50 P= 0,03 соответственно). При анализе частоты встречаемости генотипов *VEGF* у пациенток с наследственной онкоотягощенностью и без таковой относительно здоровых женщин, выявлено достоверное снижение гетерозиготности в позиции *-2578* у пациенток с общей онкоотягощенностью относительно здоровых (OR=0,62 P=0,02) и возрастание гетерозиготности в позиции *+936* в этой же группе относительно здоровых (OR=1,70 P= 0,02).

Отношения шансов развития патологии достоверно выше у пациенток с гетерозиготным генотипом *VEGFA -2578* с сохраненным менструальным статусом, чем у пациенток с перименопаузой и постменопаузой одной возрастной группы - после 35 лет (OR= 1,63 P= 0,036). Исследователи связывают это с более низким уровнем *VEGF* в плазме крови [Nobuhiko K., 2006]. Частота гетерозиготного варианта *-2578 CA* снижена (OR= 0,44, P= 0,012) в группе пациенток в пре-и постменопаузе с лимфогенным метастазированием относительно женщин с сохраненным менструальным статусом и отсутствием метастазов, где данный генотип не встретился ни разу.

Неоангиогенез в опухолях тесно связан с наличием эстрогеновых и прогестероновых рецепторов (ER и PR) [Крицкая Н., 2007]. Крайне важным представляется учет наличия в опухолевых тканях пациенток тирозин - киназного рецептора к эпидермальному фактору роста HER -2/neu. Его коварство заключается не только в способности стимуляции опухоли своего роста, но также в вовлечении стромы в экспрессию рецепторов к самому фактору с последующей "косвенной" индукцией опухолевого роста (так называемый "двойной" механизм опухолевой прогрессии) [Nunes R.,2002]. Анализ полиморфизма *VEGFA* гена с РМЖ с учетом результатов иммуногистохимического исследования опухолевой ткани (ER, PR, Her-2/neu) выявил значительное повышение частоты встречаемости гетерозиготного

генотипа  $-2578 AC / +936CT$  в группе пациенток с наличием эстрогеновых рецепторов в опухолевых тканях (OR= 0,46, P= 0,03). Кроме того, выявлены генотипы, частоты которых достоверно выше в группе PR-позитивных женщин относительно PR-негативных:  $-2578 AA$  (OR= 1,89, P= 0,04) и  $-2578 AA/+936CC$  (OR= 2,20, P=0,02). Данные закономерности сохраняются у пациенток с ER+/PR+ статусом опухоли относительно пациенток с ER-/PR- статусом опухоли:  $-2578 AA/+936CC$  (OR=2,46,P= 0,04) и  $-2578 AC /+936CT$  (OR= 0,38, P= 0,02).

Риск развития рецидивов за период 5 лет у обследуемых женщин оказался достоверно выше у носительниц генотипа  $+936CC$  относительно пациенток без возникновения рецидива за период наблюдения (OR=1,42 P=0,02). Гетерозиготный вариант  $+936CT$  *VEGFA* гена в группе с наличием рецидивов не встречался ни в одном случае в отличие от пациенток без рецидивирования заболевания, где этот генотип выявлялся в 27,7% случаев.

**Комплексный анализ полиморфизма исследуемых генов у пациенток с раком молочной железы.** Уникальных генетических комбинаций, позитивно ассоциированных с РМЖ, выявлено 650, причем в большинстве комбинаций присутствует генотип *IL10-1082AA*. Генотипы *IL10-1082AG* и *IL10-1082GG* не встречаются в индивидуальных позитивно ассоциированных генетических комбинациях, характерных для пациенток с РМЖ ни разу. 8 из этих комбинаций с очень высоким уровнем достоверности (P=0,0000) по двустороннему критерию Фишера. Примечательно, что такой уровень достоверности достигается при одновременном носительстве *IL10-1082AA* и *MMP9-1562CC* генотипа. В 37 комбинациях генотипов отношения шансов развития заболевания выше 10, при максимальном значении OR =23,19 для генотипа *TNF-863 CC/IL4-590 CC/IL10-592 AA/MMP9-1562CC*, что позволяет выявлять группы с очень высоким риском развития заболевания. В 26 характерных для РМЖ комбинаций с высоким риском развития патологии присутствует генотип *MMP9-1562 CC*, в 18 генетических комбинациях присутствует генотип *IL10-1082AA*, десять комбинаций содержат *IL10-592AA* генотип. *IL6 -174* в позитивно ассоциированных с РМЖ комбинациях с высоким отношением шансов развития патологии и высоким уровнем достоверности представлен либо гетерозиготным генотипом, либо *IL6 -174GG* генотипом. *VEGF -2578* представлен в комбинациях *VEGF-2578 AA* генотипом.

Отмечается явный дисбаланс числа комбинаций генотипов, позитивно ассоциированных с предрасположенностью к развитию РМЖ к числу негативно ассоциированных с развитием данной болезни, которых выявлено 3425. У 24 из данных комбинаций уровень достоверности по двустороннему критерию Фишера достигает P 0,0000. Во всех высоко достоверных комбинациях

присутствует *IL10-1082 AG* генотип, не встречающийся в позитивно ассоциированных комбинациях для РМЖ. Кроме того, *IL10-1082 AG* генотип содержится в большинстве всех негативно ассоциированных с РМЖ генотипов. 538 резистентных к заболеванию генотипов достигают значения менее 0,1. Из них 78 генотипов со значениями OR менее 0,05. В 57 из 78 генотипов также присутствует *IL10-1082 AG* генотип. В восьми комбинациях генотип *MMP9-1562 TT*, в семи *VEGF2578CC* при отсутствии *IL10-1082 AG*. Кроме того, в комплексном генотипе при отсутствии *IL10-1082 AG* генотипа появляются редкие генотипы *TNF-238AG* и *TNF-308AG*, отсутствующие в положительно ассоциированных генотипах для РМЖ.

Именно комплексный анализ отражает более полную картину сетевых взаимодействий при развитии патологии, что, несомненно, более ценно при скрининговых исследованиях.

### **ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ АССОЦИИРОВАННОСТЬ С ХАРАКТЕРОМ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

*Сравнительный анализ распределения генотипов генов цитокинов у женщин с ревматоидным артритом.* Распределение частот генотипов *TNFα* в позициях -863 и -238, *IL-1b* -31, *IL-4*-590, *IL-6* - практически идентично в группах женщин, больных РА и здоровых женщин. Частота генотипа дикого типа *TNFα-308 GG* снижена у пациенток с РА, а частота гетерозиготного генотипа в этой полиморфной позиции, напротив, возрастает до 27,16% у больных относительно 16,04% у здоровых и является фактором риска развития заболевания (OR=0,52 P= 0,0043 и OR=1,95 P= 0,0041 соответственно). Частоты генотипов противовоспалительного цитокина *IL-10* достоверно различаются в группах в двух анализируемых полиморфных позициях, причем у пациентов возрастают частоты гомозиготных генотипов *IL-101082AA* и *IL-10-592AA* (OR=1,94 P= 0,0059 и OR=4,02 P= 0,0022 соответственно) и снижены частоты *IL-101082AG* и *IL-10-592CC* (OR=0,38 P= 0,00003 и OR=0,66 P= 0,0366 соответственно). Рассматривается как собственный вклад полиморфизма гена *TNFα*, так и его возможное неравновесное сцепление с генами HLA региона, а один из возможных механизмов ассоциированности полиморфизма *IL-10* предполагает, что низкое содержание IL-10 может способствовать развитию РА за счет смещения баланса в сторону воспалительных цитокинов [Rego-Pérez I.,2008; Rodriguez-Carreón A., 2005].

Ревматоидный фактор определялся в крови у 122 женщин (75,78%) и 39 (24,22%) женщин считались серонегативными. Показано, что достоверные

различия распределения частот генотипов гена *TNF $\alpha$ -308* сохраняются только для группы серонегативных пациенток относительно здоровых, причем значения отношения шансов при выделении серонегативной группы возрастают по сравнению с общей группой больных: *TNF $\alpha$ -308 GG* (OR=0,33 P=0,0026), *TNF $\alpha$ -308 GA* (OR=3.27 P= 0,0012). В группе серопозитивных пациенток выявляются достоверные различия относительно здоровых женщин только по двум полиморфным позициям гена *IL-10*. У пациенток возрастают частоты генотипов *IL-10 -1082AA* и *IL-10-592AA* (OR=1,85 P= 0,0184 и OR=4,61 P= 0,0010 соответственно) и снижены частоты *IL-101082AG* и *IL-10-592CC* (OR=0,34 P= 0,00003 и OR=0,62 P= 0,0325 соответственно). Выявляется тенденция снижения частоты *IL-4-590 CC* (OR=0,43 P= 0,0525) и увеличение частоты *IL-6-174GG* (OR=2,96 P= 0,0502), показанные для ряда популяций [Soroka N.E., 2010].

Частота генотипа дикого типа *TNF $\alpha$ -308 GG* снижена у пациенток с РА без наличия узелков, а частота гетерозиготного генотипа в этой полиморфной позиции, напротив, возрастает в этой группе пациенток относительно здоровых (OR=0,48 P= 0,0174 и OR=2,12 P= 0,0343 соответственно). У пациентов этой группы возрастают частоты гомозиготных генотипов *IL-101082AA* и *IL-10-592AA*, (OR=2,06 P= 0,0097 и OR=4,37 P= 0,0039 соответственно) и снижены частоты *IL-101082AG* и *IL-10-592CC* (OR=0,42 P= 0,00018 и OR=0,58 P= 0,0237 соответственно). В группе пациенток с наличием ревматоидных узелков сохраняется снижение частоты гетерозиготного генотипа *IL-101082AG* относительно здоровых (OR=0,37 P= 0,0174) и выявляется повышение частоты *IL-101082GG* генотипа относительно здоровых (OR=2,42 P= 0,0343).

**Сравнительный анализ распределения генотипов генов матричных металлопротеиназ у женщин с ревматоидным артритом.** Анализ ассоциированности полиморфизма промоторных регионов генов *MMP 2*, *MMP3* и *MMP 9* выявил, что в группе здоровых женщин достоверно чаще встречается гомозиготный генотип *MMP36A6A* (OR =0,59, P =0,0376). Показано, что 6A аллельный вариант связан двукратным понижением транскрипционной деятельности *MMP3* [Kim J., 2002], что и может объяснять меньшую степень деструкции суставов при развитии заболевания.

**Сравнительный анализ распределения генотипов регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов с развитием и особенностями ревматоидного артрита.** Различий в распределении частот *VEGFC-2578A* и *VEGFC+936T* генотипов в оппозиционных группах установлено не было. Показано повышение частоты *VEGF -2578 CC* генотипа, только у пациенток с РА с наличием ревматоидных узелков. Предполагают, что ревматоидные узелки представляют собой не что иное как омертвление тканей

вокруг воспаленных мелких кровеносных сосудов, с накоплением в них иммунных комплексов и ревматоидного фактора, что может поддерживаться высокой транскрипционной активностью *VEGF*, предшествующей образованию узелковых образований [Chen Y., 2011].

**Комплексный анализ полиморфизма исследуемых генов у пациенток с ревматоидным артритом.** 947 уникальных генетических комбинаций позитивно ассоциированы с РА, причем 30 сложных генотипов с уровнем достоверности до 0,001. Выявлено 169 комплексных генотипа со значением отношения шансов развития заболевания выше 10, из них 92 комплексных генотипа обладают значениями величины отношения шансов 17.98-25.12. Максимальные значения отношения шансов развития РА в комплексных генотипах *IL1β-31 TC:IL10-592 AA:VEGF-2578 CA* (OR =25,01, P = 0,0017), *TNF-863 CC:IL1β-31 TC:IL10-592 AA:VEGF-2578 CA* (OR =25,01, P = 0,0017), *IL1β-31 TC:IL4-590 CC:VEGF-2578 CA:MMP2-1306 TT* (OR =25,12, P = 0,0008). 1455 комбинаций негативно ассоциированы с заболеванием. Для позитивно ассоциированных комплексных генотипов характерно наличие *IL10-1082AA*, *IL10-592AA*, *VEGF -2578CA* или *VEGF -2578AA* генотипов. Негативно ассоциированные комбинации генотипов, напротив, характеризуются наличием в составе *IL10-1082AG* и *IL10-592CC* генотипов, *VEGF-2578CA* либо *VEGF-2578CC* генотипа.

**Ассоциированность уровня продукции ревматоидного фактора и С – реактивного белка с полиморфизмом анализируемых генов у пациентов с ревматоидным артритом.**

Выявлено 10 комплексных генетических комбинации анализируемых полиморфных позиций, позитивно ассоциированных с высокой продукцией СРБ. В состав 8 из этих генотипов входит *IL1β-31TC* как в виде моногенотипа, так и в составе 2- и 3- локусных комплексов, причем максимальное значение отношения шансов наличия высокой продукции СРБ при наличии в комплексе *IL1β-31 TC:IL6-174 GC* (OR=5,57 P= 0,0386). Еще два генотипа содержат в составе *IL6-174 CC : VEGF2578 CA* в двухлокусном генотипе и трехлокусном генотипе *TNF-238 GG:IL6-174 CC:VEGF-2578 CA* (OR=5,00 P= 0,0278, OR=5,64 P= 0,0379). 19 генотипов позитивно ассоциированы с высокой продукцией РФ у пациентов с РА. В составе 13 сложных генотипов присутствует *IL4-590CT*. Этот же генотип ассоциирован с высокой продукцией РФ и в виде моногенотипа. В составе трех генотипов выявлен *IL6-174 GG*. Показано, что IL-6 способствует развитию дисбаланса между Th17 и регуляторными Th и продукции аутоантител, таких, как РФ [Tanaka T.,2013]. В двух генотипах комплекс *IL1β-31 TT:IL10-592 CA*. Максимальное значение отношения шансов наличия высокого уровня РФ у носителей генотипов *IL1β-31*

*TT:IL10-592 CA; TNF-308:IL4-590:VEGF2578 GG-CT-CA; TNF-238:IL1β-31:IL10-592 GG-TT-CA; TNF-308:TNF- GG-GG-CT-CA 238:IL4-590:VEGF2578* (OR =6,67 P= 0.0230 для всех приведенных генотипов).

С низкой продукцией СРБ ассоциировано 16 генотипов, включая низкоэкспрессирующий моногенотип *VEGF-2578AA* (OR=0,22 P=0.0349). Эти данные коррелируют с представленными ранее данными, о том, что *VEGF-2578 AA* ассоциирован с более низким индексом активности РА DAS28 [Chen Y.,2011 ].

В сложном генотипе *TNF-238 GG:VEGF-2578AA* (OR=0,22 P=0.0349) значения отношения шансов не изменяются. Можно предположить, что включенный в комплекс *TNF-238 GG* не имеет функциональной значимости в отношении уровня продукции СРБ в данном комплексном генотипе. В семи комплексах присутствует *IL1β-31TT*. Наибольший шанс наличия низкой продукции СРБ у носителей генотипов *IL1β-31TT:IL4-590CT:IL10-592CC* и *TNF-238GG:IL1β-31 TT:IL4-590 CT:IL10-592CC* (OR=0,10 P=0.0272 для двух комплексов). Можно сделать аналогичное предположение- включенный в комплекс *TNF-238 GG* не имеет функциональной значимости в отношении уровня продукции СРБ в данном комплексном генотипе. В 6 комплексах присутствует *IL4-590 CT:IL6-174GC* (OR=0,17 P=0.0097). Причем *TNF-863CC*, включенный в комплекс *IL4-590 CT:IL6-174GC*, существенно изменяет значения OR (OR=0,09 P=0.0139), а включение в комплекс *TNF-238GG* в этих генотипах не приводит к изменению значений отношения шансов.

С низким уровнем РФ в сыворотке ассоциировано 20 генотипов, из них в виде моногенотипа *IL4-590 CC* с низким уровнем экспрессии. При этом *IL4-590 CC* присутствует во всех 19 комплексных генотипах в различных сочетаниях. Частота именно этого генотипа выше у серонегативных пациентов с РА в анализируемой нами группе. Максимальное значение отношения шансов наличия низкой продукции РФ у носителей генотипа *IL1β-31 TT:IL4-590 CC:IL10-592 CC:VEGF-2578CA* (OR=0,11 P=0.0272).

Представленные данные показывают, что определение таких показателей может быть использовано для оценки риска возникновения РА.

### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОБЩИХ И ЧАСТНЫХ КОМПЛЕКСНЫХ ГЕНОТИПОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С АНАЛИЗИРУЕМЫМИ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

Клинически различные заболевания могут контролироваться синтропными генами [Пузырев В., 2009]. При синтропном влиянии сигнальные сети под влиянием генов восприимчивости индивидуально либо совместно могут провоцировать развитие не одной, а нескольких болезней. Болезни могут быть связаны между собой как положительно, так и обратно

пропорционально [Proal A., 2009]. Существует целый ряд вариантов связи генных сетей с предрасположенностью к таким тяжелым социально значимым болезням, как СД2, РА, РМЖ, ИБС, показанное в предыдущих главах. Разные по патогенезу заболевания ассоциированы и с наличием в геноме пациентов одних и тех же наборов полиморфных вариантов генных сетей. В таблице 8 представлено количество сложных генотипов позитивно и негативно ассоциированных одновременно с двумя из анализируемых заболеваний.

Распространенность ССЗ среди пациентов с СД 2 типа более чем в 4 раза превышает таковую у лиц без данного заболевания, т.е. патологические процессы, характерные для СД 2 типа является предпосылками риска развития ИБС [Куликова А., 2007]. Несмотря на различия по частоте встречаемости комплексных генотипов в группе здоровых мужчин и женщин, выявлены 22 позитивно ассоциированных с двумя патологиями комплексных генотипа. Наиболее высокий уровень отношения развития СД 2 (OR= 6,34) и одновременным отношением шансов развития ИБС (OR=5,89) у носителей генотипа *TNF-308GG:TNF-238GG-:IL10-1082AA:VEGF-2578 CA:VEGF+936 CC: MMP9-1562CC*.

Таблица 8

Количество сложных генотипов позитивно и негативно ассоциированных одновременно с двумя заболеваниями.

Позитивные комбинации	РА (%) N=947	СД2 (%) N=746	РМЖ (%) N=650	ИБС (%) N=126
РА	❖	210 (28,15)	214 (32,92)	27 (21,43)
СД2	210 (22,18)	❖	139 (21,38)	22 (17,46)
РМЖ	214 (22,60)	139 (18,63)	❖	13 (10,31)
ИБС	27(2,85)	22 (2,94)	13 (2,00)	❖
Негативные комбинации	РА (%) N=1455	СД2 (%) N=1274	РМЖ (%) N=3425	ИБС (%) N=1246
РА(N=1455)	❖	462(36,26)	871(25,43)	61 (4,89)
СД2	462 (31,75)	❖	534 (15,59)	23 (1,85)
РМЖ	871 (59,86)	534 (41,91)	❖	84 (6,74)
ИБС	61(4,19)	23 (1,81)	84 (2,45)	❖

Примечание. N- количество индивидуально ассоциированных с заболеванием сложных генотипов, в скобках представлена доля общих генотипов в % для данного заболевания

В структуре причин преждевременной смертности при РА наибольший удельный вес приходится на ИБС и ее осложнения [Aubry M., 2007]. Показана причинно-следственная связь эндотелиальной дисфункции и развития коронарного атеросклероза у пациентов с РА [Мазуров В., 2009], что может предполагать единые молекулярно-генетические особенности предрасположенности к развитию двух заболеваний. Выявлено 27 сложных

генотипов, ассоциированных одновременно и с РА и ИБС. Наибольшее значение отношения шансов развития РА (OR=7,61) для генотипов *TNF-308GG:IL10-1082AA:VEGF-2578CA:VEGF+936 CC:MMP9-1562 CC* и *TNF-308 GG:TNF-238 GG:IL10-1082 AA:VEGF-2578 CA:VEGF+936 CC:MMP9-1562CC* и одновременном отношении шансов развития ИБС (OR=5,89 и OR=5,34 соответственно). Структура генотипов одновременно позитивных для ИБС, РА, СД2 - только низкоэкспрессирующие гомозиготные генотипы противовоспалительных цитокинов, генотип, ассоциированный с высоким уровнем экспрессии регуляторного региона в позиции +936 гена *VEGF* и ассоциированный с низким уровнем продукции генотип *MMP9 -1562CC*. Воспалительный цитокин *IL1β-31* и *VEGF-2578* представлены в гетерозиготном виде. Обращает на себя внимание, что среди генотипов, позитивно ассоциированных с СД2/ИБС и РА/ИБС более половины, а именно 21 генотип позитивно ассоциированы одновременно с 3 заболеваниями - РА, СД2 типа и ИБС.

В группах пациентов, представленных только женщинами, 101 комплексный генотип позитивно ассоциирован одновременно с тремя заболеваниями. Значения отношения шансов развития заболеваний при этом высоки: *TNF-863 CC-:IL4-590 CC:IL10-592 AA* - РА (OR=15,55), СД2 (OR=12,21) и РМЖ (OR=14,37); *TNF-863 CC:TNF-308 GG:IL4-590 CC:IL10-592AA* - РА (OR=10,96), СД2 (OR=12,21) и РМЖ (OR=11,40). Представленные в составе комплексов гомозиготные генотипы про- и противовоспалительных цитокинов ассоциированы с низким уровнем белковой продукции. Гомозиготное носительство деструктивного маркера *MMP9* в данных комплексных генотипах также ассоциировано с низкой продукцией белка. Полиморфная позиция гена *VEGF -2578* в области промотора представлена преимущественно гетерозиготами, а при гомозиготном носительстве вариантом с низким уровнем экспрессии. Напротив, *VEGF +936* полиморфная позиция в 3' нетранслируемом регионе гена представлена гомозиготным вариантом, ассоциированным с повышенной продукцией. Обращает на себя внимание, что относительное ранжирование результатов расчета показателя относительного риска развития одного из 3-х анализируемых заболеваний от большего к меньшему, приводит к аналогичному ранжированию этого расчетного коэффициента и для других заболеваний.

Аналогично позитивным комбинациям, одинаковые генотипы, негативно ассоциированные с заболеванием, представлены в основном в группах женщин (таблица 8). Резистентность к развитию и СД2, и РА, РМЖ ассоциируется с одинаковыми комбинациями 326 сложных генотипов

одновременно. Для комбинаций характерно наличие генотипа *VEGF -2578CC*, ассоциированного с высоким уровнем экспрессии гена, провоспалительного цитокина *IL6-174 GG*, ассоциированного с высоким уровнем экспрессии гена, противовоспалительного цитокина *IL10 -1082* в гетерозиготном виде и *IL10 -592CC*, ассоциированного с высоким уровнем экспрессии.

Особого внимания заслуживает то, что в группах женщин с тремя разными патологиями нет ни одного сложного генотипа, который был бы позитивно ассоциирован с каким либо одним заболеванием и одновременно являлся бы протективным в отношении другого. Аналогично с протективными генотипами в женской группе. Только 5 генотипов, негативно ассоциированные с болезнью в женских группах, носят противоположно ориентированный характер в группе мужчин с ИБС.

### **ВЫВОДЫ**

1. Анализ генов цитокинов *TNF $\alpha$  -863* (rs1800630), *TNF $\alpha$ -308* (rs1800629), *TNF $\alpha$ -238* (rs 361525), *IL1 $\beta$  -511* ( rs16944), *IL1 $\beta$ ,-31* (rs1143627), *IL 4 -590* ( rs2243250), *IL6 -174* (rs 1800795), *IL10-1082* (rs1800896) , *IL10 ,-592* (rs 1800872); матричных металлопротеиназ *MMP2-1306* (rs243865) , *MMP3-1171* (rs3025058), *MMP9-1569* (rs3918242); гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-2578* (rs699947), и *VEGF +936* (rs3025039) выявил преимущественно европеоидный характер распределения аллелей и их генотипов у практически здоровых жителей Западной Сибири. Однако наблюдается и ряд этногеографических особенностей, выраженных в смещении распределения частот генотипов *IL4-590* ( rs2243250), *MMP3-1171* (rs3025058) в сторону их распределения в монголоидных популяциях, что необходимо учитывать при анализе генетической ассоциированности данных генотипов с исследуемыми заболеваниями.
2. Существуют достоверные различия комплексных генотипов генов цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста эндотелия сосудов между группами здоровых разного пола и возраста: отсутствует ряд комплексных генотипов в группах мужчин/женщин и отсутствуют определенные комплексные генотипы в группах лиц пожилого возраста, присутствующие с высокой частотой в группах молодых жителей Западной Сибири.
3. Проведенный анализ уровня спонтанной и стимулированной Соп А продукции цитокинов у практически здоровых доноров выявил ассоциированность высокой продукции IL-1 $\beta$  с *IL-1 $\beta$ -31 C* аллельным вариантом гена; ассоциированность полиморфизма промоторного региона гена *IL 4-590* с уровнем продукции цитокинов IL1, IL6, TNF- $\alpha$ ,

- IL-10; промоторного полиморфизма *IL10 -592* с уровнем продукции IL4, что подтверждает наличие сетевых взаимодействий.
4. Проанализированный характер распределения генотипов регуляторных регионов генов цитокинов *TNF $\alpha$  -863* , *-308*, *IL1 $\beta$  -31*, *IL4 -590*, *IL6 -174*, *IL10 -1082* и *IL10 -592*; матричных металлопротеиназ, *MMP3-1171*, *MMP9 -1562*; гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-2578* выявил индивидуальный характер их ассоциированности с риском развития СД2, РА, РМЖ, ИМ и их клиническими проявлениями.
  5. Анализируемые гены медиаторов воспалительного ответа образуют индивидуальные ассоциированные с ИБС, СД2, РА и РМЖ генные сети, различающихся при определенном заболевании структурой провоспалительных цитокинов. При этом для всех позитивно ассоциированных с ИБС, РМЖ, РА, СД2 комплексных генотипов характерно наличие противовоспалительных цитокинов *IL4-590CC*, *IL10-592AA*, *IL10-1082AA*; *VEGF+936CC* , *MMP9-1562CC*, а в протективных комплексных генотипах - генотипов *IL4-590CT*, *IL10-592CC*, *IL10-1082AG* , *MMP9-1562CT*.
  6. Комплексные генотипы, в отличие от единичных полиморфизмов, обладают значительно более высокими значениями отношений шансов развития заболевания, что позволяет использовать данные результаты дополнительно при скрининговых обследованиях с целью выделения групп повышенного риска к развитию ИБС, СД 2, РМЖ, РА.
  7. Ряд моногенотипов анализируемых генов индивидуально ассоциированы с сывороточным уровнем продукции кардиомаркеров. С высоким уровнем продукции FNO-альфа ассоциирован *VEGF-2578 CC* генотип, *CD40 - IL2-330 TG* генотип, , *IL8 - IL6-174CC* генотип; с низким уровнем продукции FNO-альфа - *IL10-1082GG* генотип, *IL8 - IL6-174GC* и *VEGF-2578 CA* генотипы. Комплексные генотипы регуляторных регионов анализируемых генов избирательно ассоциированы с высокими / низкими сывороточными уровнями кардиологических маркеров, с гораздо большим значением отношений шансов и уровнем достоверности различий, что показано на примере пациентов с атеросклерозом, верифицированном ангиографически.
  8. При СД2 выраженные отличия высокого/низкого сывороточного уровня 7 лабораторных показателей: инсулин, лептин, резистин, фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-а), интерлейкин-6, ингибитор 1 типа активатора плазминогена (РАI-1), глюкозозависимый пептид (GIP) ассоциированы с комплексными генотипами, в составе которых полиморфные позиции генов *TNF- 863,-308,-238*; *IL1B-31*; *IL6-174*; *IL10-592*; *VEGF2578*.

9. У пациенток с РА моногенотип *VEGF-2578AA* ассоциирован с низким уровнем СРБ. Ряд комплексных генотипов при РА ассоциированы с уровнем продукции РФ и СРБ. С высоким уровнем продукции РФ ассоциированы комплексы, в состав которых входит *IL6-174 GG* генотип, частота которого выше в группе серопозитивных пациентов с РА. С низкими уровнями РФ ассоциирован как в виде моногенотипа, так и в составе комплексных генотипов *IL 4-590 CC*, частота которого выше у серонегативных пациентов с РА в анализируемой группе. Это свидетельствует о том, что СРБ и РФ, как лабораторные признаки, интегрально отражающие характер течения РА у отдельных индивидов, ассоциированы с генетическими особенностями пациентов, а выявленные генетические комплексы могут рассматриваться в качестве дополнительных показателей риска и характера развития РА.
10. Наряду с индивидуальными для определенного заболевания комплексными генотипами, выявлены общие комплексные генотипы предрасположенности/резисентности одновременно к нескольким анализируемым МФЗ, что свидетельствует об их синтропности по отношению к анализируемым заболеваниям.
11. Все комплексные генотипы, позитивно ассоциированные с какой либо одной анализируемой патологией, могут быть только позитивно ассоциированы с другой патологией в женских группах. Аналогичная закономерность прослеживается и при анализе протективных генотипов в этой группе обследованных лиц. Это свидетельствует о том, что такие варианты генетических сетей отображают единый вектор иммунного ответа.

#### **Статьи по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК.**

1. Коненков В.И., Голованова О.В., Дортман В.В., **Шевченко А.В.**, Карпова А.В. Полиморфизм гена TNFA и неравновесное сцепление TNFA и HLA-генов II класса (DRB1, DQA1 и DQB1) в популяции сибирских европеоидов. // Иммунология.- 2008.- N1.- с.6-10.
2. Голованова О.В., Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Коломейчук М.Ю., Завьялова М.В., Вторушина С.В. Полиморфизм гена TNFA(C-863A, G-308A, G-238A) у больных раком молочной железы. // Иммунология.- 2009.- N2.- с.92-94.
3. Голованова О.В., Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Смольникова М.В. Частоты аллелей генов DRB1, DQA1, DQB1, и TNFA у пришлого населения Западной Сибири. // Генетика.- 2009.- Т.45(8).- с.1118-1124.
4. **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Коломейчук М.Ю., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Полиморфизм промоторного региона генов

- IL-4, IL-6, IL-10 у пациенток с раком молочной железы. // Медицинская иммунология.- 2009.- Т.11(1).- с.21-28.
5. **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимова В.Н., Толкачева О.М. Анализ взаимосвязи полиморфизма гена IL6(-174 G/C) и классических факторов риска у пациентов с острым инфарктом миокарда в анамнезе. // Медицинская иммунология.- 2009.- Т.11(6).- с.557-566.
  6. Коненков В.И., Голованова О.В., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.**, Зонова Е.В., Королев М.А., Леонова Ю.Б., Халайджи Н.А., Лапсина С.А. Распределение аллельных вариантов промоторных участков генов цитокинов и гена фактора роста сосудистого эндотелия среди здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом в популяции европеоидного населения России. // Вестник РАМН.- 2010.- N9.- с.9-14.
  7. Коненков В.И., Зонова Е.В., Королев М.А., Леонова Ю.Б., **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Прокофьев В.Ф. Фармакогенетические критерии эффективности базисной противовоспалительной терапии ревматоидного артрита. // Терапевтический архив.- 2010.- N12.- С.56-61.
  8. Коненков В.И., Зонова Е.В., Леонова Ю.Б., Королев М.А., Прокофьев В.Ф., Голованова О.В., **Шевченко А.В.** Возможности использования генотипирования цитокинов с регулирующей воспалением активностью в качестве биологических маркеров прогноза эффективности терапии ревматоидного артрита. // Научно-практическая ревматология.- 2010.- N5.- с.19-26.
  9. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Зонова Е.В., Королев М.А., Леонова Ю.Б. Комплексный анализ полиморфизма в промоторных участках генов цитокинов IL-1B T31-C, IL-6 G-174C, TNFA G-238A, TNFA G-308A, TNFA C-863A, IL-4 C-590T и IL-10 C592-A в патогенезе эффекта от лечения ревматоидного артрита. // Медицинская иммунология.- 2010.- Т.12(4-5).- с.361-374.
  10. **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Коненков В.И. Особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов IL1, IL4, IL5, IL6, IL10 и TNFA у европеоидного населения Западной Сибири. // Иммунология.- 2010.- Т.31(4).- с.176-181.
  11. **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Полиморфизм промоторного региона гена IL-1b у пациентов с инфарктом миокарда в анамнезе. // Медицинская иммунология.- 2010.- Т.12(3).- с.219-226.
  12. **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Коненков В.И., Толкачева О.М., Ромашенко А.Г., Максимов В.Н., Воевода М.И. Анализ полиморфизма трех позиций промоторного региона гена TNF- а у пациентов с ишемической болезнью сердца, нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда. // Кардиология.- 2010.- Т.50 (2).- с.9-14.
  13. **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Коненков В.И., Толкачева О.М., Максимов В.Н., Воевода М.И., Ромашенко А.Г. Анализ полиморфизма

- генов матричных металлопротеиназ-2 и -9 у пациентов с ишемической болезнью сердца. // Терапевтический архив.- 2010.- Т.82(1).- с.31-34.
14. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Королев М.А., Лапсина С.А., Зонова Е.В., Прокофьев В.Ф., Орлов Н.Б., Голованова О.В., Королева Е.А. Комплексный анализ клинической значимости выявления аллельных вариантов генов цитокинов il1b, il6, il10, tnfa и фактора роста vegf в качестве генетических факторов риска развития остеопороза при сахарном диабете 2 типа. // Остеопороз и остеопатии. 2010. № 3. С. 5-12.
  15. Благодатских А.Е., Голованова О.В., **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Воевода М.И. Функциональный полиморфизм гена ИЛ-10 при раке молочной железы. // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина.- 2011.- Т.9(4).- с.161-166.
  16. Коненков В.И., Повещенко О.В., Ким И.И., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Гульева Н.А., Бернвальд В.В., **Шевченко А.В.**, Голованова О.В., Янкайте Е.В., Повещенко А.Ф., Караськов А.М. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- 2011.- Т.6(3).- с.71-75.
  17. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.**, Голованова О.В. Полиморфизм генов цитокинов как один из факторов демографической структуры европеоидного населения Сибири. // Иммунология.- 2011.- №2.- с.60-65.
  18. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Воевода М.И. Полиморфизм генов белков - регуляторов воспаления, при атеросклерозе, осложненным развитием острого инфаркта миокарда. // Атеросклероз.- 2011.- Т.7(1).- с.5-18.
  19. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Голованова О.В. Сравнительная генетика промоторов генов цитокинов европеоидного населения России // Медицинская иммунология.- 2011.- Т.13(4-5).- с.539-540.
  20. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Голованова О.В., Благодатских А.Е., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н., Полиморфизм гена VEGFA (C-2578A, C+936T) у пациенток с раком молочной железы. // Медицинская иммунология.- 2012.- Т.14(1-2).- с.87-94.
  21. Коненков В.И., Королев М.А., **Шевченко А.В.**, Лапсина С.А., Королева Е.А., Зонова Е.В., Прокофьев В.Ф. Полиморфизм генов цитокинов при сахарном диабете 2 типа у женщин России европеоидного происхождения. // Терапевтический архив.- 2012.- №10.- с.14-22.
  22. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Королев М.А., Фазуллина О.Н., Лапсина С.А., Королева Е.Г. Ассоциация вариантов гена фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и генов цитокинов (IL-1B, IL4, IL8, IL10, TNFA) с сахарным диабетом 2 типа у женщин. // Сахарный диабет.- 2012.- №3.- с.4-10.

23. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Королев М.А., Фазуллина О.Н., Лапсина С.А., Королева Е.А. Генетические факторы индукции нарушений регуляции ангиогенеза при сахарном диабете 2 типа//Медицинская иммунология.- 2012.- Т.14(6).- с.489-500.
24. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Максимов В.Н. Комплекс генотипов цитокинов как генетический фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин европеоидного населения России. // Кардиология.- 2012.- N7.- с.22-29.
25. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И. Функциональный полиморфизм генов семейства VEGF. // Цитокины и воспаление.- 2012.- Т.11(4).- с.14-20.
26. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Полиморфизм регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов VEGFA у пациентов с раком молочной железы с наследственной отягощенностью. // Вопросы онкологии.- 2012.- Т.58(6).- с.773-776.
27. Коненков В.И., Климонтов В.В., Прокофьев В.Ф., Фазуллина О.Н., **Шевченко А.В.** Комбинации генотипов цитокинов и матриксных металлопротеиназ, ассоциированные с ретинопатией, у женщин с сахарным диабетом 2-го типа. // Офтальмохирургия.- 2013.- N4.- с.72-77.
28. Коненков В.И., Королев М.А., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Убшаева Ю.Б., Соколова О.С., Летягина Е.А., Дюбанова Г.А. Генетические факторы нарушений регуляции ангиогенеза у женщин с ревматоидным артритом. // Терапевтический архив.- 2013.- N5.- с.16-23.
29. Коненков В.И., Королев М.А., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Убшаева Ю.Б. Полиморфизм гена фактора роста сосудистого эндотелия ФРСЭ-2578 А/С в комбинации с полиморфизмами генов цитокинов среди пациентов с ревматоидным артритом. // Научно-практическая ревматология.- 2013.- N3.- с.240-245.
30. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.** Прогностическая значимость полиморфизма генов-регуляторов лимфангиогенеза в оценке состояния здоровья человека. // Бюллетень СО РАМН.- 2013.- Т.33(6).- с.51-59.
31. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.**, Чернявский А.М., Караськов А.М. Возрастная и половая динамика структуры цитокиновых генных сетей населения России. // Вестник РАМН.- 2013.- N9.- с.15-21.
32. Коненков В.И., **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Климонтов В.В., Чердынцева Н.В., Покушалов Е.А., Караськов А.М. Цитокиновые генные сети в персонализированном прогнозе состояния здоровья человека и формирования групп высокого риска развития заболеваний для проведения профилактических мероприятий. // Профилактическая медицина.- 2013.- Т.16(4).- с.19-26.
33. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Бабышкина Н.Н., Савенкова О.В., Слонимская Е.М. Анализ ассоциаций полиморфизма гена VEGF-Ав позициях 2578/АС и +936С/Т с разным рецепторным статусом у больных

- раком молочной железы. // Сибирский онкологический журнал.- 2013.- №1.- С.32-38.
34. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Караськов А.М. Полиморфизмы С-257ВА и С+936Т гена VEGF среди мужчин европеоидного происхождения с коронарными осложнениями атеросклероза. // Иммунология.- 2013.- Т.34(3).- с.144-148.
35. Повещенко О.В., Ким И.И., **Шевченко А.В.**, Покушалов Г.А., Романов А.Б., Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Повещенко А.Ф., Караськов А.М., Коненков В.И. Оценка уровня цитокинов, продуцируемых мононуклеарами периферической крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью после мобилизации стволовых клеток костного мозга Г-КСФ. // Бюллетень СО РАМН.- 2014.- Т.34(4).- с.42-47.
36. **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Коненков В.И. Генная регуляция уровня матричных металлопротеиназ у пациентов с коронарным атеросклерозом. // Кардиологический вестник.- 2014.- Т.IX, №2.- с.86-92.
37. **Шевченко А.В.**, Прокофьев В.Ф., Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Воевода М.И., Коненков В.И. Ассоциация полиморфизма генов воспалительных цитокинов с уровнями биохимических маркеров в сыворотке крови при коронарном атеросклерозе. // Медицинская иммунология.- 2014.- Т.16, №4.- с.333-344.
38. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Ассоциированность полиморфизма в промоторных участках генов металлопротеиназ (mmp2, mmp3, mmp9) с вариантами клинического течения рака молочной железы у женщин России// Вопросы онкологии.- 2014.- т.60(5).- с. 630-635.
39. **Шевченко А.В.**, Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Покушалов Е.А. Анализ комбинаций генотипов в полиморфных точках промоторных участков генов трех матричных металлопротеиназ (mmp) и гена фактора роста эндотелия сосудов (vegf) у пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда// Терапевтический архив. -2014.- Т. 86(4).- С. 19-24.
40. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.**, Покушалов Е.А., Караськов А.М. Ассоциированность комбинированных генотипов полиморфных участков генов цитокинов, фактора роста сосудистого эндотелия и металлопротеиназ с развитием инфаркта миокарда у мужчин//Российский кардиологический журнал. -2014.-Т.114(10).- С. 34-39.
41. Коненков В.И., Повещенко О.В., Прокофьев В.Ф., **Шевченко А.В.**, Ким И.Н., Бондаренко Н.А., Караськов А.М., Покушалов Е.А., Романов А.Б. Анализ информативности клинических, функциональных, лабораторных и генетических показателей оценки состояния пациентов, перенесших инфаркт миокарда, в прогнозе эффективности интрамиокардиальной аутологичной клеточной терапии хронической сердечной недостаточности// Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2015; 14(1): 23–29