

На правах рукописи

Калюжная Ольга Викторовна

**ВКЛАД ГЕНОВ ЛИПИДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ
В ФОРМИРОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА
У ПОДРОСТКОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
член-корр. РАН, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

Колесникова Любовь Ильинична

доктор медицинских наук

Баирова Татьяна Ананьевна

Официальные оппоненты:

Семинский Игорь Жанович – доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии с курсом клинической иммунологии, заведующий

Сергеева Анна Сергеевна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», лаборатория патофизиологии функциональных систем, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Защита состоится «__» сентября 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.038.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на сайте <http://health-family.ru>.

Автореферат разослан «__» августа 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гребенкина Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. На протяжении последних лет в России остается стабильно высокой доля смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в структуре общей смертности. Так, по данным Федеральной службы государственной статистики (Росстат), в 2014 году она составила 49,9% от общей смертности населения или 653,7 случаев на 100 000 населения (<http://cbsd.gks.ru>, 13.06.2016). Согласно модели сердечно-сосудистого континуума артериальная гипертензия и дислипидемия являются независимыми факторами риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) - мультифакториальное заболевание, в формировании которого принимают участие модифицируемые и немодифицируемые факторы риска. Отягощенная наследственность — относится к значимым эндогенным немодифицируемым факторам риска реализации артериальной гипертензии, имеющих особое значение на ранних этапах онтогенеза.

Одним из перспективных направлений изучения патогенетических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний является поиск генов-кандидатов, связанных с ранним дебютом ЭАГ и риском реализации коморбидных состояний: ожирение, сахарный диабет и дислипидемия (Леонтьева И.В., 2006; Пузырев В.П., 2006). Ранее показано, что изменения в генах, кодирующих аполипопротеины, могут приводить к изменению липидного спектра и к его сдвигу в сторону атерогенности и прогрессирования ЭАГ (Stengard J.H et al., 2006; Saidi S. et al., 2007; Petersen K.F. et al., 2010; Yin R.X. et al., 2012; Chaudhary R. et al., 2012).

Степень разработанности темы. Ассоциации болезней на уровне клинических фенотипов, имеющих молекулярно-генетическую основу, представляют собой цепь событий, составляющих континуум и приводящих к прогрессированию через многочисленные физиологические метаболические механизмы (Lee D.S., et al., 2008; Вильмс Е.А., 2012; Верткин А.Л., 2013). Дебютируя как отдельные нозологические состояния, артериальная гипертензия и дислипидемия формируют сердечно-сосудистый континуум. Сложившийся на современном этапе подход изучения гено-фенотипических взаимоотношений позволил идентифицировать гены-кандидаты таких мультифакториальных заболеваний как артериальная гипертензия, сахарный диабет, дислипидемия и другие (Vamba V., 2007, Баирова Т.А., 2009; Диткина Е.Ю., 2012; Al-Bustan S.A., et al., 2014). Однако коморбидность сердечно-сосудистой патологии определяет необходимость поиска общих маркерных генов сердечно-сосудистого континуума.

Результаты ранее проведенных исследований генов-кандидатов сердечно-сосудистого континуума немногочисленны, неоднозначны, а порой и противоречивы, что обусловлено различием дизайна исследования, изучением пациентов разных возрастов, разных популяций и этнических групп (Баирова Т.А., 2009; Rasheed H., et al., 2014; Bragina E.Yu., et al., 2014). Особый интерес представляет изучение значимости генетических факторов в формировании и

прогрессирование ЭАГ в детско-подростковом возрасте, позволяя персонифицировать подход к прогнозированию течения патологии (Groenendijk M. et al., 2001; El-Aziz T.A. et al., 2011). Все выше изложенное позволяет сформулировать цель исследования.

Цель исследования - определить роль генов липидтранспортной системы в формировании дислипидемии у подростков с ЭАГ для разработки основ персонализированного подхода прогнозирования риска прогрессивности сердечно-сосудистых заболеваний.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования**:

1. Провести сравнительный анализ липидного спектра крови между группами подростков с ЭАГ, подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ и подростков группы контроля.
2. Проанализировать распределения частот генотипов и аллелей генов липидтранспортной системы (*ApoA1*, *ApoB*, *ApoC3* и *ApoE*) у подростков с ЭАГ, подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ и подростков группы контроля.
3. Выявить ассоциации носительства аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов липидтранспортной системы с параметрами липидного обмена у подростков с ЭАГ, подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ и подростков группы контроля.
4. Исследовать и смоделировать взаимодействие генов липидтранспортной системы для рассматриваемых патологических состояний, а также оценить их роль в формировании дислипидемии на фоне ЭАГ.
5. Разработать критерии генетического риска проатерогенных нарушений липидного обмена у подростков с ЭАГ.

Научная новизна работы. Впервые проанализировано распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов липидтранспортной системы (*ApoA1*, *ApoB*, *ApoC3* и *ApoE*) в трех выборках подростков: группе пациентов с ЭАГ, пациентов с дислипидемией на фоне ЭАГ, и в группе здоровых подростков. В изучаемых группах подростков поведена оценка вклада генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов аполипопротеинов в формирование нарушений липидного обмена и разработаны прогностические модели расчета риска возникновения дислипидемии на фоне ЭАГ у подростков.

На основе биоинформационного анализа межгенного взаимодействия генов липидтранспортной системы (*ApoA1*, *ApoB*, *ApoC3* и *ApoE*) оценен вклад каждого изучаемого полиморфизма в генетическую энтропию генов липидтранспортной системы у подростков с ЭАГ и в группе подростков с ЭАГ и дислипидемией.

Теоретическая и практическая значимость. Сформированный в результате исследования спектр генов – предикторов дислипидемии представляет особый интерес для дальнейшего изучения потенциальных генетических биомаркеров риска прогрессирования сердечно-

сосудистого континуума. Результаты настоящей работы могут быть использованы в клинической практике для идентификации группы риска прогрессирования коморбидных состояний - эссенциальной артериальной гипертензии и дислипидемии, а также в педагогическом процессе для формирования расширенного представления о генетике мультифакториальных заболеваний у студентов высших учебных заведений медико-биологического спектра и в постдипломном образовании врачей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Проатерогенная направленность липидного обмена у подростков с ЭАГ детерминирована полиморфными вариантами: +83T гена *ApoA1*, Del гена *ApoB* и S2 гена *ApoC3*.
2. Прогностически значимыми факторами риска развития коморбидной патологии – дислипидемии на фоне ЭАГ являются: уровень показателей липидного профиля ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП, а также носительство аллелей +83T гена *ApoA1* и Del гена *ApoB*.
3. Межгенное взаимодействие аллельных вариантов полиморфизмов генов *ApoA1(-75A)*, *ApoB(Del)* и *ApoE(ε4)* имеет синергичный характер и способствует реализации ЭАГ и коморбидной патологии - дислипидемии на фоне ЭАГ.

Методология и методы исследования. В работе использованы общенаучные и частные научные методы исследования (биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы). Биохимические методы включали определение липидного спектра крови у всех подростков исследуемых групп. Молекулярно-генетическими методами определяли носительство генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов аполипопротеинов. Статистическими методами проводили сравнительный анализ уровня липидов крови между исследуемыми группами подростков, а также анализ частоты встречаемости и распространенности полиморфных вариантов изучаемых генов. На основе дискриминантных функции сформулированы прогностические модели формирования дислипидемии у подростков с ЭАГ. С помощью биоинформационного анализа MDR было оценено межгенное взаимодействие генов аполипопротеинов для групп подростков с ЭАГ и группы подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Степень достоверности результатов проведенного исследования подтверждается данными работы проведенной на 109 пациентах-подростках с ЭАГ и подростках с ЭАГ и дислипидемией, а также на контрольной группе численностью 73 подростка. Работу проводили с применением современных биохимических, молекулярно-генетических и статистических методов исследования. Апробация материалов диссертации проведена на заседании ученого совета ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, заседаниях лаборатории персонализированной медицины, заседании отдела персонализированной и профилактической медицины ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Материалы диссертации доложены и

обсуждены на I Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (г. Иркутск, 2014), на Российском форуме «Здоровье детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний» (г. Санкт-Петербург, 2014, 2016 гг), на Межрегиональной школе-семинаре «Персонализированная медицина: от теории к практике» (г. Иркутск, 2014).

Публикации. По материалам выполненных исследований опубликовано 9 печатных работ, из них 6 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 6 рисунками, 32 таблицами. Библиографический указатель включает 197 источников, из которых 120 публикаций иностранных авторов.

Личный вклад автора: Автором работы лично сформированы группы исследования. группа подростков с ЭАГ – 70 подростков, группа с ЭАГ и дислипидемией – 39 и контрольная группа – 73 подростка. Также автором проведен молекулярно-генетический анализ на носительство полиморфных вариантов генов апополипротеинов (*ApoA1*, *ApoB*, *ApoC3* и *ApoE*) для каждого подростка исследуемых групп. Проведен статистический анализ полученных данных, сформулированы прогностические модели формирования дислипидемии у подростков с ЭАГ и проанализировано межгенное взаимодействие полиморфных вариантов изучаемых генов. Автором проведен анализ и обсуждение полученных результатов, большая часть результатов работы опубликована в виде статей и тезисов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Набор материала для исследования производился в период с 2009г. по 2013г. в отделении педиатрии клиники ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и в ходе экспедиционных работ в поселки Баяндай и Мишелевка Иркутской области. Всего в исследование было включено 182 подростка русской национальности в возрасте от 12 до 18 лет ($15,52 \pm 1,25$ лет), из них 109 мальчиков и 73 девочки.

Критерии включения в исследование: возраст подростка от 12 до 18 лет; принадлежность к европеоидам (на примере подростков русской национальности); индекс массы тела (ИМТ) менее 25 кг/м^2 ; информированное согласие родителей. **Критерии исключения из группы исследования:** несоответствие критериям включения; вторичный генез артериальной гипертензии; прием базисной терапии эссенциальной артериальной гипертензии; ожирение и избыточная масса тела. Из 182 подростков основной группы в группу с ЭАГ вошли подростки с верифицированным диагнозом ЭАГ - 70 человек, из них 42 мальчика и 28 девочек, в возрасте от 14 до 17 лет

(15,77±1,25). Критерии включения в группу подростков с ЭАГ: верифицированный диагноз ЭАГ в соответствие с рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов, Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и Ассоциации детских кардиологов России от 2009 г. (Александров А.А. , 2009); принадлежность к европеоидам (на примере подростков русской национальности); индекс массы тела (ИМТ) менее 25 кг/м²; уровень общего холестерина крови менее 5,2 ммоль/л.; информированное согласие родителей. Во вторую группу вошли подростки с ЭАГ и дислипидемией (ЭАГ+ДЛ) – 39 человек, 23 мальчика и 16 девочек, возраст от 12 до 18 лет (15,48±1,53). Критерии включения во вторую группу исследования: верифицированный диагноз ЭАГ в соответствие с рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов, Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и Ассоциации детских кардиологов России от 2009 г. (Александров А.А., 2009); уровень общего холестерина крови более 5,2 ммоль/л.; принадлежность к европеоидам (на примере подростков русской национальности); индекс массы тела (ИМТ) менее 25 кг/м²; информированное согласие родителей. Третью - контрольную группу (КГ) исследования составили подростки I-II групп здоровья. Всего 73 подростка (44 мальчика и 29 девочек), возраст от 13 до 18 лет (15,31±1,34).

Все три группы подростков были сопоставимы по полу ($p=0,991$) и возрасту ($p=0,709$). Этническую принадлежность каждого подростка определяли методом анкетирования с учетом указания на национальную принадлежность предков до третьего поколения. Все участники исследования, их родители (или опекуны) были информированы о научной направленности исследований и дали свое согласие на участие в совместной работе. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, ред. 2013).

Биохимический анализ липидного спектра крови. Для биохимического исследования липидного спектра крови, у каждого подростка утром натощак (согласно общепринятой методике) отбирали кровь из локтевой вены в вакуумную пробирку без наполнителя. Для получения сыворотки крови, пробирку центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10 минут. Биохимический анализ липидного спектра включал определение триглицеридов (ТГ), общего холестерина крови (ОХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой и очень низкой плотности (ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП), а также коэффициента атерогенности (КА). Определение уровней ТГ, ОХС, ХС-ЛПВП и проводили на биохимическом анализаторе ВТС-330 (Испания) с помощью коммерческих наборов «Bio Systems» (Испания). В работе использованы следующие методы расчета:
 $ХС-ЛПОНП = ТГ / 2,2$; $ХС-ЛПНП = ОХС - (ХС-ЛПВП + ХС-ЛПОНП)$ и
 $КА = (ОХС - ХС-ЛПВП) / ХС-ЛПВП$.

Выделение геномной ДНК из периферической крови. Для молекулярно-генетического исследования у каждого подростка из локтевой вены отбирали венозную кровь в вакуумные пробирки с 3% ЭДТА. Из полученных образцов крови выделяли геномную ДНК сорбентным методом, с использованием наборов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва), по методике, прилагаемой к набору. Полученные образцы ДНК хранили при -20°C .

Определение аллельных полиморфизмов генов аполипопротеинов:

Генотипирование аллельного полиморфизма G-75A гена ApoA1 (rs670) и полиморфизм S1/S2 гена ApoC3 (C3238G, rs5128) проводили методом ПЦР с аллель-специфическими праймерами и детекцией продуктов реакции в режиме реального времени с помощью наборов “SNP-Экспресс” фирмы «Литех» (Россия), на детектирующем амплификаторе DТprime «ДНК-технология» (Россия), **полиморфизма C+83T гена ApoA1 (rs5069)** - наборами фирмы “ТестГен” (Россия) для ПЦР с флуоресцентной детекцией (FLASH), содержащими аллель специфические праймеры с флуоресцирующим красителем отдельно для каждого полиморфного варианта.

Генотипирование инсерционно-делеционного полиморфизма гена ApoB (Ins/Del, rs17240441) проводили по методике предложенной Khattri et al., 2009 (Khattri A., 2009), в стандартной ПЦР смеси объемом 25 мкл, с использованием праймеров синтезированных фирмой “Синтол” (Россия), на термоциклере “Mastercycler” (Eppendorf, Германия). Детекцию продуктов амплификации проводили в 3% агарозном геле, с последующей окраской бромистым этидием.

Определение $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена ApoE проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, по методике предложенной Nixon et al., 1990., где специфическая эндорестриктаза расщепляет фрагмент ДНК (ПЦР-продукт) в зависимости от наличия или отсутствия сайта рестрикции (GCG \uparrow C, аминокислота Arg), соответствующих 112 и 158 позиции полипептидной цепи. Продукт амплификации с аллелем $\epsilon 3$ (112Cys и 158Arg) расщеплялся на фрагменты длиной 35, 48 и 91 п.н., содержащий аллель $\epsilon 4$ (112Arg и 158Arg) на фрагменты длиной 19, 35, 48 и 72 п.н., продукт амплификации, содержащий аллель $\epsilon 2$ (112Cys и 158Cys), не содержащий сайт рестрикции, не расщеплялся рестриктазой.

Статистические методы анализа. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «Microsoft Excel 2007», пакета прикладных программ «Statistica 6.0», и программа открытого доступа MDR 3.0.2. Распределение признаков в группах исследования проверяли на нормальности распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Значимость различий между двумя группами с распределением признаков отличных от нормального проверялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Между тремя и более группами по критерию Крускала-Уолиса. Распределение генотипов и аллельных полиморфизмов генов проверяли на

соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Сравнение частот аллелей и генотипов между исследуемыми группами проводили с использованием критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность, все различия считались статически значимыми при $p < 0,05$.

Ассоциация генотипов и аллелей с патологическим фенотипом оценивали по величине отношения шансов (OR), по формуле $OR = a*d/b*c$, где a – частота аллеля в группе с патологией; b – частота аллеля в контрольной группе; c и d – суммарная частота остальных аллелей в группах с патологией и контроле, соответственно. $OR=1$ рассматривали как отсутствие ассоциации аллеля и признака, $OR > 1$ как положительную ассоциацию (рисковая аллель), и $OR < 1$ – отрицательную ассоциацию. Прогностические модели риска разрабатывались на основе дискриминантного анализа. Долю дисперсии дискриминантной функции характеризовали статистикой Лямбда Уилкса и точного максимального значения F переменных для анализа значимости различия групп при $p < 0,05$. Дискриминантная функция выражалась уравнением: $D = k_1*x_1 + k_2*x_2 + \dots + k_n*x_n + a$, где x_1 и x_2 – значения переменных (биохимические и генетические данные), a – константа дискриминантной функции.

Межгенное взаимодействие полиморфных вариантов исследуемых генов оценивали с помощью биоинформативного метода мультифакторного моделирования геномных взаимодействий - снижение мультифакториальной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction или MDR) в программе открытого доступа MDR 3.0.2 (www.epistasis.org/mdr.html). В итоге анализа методом сравнения групп заболевание-контроль, программа формируют оптимальные модели межгенных взаимодействий, характеризующиеся сбалансированной точностью (training balanced accuracy, Tr. Bal. Acc), коэффициентом перекрестной проверки (cross-validation consistency, C-V Cons), а также чувствительностью, (sensitivity, Se) и специфичностью (specificity, Sp). Наилучшей предложенной программой моделью является модель с C-V Cons не менее 90% (9/10) и с максимальной сбалансированной точностью, а также достоверностью более 95% ($p < 0,05$). На основании полученной модели был проведен кластерный анализ с построением дендрограммы взаимодействия изучаемых генов. Тип взаимодействия генов в дендрограмме оценивается по цветовой шкале (синергичное взаимодействие генов или усиление эффекта – красный и оранжевый цвет ветвей дендрограммы, коричневый – независимый эффект, зеленый – дублирование эффекта, синий – антагонистичное действие или ослабление), длина линии дендрограммы отражает силу взаимодействия генов (чем короче ветвь, тем сильнее взаимодействие и наоборот).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение липидного спектра крови в группах подростков с ЭАГ, ЭАГ с дислипидемией и контрольной группой. По результатам биохимический анализ липидного спектра крови

проведен сравнительный анализ всех показателей в трех изучаемых выборках подростков. Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Сравнение показателей липидного спектра в изучаемых группах

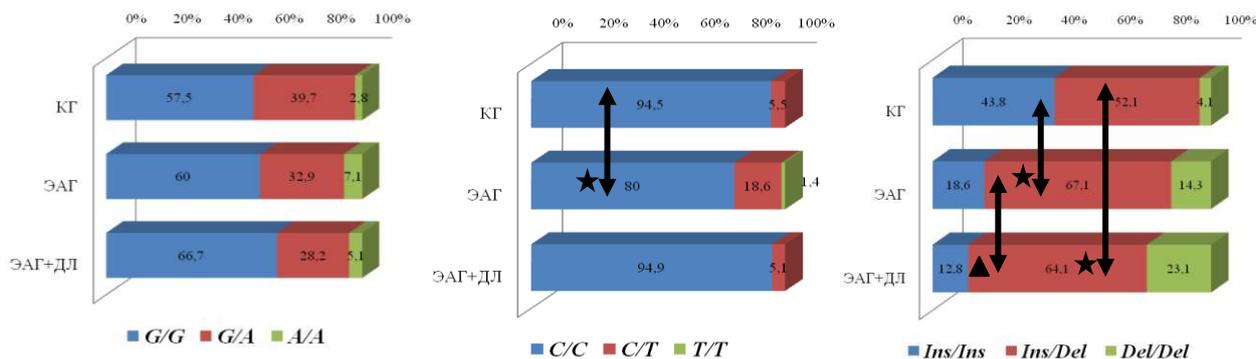
Группа (N)	ОХС	ТГ	ХС-ЛПВП	ХС-ЛПНП	ХС-ЛПОНП	КА
КГ, (73)	3,94 (3,50-4,55)	0,74 (0,52-0,99)	1,19 (1,11-1,27)	2,49 (2,09-2,96)	0,20 (0,24-0,45)	2,31 (2,09-2,60)
ЭАГ, (70)	4,38 (4,02-4,80)	0,88 (0,77-1,12)	1,30 (1,20-1,40)	2,80 (2,40-3,00)	0,34 (0,16-0,39)	2,32 (1,92-2,83)
ЭАГ+ДЛ, (39)	5,52 (5,35-6,08)	1,31 (0,89-1,90)	1,39 (1,29-1,50)	3,70 (3,30-4,10)	0,50 (0,33-0,76)	3,17 (2,75-3,58)
p	0,0004	0,0021	0,004	0,02	0,0012	0,034

Примечание: данные представлены в ммоль/л., в виде Ме (С₂₅ – С₇₅).
Значимость различий (p) указана по критерию Крускала-Уоллиса.

В группе контроля и в группе подростков с ЭАГ показатели липидограммы находились в пределах референсных значений, при этом в группе подростков с ЭАГ наблюдается статистически значимое увеличение показателей всех фракции липидов крови по сравнению с группой контроля. При сравнении показателей липидного спектра в изучаемых выборках подростков выявлены статистически значимые отличия между всеми тремя выборками по всем показателям. Для пациентов с ЭАГ характерна проатерогенная направленность липидограммы в виде повышения уровня ОХС, ТГ, ХЛ-ЛПНП и ХС-ЛПОНП несмотря на то, что показатели липидограммы находятся в пределах референсных значений. Таким образом, повышение уровня ОХС, ТГ, ХЛ-ЛПНП и ХС-ЛПОНП у подростков группы с ЭАГ по сравнению с группой контроля указывает на наличие ранних изменений липидного спектра крови у подростков с ЭАГ проатерогенной направленности.

Характеристика распределения генотипов и аллелей полиморфных вариантов ApoA1 (G-75A и C+83T), ApoB Ins/Del, ApoC3 S1/S2 и ApoE ε2/ε3/ε4 в исследуемых группах подростков. Результаты распределения частот генотипов в изучаемых выборках подростков представлены на рисунке 1 (а-д). Распределение частот генотипов G-75A и C+83T гена ApoA1 во всех трех исследуемых группах соответствовало закону Харди-Вайнберга (p>0,05). Для полиморфного варианта G-75A наиболее часто встречались носители гомозиготного генотипа G/G во всех трех группах подростков. Статистически значимых различий частот генотипов и аллелей полиморфизма G-75A гена ApoA1 в изучаемых группах не обнаружено. По результатам генотипирования полиморфного маркера C+83T гена ApoA1 (рисунок 1б) носители гомозиготного генотипа C/C выявлены во всех трех группах в 80%, 94,9 и 94,5%, соответственно. Гетерозиготный генотип C/T достоверно чаще встречался в группе подростков с ЭАГ по

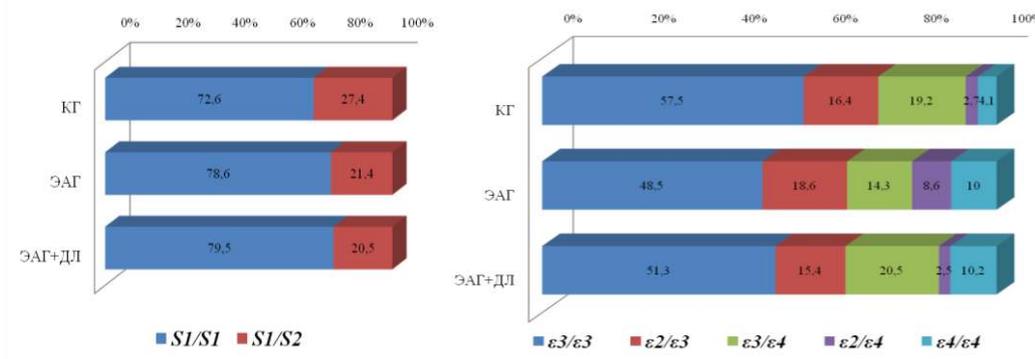
сравнению с контрольной группой 18,6% и 5,5% ($\chi^2=4,808$, $df=1$; $p=0,028$), в группе подростков с ЭАГ и дислипидемией генотип *C/T* обнаружен в 5,1% случаев. Гомозиготный генотип *T/T* был обнаружен только в 1,4% случаев в группе подростков с ЭАГ, в двух других группах данный генотип не встречался. Аллель *T* в группе подростков с ЭАГ встречалась достоверно чаще, чем в группе контроля (10,7% и 2,7%, $\chi^2=6,099$, $df=1$, $p=0,014$). Для группы подростков с ЭАГ – носителей *T*-аллеля полиморфного маркера *C+83T* гена *ApoA1* отношение шансов OR=4,2 (95% CI: 1,38–13,17; $p=0,0119$).



а) *G-75A* гена *ApoA1*

б) *C+83T* гена *ApoA1*

в) *Ins/Del* гена *ApoB*



г) *SI/S2* гена *ApoC3*

д) $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *ApoE*

Примечание: ★ - $p < 0,05$, по критерию χ^2 Пирсона, при сравнении с группой контроля.

▲ - $p < 0,05$, по критерию χ^2 Пирсона, при сравнении с группой подростков с ЭАГ.

Рисунок 1 - Распределение генотипов полиморфных вариантов генов аполипопротеинов *ApoA1* (*G-75A* и *C+83T*), *ApoB* (*Ins/Del*), *ApoC3* (*SI/S2*) и *ApoE* ($\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$) в исследуемых группах подростков

По инсерционно-делеционному полиморфизму гена *ApoB* в группе подростков с ЭАГ наблюдалось отклонение от закона Харди-Вайнберга ($p=0,004$) за счет увеличения частоты гетерозиготного генотипа и уменьшения частоты гомозиготных генотипов. По частотам встречаемости генотипов обнаружено достоверное различие между группой подростков с ЭАГ в сравнении с группой контроля ($\chi^2=12,687$, $df=2$; $p=0,002$) а также между группой подростков с ЭАГ+ДЛ в сравнении с группой контроля ($\chi^2=16,593$, $df=2$; $p=0,0001$) за счет увеличения доли

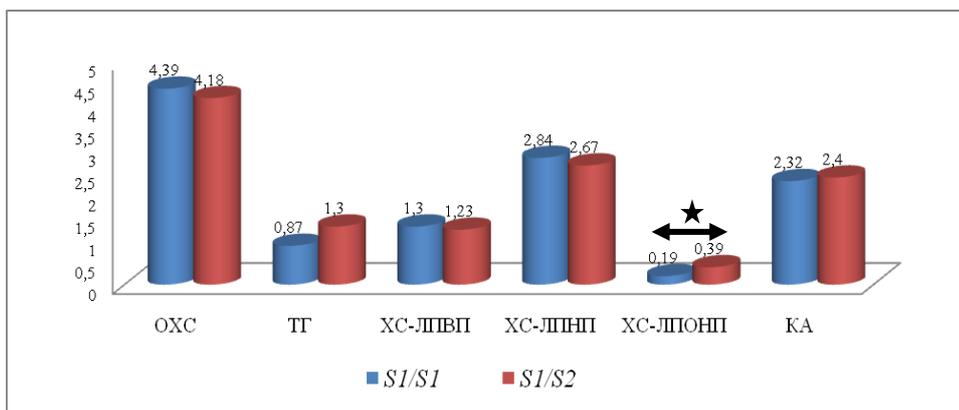
носителей аллеля по делеции. При сравнении частот аллелей также показаны достоверные различия между группами ЭАГ/КГ и ЭАГ+ДЛ/КГ ($\chi^2=7,718$, $df=1$, $p=0,003$ и $\chi^2=12,336$, $df=1$, $p=0,0001$). Для группы подростков с ЭАГ – носителей делетированного аллеля гена *ApoB* OR=2,13 (95% CI: 1,31-3,45; $p=0,0023$), для группы ЭАГ+ДЛ OR=2,85 (95% CI: 1,61-5,03; $p=0,0003$) (рисунок 1в). Таким образом, результаты сравнительного анализа частотных характеристик изучаемого полиморфизма позволяют предположить значимость носительства делеционного аллеля полиморфизма гена *ApoB* в формировании ЭАГ и дислипидемии как коморбидного состояния на фоне ЭАГ. Полученные нами данные согласуются с работой Gardemann с соавторами, где было показано увеличение аллеля *Del* в группе пациентов-европеоидов с инфарктом миокарда по сравнению с контрольной группой, а также увеличение содержания аполипопротеина В в крови у носителей генотипа *Del/Del* по сравнению с носителями генотипа *Ins/Ins* (Gardemann A. et al., 1998).

Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфного варианта *S1/S2* гена *ApoC3* соответствовало закону Харди-Вайнберга для всех трех групп. Чаще всего в изучаемых выборках подростков встречался генотип *S1/S1*. Гомозиготный генотип *S2/S2* в исследуемых группах не обнаружен. Статистически значимых различий встречаемости генотипов и аллелей гена *ApoC3* в изучаемых группах подростков не выявлено (рисунок 1г).

Для гена *ApoE* в трех исследуемых группах идентифицировано носительство пяти из шести возможных генотипов. Генотип $\epsilon 2/\epsilon 2$ не обнаружен. Распределение генотипов гена *ApoE* соответствовало равновесию Харди-Вайнберга в группе контроля ($p=0,498$) и в группе ЭАГ с дислипидемией ($p=0,207$). В группе подростков с ЭАГ наблюдалось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга ($p=0,007$) за счет уменьшения доли носителей генотипа $\epsilon 3/\epsilon 4$ в сравнении с ожидаемым (14,3% против 27,86%) и увеличения доли носителей генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$ (10% против 4,95%). Статистически значимых различий распространенности генотипов и аллелей между тремя исследуемыми выборками подростков обнаружено не было (рисунок 1д).

Сравнительный анализ показателей липидного спектра у носителей разных генотипов генов *ApoA1* (*G-75A* и *C+83T*). В связи с малой выборкой подростков носителей генотипа *A/A* полиморфного локуса *G-75A* гена *ApoA1*, носители *A/A* генотипа и *G/A* генотипа объединены в одну группу.

Для полиморфизма *G-75A* гена *ApoA1* в изучаемых группах статистически значимых различий по показателям липидного спектра крови не выявлено. Для полиморфного варианта *C+83T* гена *ApoA1* в группе подростков с ЭАГ показано статистически значимое увеличение содержания ХС-ЛПОНП в группе носителей генотипов *C/T+T/T* по сравнению с носителями генотипа *C/C* полиморфизма *C+83T* ($p=0,003$) (рисунок 2).



Примечание (здесь и ниже): данные липидограммы представлены в виде Ме (ммоль/л), КА (у.е.).
 ★ $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Рисунок 2 - Показатели липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма $C+83T$ гена *ApoA1* в группе подростков с ЭАГ

Носительство аллелей однонуклеотидных замен $G-75A$ и $C+83T$, расположенных в регуляторной области гена, детерминирует экспрессию аполипопротеина А1. При этом аллели ($-75)A$ и $(+83)T$ ассоциированы со снижением экспрессии гена *APOA1*, уменьшением количества аполипопротеина А1 и снижением концентрации ХС-ЛПВП (Kamboh M.I., 1996). Однако по результатам собственных исследований нами не выявлено статистически значимых различий концентрации ХС-ЛПВП у подростков с ЭАГ – носителей разных генотипов изучаемых полиморфизмов. Более того, выявлено статически значимое повышение проатерогенного ХС-ЛПОНП у подростков с ЭАГ – носителей T -аллеля полиморфного варианта $C+83T$. Возможно носительство минорного $(+83)T$ аллеля, детерминирующего снижение экспрессии антиатерогенного апобелка А1, опосредованно повышает концентрацию проатерогенных компонентов липидного спектра.

Повышение уровня ХС-ЛПОНП у носителей $+83T$ аллеля, а также более высокая частота встречаемости аллеля $+83T$ в группе подростков с ЭАГ позволяет рассматривать данный аллель как фактор риска формирования проатерогенной направленности липидного профиля у подростков с ЭАГ.

Сравнительный анализ показателей липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма *Ins/Del* гена *ApoB*. В связи с малым количеством носителей генотипа *Del/Del* в контрольной группе нами объединены подростки – носители *Del/Del* с группой *Ins/Del*. При сравнении показателей липидного спектра между группой носителей гомозиготного генотипа *Ins/Ins* и объединенной группой *Ins/Del + Del/Del* статистически значимых различий по показателям липидограммы выявлено не было.

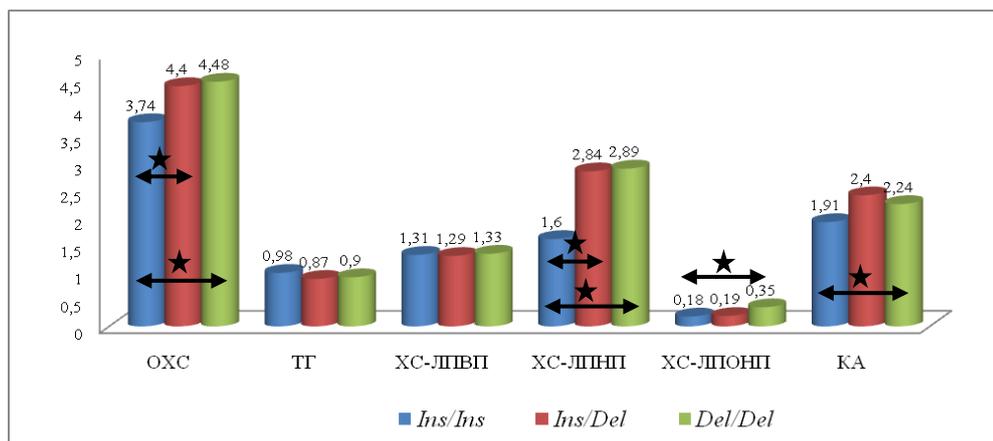


Рисунок 3 - Показатели липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма *Ins/Del* гена *ApoB* в группе подростков с ЭАГ

В группе подростков с ЭАГ у носителей гетерозиготного генотипа *Ins/Del* по сравнению с носителями генотипа *Ins/Ins* показано увеличение уровня ОХС ($p=0,0001$), также увеличение уровня ОХС выявлено в группе носителей гомозиготного генотипа по делеции *Del/Del* по сравнению с носителями *Ins/Ins* ($p=0,0003$). Аналогичная тенденция показана при анализе уровня ХС-ЛПНП: в группе носителей генотипа *Ins/Del* и группе *Del/Del* по сравнению с носителями генотипа *Ins/Ins* ($p=0,0004$ и $p=0,0003$, соответственно). У носителей *Del/Del* статистически значимо повышен уровень ХС-ЛПОНП по сравнению с группой *Ins/Ins* ($p=0,005$) (рисунок 3).

В группе подростков с ЭАГ и дислипидемией показано статистически значимое повышение уровня ОХС у носителей генотипов *Del/Del* и по сравнению с группой *Ins/Del* ($p=0,0094$), а также носителей *Del/Del* и *Ins/Ins* ($p=0,050$) (рисунок 4).

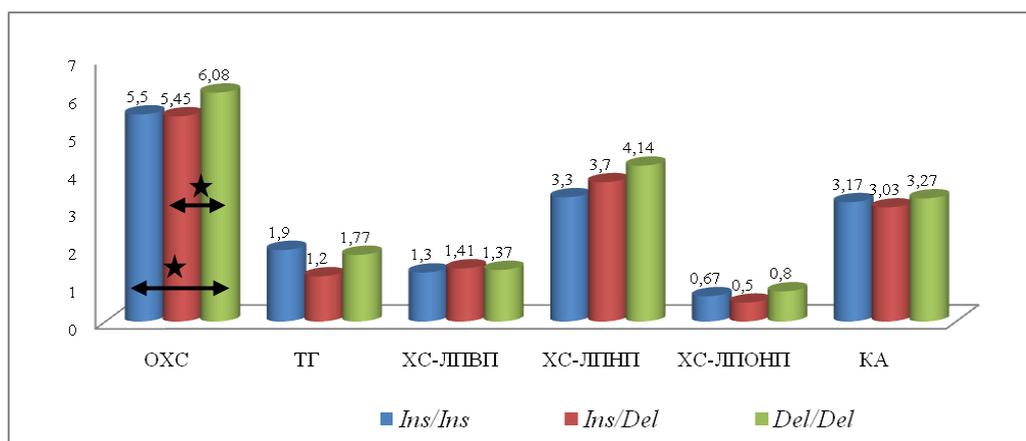


Рисунок 4 - Показатели липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма *Ins/Del* гена *ApoB* в группе подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ

Turner с соавторами показал на смешенной выборке европеоидов, включающей в себя группу пациентов с ранним инфарктом миокарда ($n=682$) и контрольную группу ($n=1312$), показали повышение уровня ОХС, ХС-ЛПНП и аполипопротеина В у носителей аллеля *Del* по

сравнению с *Ins*, но не обнаружили ассоциацию с заболеванием (Turner P.R. et al., 1995). Наши данные сравнения показателей липидного спектра у носителей разных генотипов инсерционно-делеционного полиморфизма (*Ins/Del*) гена *ApoB* в изучаемых группах указывают на ассоциацию носительства аллеля *Del* с повышенным уровнем проатерогенных компонентов липидов (ОХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП). Полученные данные увеличения частоты встречаемости делеционного аллеля как в группе подростков с ЭАГ, так и в группе подростков с ЭАГ+ДЛ, в сравнении с группой контроля, а также ассоциация данного аллеля с повышением ОХС и проатерогенных фракции липидного спектра крови позволяет рассматривать аллель *Del* гена *ApoB* как рисковый в развитии дислипидемии у подростков с ЭАГ.

Сравнительный анализ показателей липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма *S1/S2* гена *ApoC3*. В группе подростков с ЭАГ и дислипидемией, как и в группе контроля, статистически значимых отличии параметров липидного обмена у носителей генотипа *S1/S1* и носителями генотипа *S1/S2* не обнаружено. При сравнении показателей липидного спектра в группе подростков с ЭАГ выявлено статистически достоверное повышение уровня ХЛ-ЛПОНП у носителей генотипа *S1/S2* по сравнению с *S1/S1* ($p=0,048$) (рисунок 5).

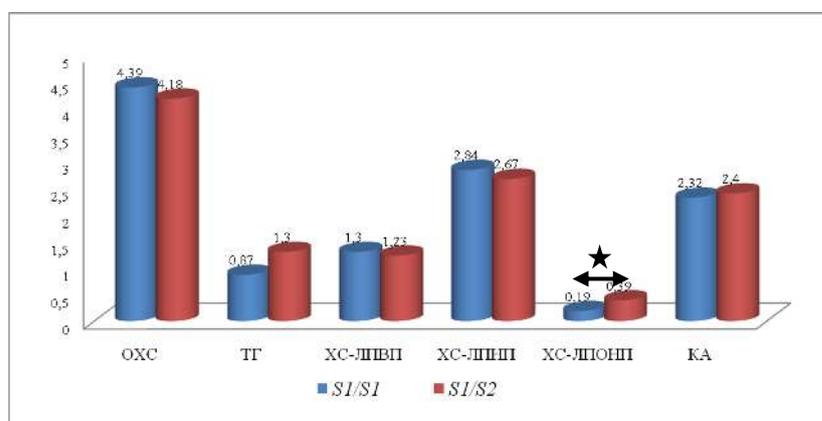


Рисунок 5 - Сравнение показателей липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма *S1/S2* гена *ApoC3* в группе подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ

Аполипопротеин С3 является основным белком (50% белковой фракции) липопротеинов очень низкой плотности (ХС-ЛПОНП) и ингибитором липопротеинлипазы (ЛПЛ), регулируя обмен ТГ. Как было ранее показано Chhabra et al. 2002, у жителей Индии-носителей аллеля *S2* полиморфизма *S1/S2* гена *ApoC3* склонность к гипертриглицеридемии выше в 3,2 раза по сравнению с носителями аллеля *S1*. Предполагают также, что высокая частота встречаемости аллеля *S2* гена *ApoC3* обуславливает генетическую предрасположенность к атеросклерозу (Chhabra S. et al., 2002, 2003; Liu H.K. et al., 2005). По нашим данным у носителей аллеля *S2* по сравнению с носителями *S1* показана тенденция повышения ТГ в крови как в группе подростков

с ЭАГ, так и в группе подростков с ЭАГ+ДЛ, однако такое повышение ТГ не достигло статистической значимости.

Повышение уровня ХС-ЛПОНП у подростков – носителей *S2*-аллеля гена *ApoC3* с указывает на роль данного аллеля в формировании проатерогенной направленности липидного обмена крови у подростков с ЭАГ.

Сравнительный анализ показателей липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфизма $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *ApoE*. Статистически значимых различий показателей липидного спектра у носителей разных генотипов полиморфного локуса $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *ApoE* в трех изучаемых выборках подростков выявлено не было. В ранее проведенных показано градиентное повышение уровня ОХ у носителей $\epsilon 2 \rightarrow$ носителей $\epsilon 3 \rightarrow$ носителей $\epsilon 4$. Данная закономерность сохраняется у представителей разных популяций, что позволило оценивать аллель $\epsilon 2$ как протективную, антиатерогенную (Ruixing Y. et al., 2008), а аллель $\epsilon 4$ как рисковую, проатерогенную (Bernstein M.S. et al., 2002). Топчиевой Л. В. с соавторами было показано, что частота аллеля $\epsilon 4$ и генотипа $\epsilon 3/\epsilon 4$ выше в группе людей страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению с группами контроля (Топчиева Л.В. и др., 2011). В представленной работе не показано ассоциации носительства генотипов или аллелей полиморфного варианта $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *ApoE* с ЭАГ или дислипидемией на фоне ЭАГ, что, возможно, обусловлено особенностью изучаемой выборки и небольшой численностью исследуемой выборки, которая по генотипу гена *ApoE* разделена на пять более мелких групп сравнения. Полагаем, что вклад изучаемого полиморфизма имеет онтогенетически детерминированную фенотипическую реализацию, в результате которой носительство рискованной аллели $\epsilon 4$ детерминирует проатерогенную дислипидемию в более старших возрастных периодах.

Прогностические модели риска развития дислипидемии у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией. На основе биохимических и молекулярно-генетических данных для двух изучаемых групп подростков – группы с ЭАГ и группы ЭАГ с дислипидемией разработаны математические модели вероятности отнесения к группе на основе дискриминантного анализа. Все биохимические и генетические данные были оценены на информативность для включения их как переменных в дискриминантную функцию. Наиболее значимыми среди показателей липидограммы являются ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП, среди генетических полиморфизмов генов: *ApoA1* (*C+83T*) и *ApoB* (*Ins/Del*). Для выбранных переменных рассчитаны стандартизованные коэффициенты и константы дискриминантных функции. По полученным данным сформулированы дискриминантные функции (или прогностические коэффициенты).

Для группы подростков с ЭАГ:

$$F1=26,82*ХС-ЛПВП+9,91*ХС-ЛПНП+13,08*ХС-ЛПОНП+8,97*ApoB(Ins/Del)+0,6*ApoA1(C+83T)-39,34$$

Для группы подростков с ЭАГ и дислипидемией:

$$F2=31,31*XC\text{-ЛПВП}+14,65*XC\text{-ЛПНП}+20,65*XC\text{-ЛПОНП}+6,98*ApoB(Ins/Del) -1,22*ApoA1(C+83T)-58,63$$

Для дискриминации определяли пять факторов: стандартизованные значения показателей XC-ЛПВП, XC-ЛПНП, XC-ЛПОНП и генотипы полиморфных вариантов генов аполипопротеинов *ApoA1 (C+83T)*, *ApoB Ins/Del*. Для расчёта в формулу вносили ранжированные значения генотипов: для *ApoA1 (C+83T)* – гомозиготный генотип *C/C* имеет значение 1, гетерозиготный генотип *C/T* – 2, гомозиготные по минорной рисковой аллели *T/T* – 3; для *ApoB Ins/Del* - гомозиготный генотип *Ins/Ins* имеет значение 1, гетерозиготный генотип *Ins/Del* – 2, гомозиготный генотип по делеции *Del/Del* – 3. При расчете по формуле для каждого подростка получены значения: F_1 – коэффициент вероятности отнесения к группе с низким риском возникновения дислипидемических осложнений на фоне с ЭАГ и F_2 - коэффициент вероятности отнесения к группе с высоким риском возникновения дислипидемических осложнений на фоне с ЭАГ. Отнесение объекта к определенной группе выполняется по максимальному значению коэффициента, при значении $F_1 > F_2$ прогнозируют низкий риск развития дислипидемии, $F_2 > F_1$ - прогнозируют высокий риск развития дислипидемии на фоне ЭАГ.

Данным методом проведен анализ прогностических моделей риска развития дислипидемии у 109 подростков с эссенциальной артериальной гипертензией, в том числе у 39 подростков с гиперхолестеринемией на фоне ЭАГ. Итоговый процент корректного классифицирования или процент правильного отнесения каждого участника исследования к своей группе составил 96,33%. Высокая прогностическая точность предложенной математической модели дает возможность раннего выявления риска развития дислипидемических изменений у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией.

Анализ межгенного взаимодействия полиморфных вариантов генов *ApoA1 (G-75A и C+83T)*, *ApoB Ins/Del*, *ApoC3 S1/S2* и *ApoE ε2/ε3/ε4* в группах подростков с эссенциальной артериальной гипертензией и дислипидемией. Для анализа межгенных взаимодействий полиморфизмов генов липидтранспортной системы использован биоинформатический метод - Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) с использованием программы открытого доступа MDR 3.0.2. (www.epistasis.org/mdr.html). Метод основан на снижении мультифакториальной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction - MDR) или мультифакторном моделировании геномных взаимодействий. Полученные модели характеризуются коэффициентом перекрестной проверки CV (cross-validation) (не менее 90% (9/10) ,точностью теста (balanced accuracy, Bal. Acc.), ошибкой предсказания (Pre.Err), специфичностью (Specificity, Sp) и чувствительности (Sensitivity, Se). Выбирая из полученных результатов модель с наименьшей ошибкой предсказания и наибольшим коэффициентом перекрестной проверки, определяют оптимальную модель межгенного взаимодействия.

По результатам анализа для группы подростков с ЭАГ выделены три значимые модели ($p < 0,0001$) межгенных взаимодействий (сочетание полиморфных локусов): четырехлокусная модель, пятилокусная и шестилокусная модель (таблица 2).

Таблица 2 - Модели межгенного взаимодействия генов липидтранспортной системы у подростков с ЭАГ

N	Комбинации аллелей	Bal. асс.	CV, %	Se	Sp	Pre.Err.
4	<i>ApoA1(+83T)+ApoA1(-75A)+ApoB(Del)+ApoE(ε4)</i>	0,7470	100	0,700	0,7940	0,2530
5	<i>ApoA1(+83T)+ApoA1(-75A)+ApoB(Del)+ApoC3(S2)+ApoE(ε4)</i>	0,76895	90	0,7571	0,7808	0,23105
6	<i>ApoA1(+83T)+ApoA1(-75A)+ApoB(Del)+ApoC3(S2)+ApoE(ε2)+ApoE(ε4)</i>	0,7859	100	0,9143	0,6575	0,2141

Примечание: Здесь и ниже, все модели $p < 0,0001$; N - число локусов модели; Bal. асс. - точность теста (balanced accuracy); CV- коэффициент перекрестной проверки (cross-validation); Pre.Err. - ошибка предсказания (Prediction Error), , Sp - специфичность (Specificity), Se - чувствительности модели (Sensitivity).

Для шестилокусной модели взаимодействия генов проведен кластерный анализ, построена дендрограмма межгенного взаимодействия, представленная на рисунке 6.

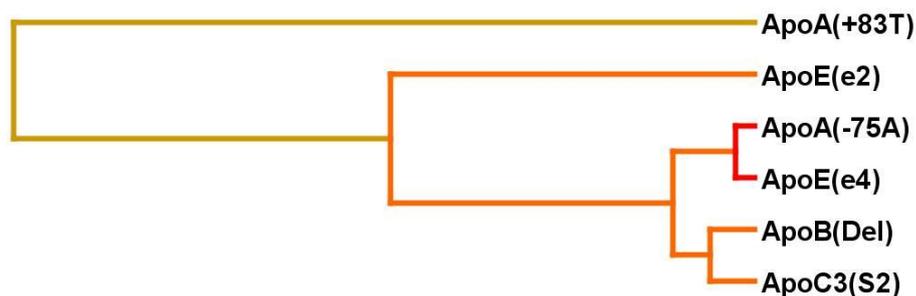


Рисунок 6 - Дендограмма межгенных взаимодействий у подростков с ЭАГ для шестилокусной модели взаимодействия полиморфных вариантов генов

Кластеризация генов в группе подростков с ЭАГ проведена от максимального синергизма к наименьшему синергизму: максимальный синергизм – *ApoA1(-75A) + ApoE(ε4)* - (красные и короткие ветви); умеренный синергизм - *ApoC3(S2)+ApoE(ε4)* – (в одном кластере с предыдущей группой, оранжевые и короткие ветви); слабый синергизм *ApoE(ε2)* – (длинная оранжевая ветвь), независимый эффект – *ApoA1(+83T)* (длинная коричневая ветвь). Также построен график межгенного взаимодействия для шестилокусной модели (рисунок 7).

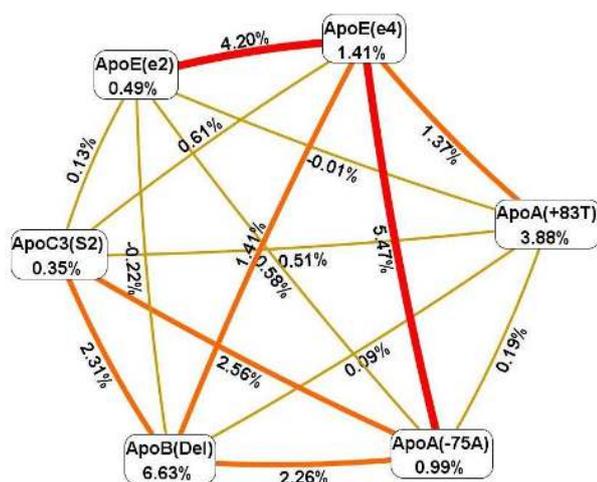


Рисунок 7 - График энтропии межгенных взаимодействий генов липидтранспортной системы в группе подростков с ЭАГ

Оценка величины информации или процента энтропии для каждого полиморфного варианта изучаемых генов, а также оценка вклада их попарного взаимодействия показала, что в данной модели максимальная синтропия характерна для полиморфных вариантов $ApoB(Del)=6,63\%$, $ApoA1(+83T)=3,88\%$ и $ApoE(\epsilon4)=1,41\%$. Максимальное синергичное взаимодействие наблюдается между парами: $ApoE(\epsilon4)$ и $ApoA1(-75A)=5,47\%$. В меньшей степени между $ApoE(\epsilon2)$ и $ApoE(\epsilon4)=4,2\%$.; Умеренный синергизм между $ApoB(Del)$ и $ApoC3(S2)=2,31\%$; $ApoA1(-75A)$ и $ApoB(Del)=2,26\%$; $ApoA1(-75A)$ и $ApoC3(S2)=2,56\%$; $ApoE(\epsilon4)$ и $ApoC3(S2)=1,37\%$.

Далее для оценки межгенного взаимодействия коморбидного состояния ЭАГ+дислипидемия и оценки вклада генов липидтранспортной системы в формирование дислипидемии проатерогенного характера у подростков с ЭАГ проведена оценка межгенного взаимодействия изучаемых полиморфных вариантов генов в группе подростков с ЭАГ и ДЛ (таблица 3).

Таблица 3 - Модели межгенного взаимодействия генов липидтранспортной системы у подростков с ЭАГ и дислипидемией

N	Комбинации аллелей	Bal. ас.	CV, %	Se	Sp	Pre.Err.
3	$ApoA1(-75A)+ApoB(Del)+ApoE(\epsilon4)$	0,7603	100	0,8205	0,700	0,2398
4	$ApoA1(+83T)+ApoA1(-75A)+ApoB(Del)+ApoE(\epsilon4)$	0,7975	100	0,7949	0,800	0,2026
6	$ApoA1(+83T)+ApoA1(-75A)+ApoB(Del)+ApoC3(S2)+ApoE(\epsilon2)+ApoE(\epsilon4)$	0,8115	100	0,7949	0,8280	0,1886

Наиболее значимыми предложенными моделями были: трехлокусная, четырехлокусная и шестилокусная (таблица 3). Для шестилокустной модели построена дендрограмма межгенного взаимодействия (рисунок 8).

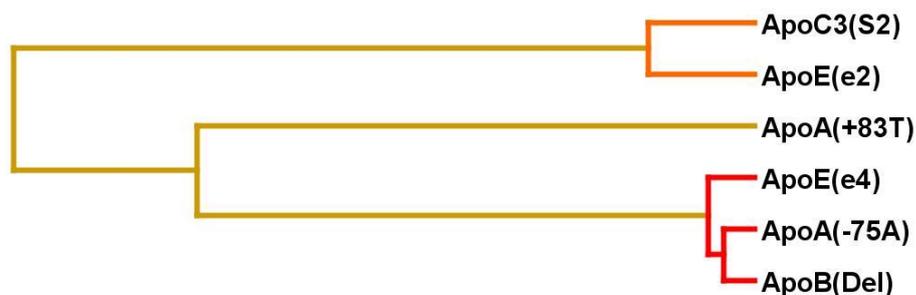


Рисунок 8 - Дендограмма межгенных взаимодействий у подростков с ЭАГ+ДЛ для шестилокусной модели взаимодействия полиморфных вариантов генов

Максимальный синергичный эффект, как и в группе подростков с ЭАГ, наблюдается между полиморфными вариантами *ApoA1(-75A)*, *ApoE(ε4)*, а также *ApoB(Del)*, в сравнении с предыдущей группой пациентов с ЭАГ в кластер «встроен» *ApoB(Del)*. *ApoC3(S2)* и *ApoE(ε2)* образуют кластер с умеренным синергизмом (короткие оранжевые ветви). Для данной модели также был построен график энтропии межгенных взаимодействий - рисунок 9.

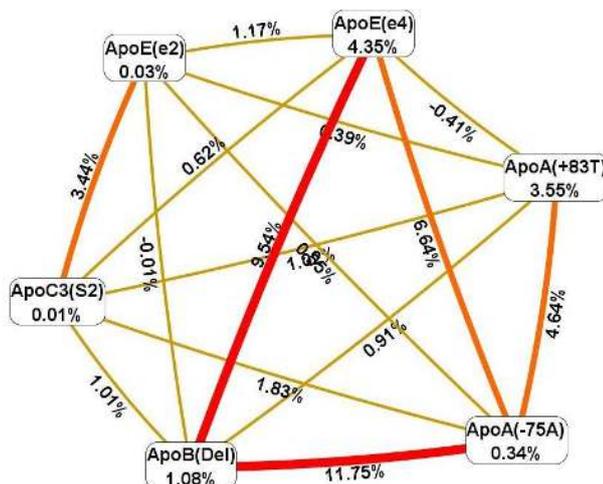


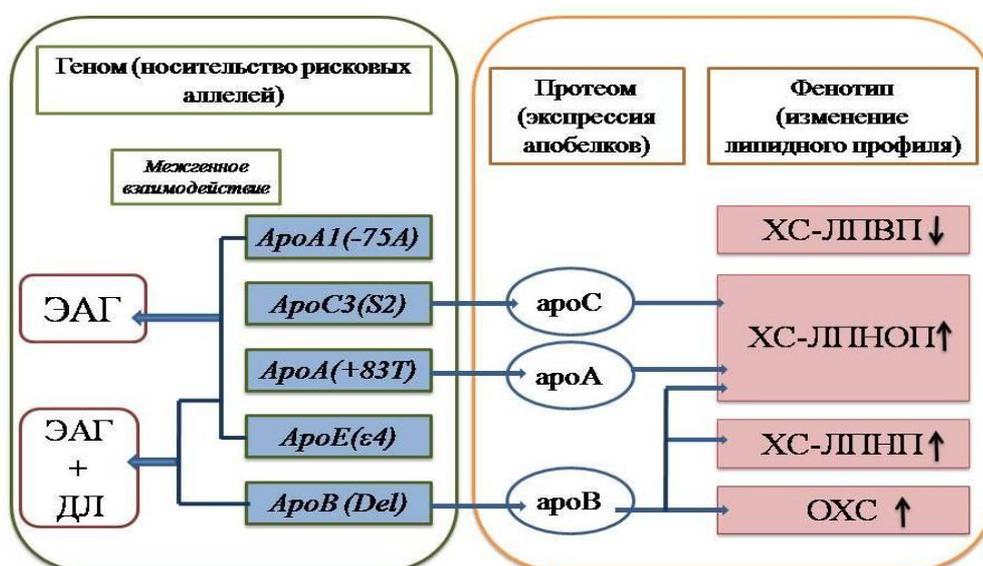
Рисунок 9 - График энтропии межгенных взаимодействий генов липидитранспортной системы в группе подростков с ЭАГ+ДЛ

В узлах графика видно, что максимальная энтропия для изучаемых полиморфных вариантов выявлена для полиморфных вариантов *ApoE(ε4)*=4,35% и *ApoA1(+83T)*=3,55%. Для комбинации полиморфизмов максимальную величину энтропии показали пары: *ApoA1(-75A)* и *ApoB(Del)*=11,75%; *ApoB(Del)* и *ApoE(ε4)*=9,54%. Умеренное синергичное взаимодействие наблюдается между: *ApoE(ε4)* и *ApoA1(-75A)*=6,64; *ApoA1(+83T)* и *ApoA1(-75A)*=4,64; и между *ApoE(ε2)* и *ApoC3(S2)*=3,44%. Оценка межгенных взаимодействии методом MDR показала, что в группе подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ синтропными являются аллели $\epsilon 4$ гена *ApoE* и аллель *Del* гена *ApoB*, для подростков с ЭАГ синтропными являются аллели $\epsilon 4$ гена *ApoE* и (-75A) гена *ApoA*.

Заключение

Артериальная гипертензия и дислипидемия как независимые факторы риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний представляют особый интерес для совместного исследования их генетических основ. Выявление ассоциации полиморфных вариантов генов липидтранспортной системы в группах с ЭАГ и дислипидемией позволяет разработать дифференцированные и персонализированные критерии генетического риска возникновения данных коморбидных патологии.

По результатам проведенного исследования гено-фенотипических взаимоотношений параметров липидного обмена в подростков с ЭАГ и подростков с коморбидным состоянием – ЭАГ+ДЛ нами верифицированы генетические маркеры риска развития нарушений липидного обмена у подростков с ЭАГ (рисунок 10).



Примечание: синим цветом на схеме выделены взаимосвязи по полученным в работе данным.

Рисунок 10 - Генетическая детерминация нарушения липидного обмена у подростков с ЭАГ

Гено-фенотипические взаимосвязи аллеля *Del* гена *ApoB* с повышением уровня ОХС и ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП продемонстрированы как в группе пациентов с ЭАГ, так и в группе пациентов с ЭАГ+ДЛ. В группе подростков с ЭАГ выявлены ассоциации аллель *S2* гена *ApoC3* и *(+83T)* гена *ApoA1* с повышением уровня ХС-ЛПОНП, что позволяет рассматривать данные аллели как маркеры риска проатерогенной дислипидемии. Нами не выявлено взаимосвязи полиморфного варианта *(-75A)* гена *ApoA1* и полиморфного варианта *(ε2/ε3/ε4)* гена *ApoE* с ЭАГ и ЭАГ+ДЛ. Вместе с тем при анализе ген-генных взаимодействий у подростков с ЭАГ выявлен синергизм аллель *(-75A)* гена *ApoA1* и *(ε4)* гена *ApoE*. Для группы подростков с дислипидемией на фоне ЭАГ наблюдается синергизм для вышеуказанных полиморфных вариантов в сочетании с

аллелем *Del* гена *ApoB* (рисунок 10). Верификация геном-модуляторов липидного обмена у подростков с ЭАГ и подростков с коморбидным состоянием – ЭАГ+ДЛ указывает, с одной стороны, на патогенетическую связь изучаемых сердечно-сосудистых заболеваний, с другой, позволяет прогнозировать «сценарий» развития сердечно-сосудистых заболеваний в онтогенезе в виде развития последовательных или развития коморбидных патологических состояний. Полагаем, что носительство делетированного аллеля гена *ApoB* является маркером ранней реализации дислипидемии у пациентов с ЭАГ. Сформированный в результате исследования спектр развития генов – предикторов дислипидемии представляет интерес для дальнейшего изучения потенциальных генетических биомаркеров риска прогрессирования сердечно-сосудистого континуума на разных этапах онтогенеза.

ВЫВОДЫ

1. У подростков группы с ЭАГ по сравнению с группой контроля отмечается повышение уровней ОХС ($p=0,0004$), ТГ ($p=0,0021$), ХЛ-ЛПНП ($p=0,02$) и ХС-ЛПОНП ($p=0,0012$) липидограммы крови, что указывает на ранние проатерогенные изменения в данной группе подростков.
2. Частоты генотипов отдельных полиморфных вариантов генов липидтранспортной системы (*ApoA1*, *ApoB*, *ApoC3* и *ApoE*) у подростков с ЭАГ и подростков с ЭАГ и дислипидемией отличаются за счет статистически достоверного увеличения доли аллеля +83T гена *ApoA1* (OR=4,2; 95% CI: 1,38–13,17) и доли аллеля *Del* гена *ApoB* (OR=2,13; 95% CI: 1,31-3,45) в группе подростков с ЭАГ по сравнению с контрольной группой, а также за счет увеличения доли аллеля *Del* гена *ApoB* в группе подростков с ЭАГ и дислипидемией по сравнению с контрольной группой (OR=2,85; 95% CI: 1,61-5,03).
3. У подростков с ЭАГ в группе носителей аллеля *Del* гена *ApoB* отмечается повышение уровней ОХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП, что позволяет рассматривать *Del* аллель как рисковый для развития дислипидемии.
4. Прогностически важными показателями риска развития дислипидемии у подростков с ЭАГ являются: ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП, а также ранжированные значения генотипов полиморфизмов *ApoA1* (C+83T) и *ApoB* Ins/Del.
5. Анализ межгенного взаимодействия шести полиморфных вариантов генов аполипопротеинов выявил синергичное взаимодействие аллельных вариантов *ApoA1*(-75A), *ApoB*(*Del*) и *ApoE*($\epsilon 4$) как в группе пациентов с ЭАГ, так и в группе с ЭАГ и дислипидемией, с дифференцированным вкладом каждого из аллельных вариантов (для группы с ЭАГ: *ApoA1*(+83T)=3,88%, *ApoB*(*Del*)=6,63% и *ApoE*($\epsilon 4$)=1,41%; для группы ЭАГ+ДЛ: *ApoA1*(+83T)=3,55%, *ApoB*(*Del*)=3,55% и *ApoE*($\epsilon 4$)=4,35%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Калюжная, О.В. Изучение полиморфизма *S1/S2* (*C3238G*, rs5128) Аполипопротеина С3 в европейской популяции Восточной Сибири / Калюжная О.В., Баирова Т.А., Долгих В. В., Колесников С. И. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН . - 2014. - №5. - С.95-97.
2. Колесников, С.И. Полиморфизм гена Аполипопротеина А1 и липидный спектр сыворотки крови в популяциях эвенков и бурят / Колесников С.И., Баирова Т.А., Калюжная О.В., и др // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН . - 2015. - №3 (103). - С.74-78.
3. Баирова, Т.А. Ассоциация полиморфных вариантов гена аполипопротеина А1 с показателями липидного спектра сыворотки крови у подростков Восточной Сибири / Баирова Т.А., Калюжная О.В., Долгих В.В., и др.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. - №160(8). – С. 236–239.
4. Bairova, T.A. Association of Apolipoprotein A1 Gene Polymorphisms with Serum Lipid Spectrum in Adolescents in East Siberia / Bairova T.A., Kalyuzhnaya O.V., Dolgikh V. V., et al. //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. - № 160. - P. 267-270.
5. Колесникова, Л.И. Ген Аполипопротеина-В и его роль в формировании эссенциальной артериальной гипертензии / Колесникова Л.И., Калюжная О.В., Рычкова Л.В., и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2015. - №6 (106). - С. 58-61.
6. Калюжная, О.В. Роль аллельного полиморфизма $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена аполипопротеина Е в регуляции липидного профиля в европеоидной популяции Восточной Сибири / Калюжная О.В., Баирова Т.А., Рычкова Л.В., Колесникова Л.И. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2016. - № 4. С. 59 – 62.

Работы, опубликованные в прочих изданиях

7. Баирова, Т.А. Полиморфизм *C677T* гена *MTHFR* в популяциях Восточной Сибири / Баирова Т.А., Колесников С.И., Долгих В.В., Ивлева К.Д., Калюжная О.В. // Материалы VIII Российского Форума С Международным Участием «Здоровье Детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. Санкт-Петербург-2014». - С. 28-29.
8. Колесников, С.И. Генетический маркер метаболизма *CYP2C19* в русской популяции Восточной Сибири / Колесников С.И., Баирова Т.А., Долгих В.В., Чурбанова С.А., Калюжная О.В. // Материалы VIII Российского Форума С Международным Участием «Здоровье Детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. Санкт-Петербург-2014». – С. 111-112.
9. Калюжная, О.В. Гено-фенотипические взаимоотношения аллельного полиморфизма *S1/S2* гена аполипопротеина-С3 у подростков – европеоидов Восточной Сибири / Калюжная О.В., Баирова Т.А., Рычкова Л.В., Косовцева А.С., Колесникова Л.И. // Материалы IX Российского Форума «Здоровье Детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. Санкт-Петербург-2016». - С. 77-78.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ApoA1* – ген, кодирующий аполипопротеин А1
ApoB – ген, кодирующий аполипопротеин В 100
ApoC3 – ген, кодирующий аполипопротеин С3
ApoE – ген, кодирующий аполипопротеин Е
Bal. Acc. – Balanced Accuracy сбалансированная точность
CV - Cross-Validation (коэффициент перекрестной проверки)
MDR – Multifactor-Dimensionality Reduction
OR – отношение шансов
Pre. Err. - Prediction Error (ошибка предсказания)
Se – Sensitivity (чувствительность)
SNP – Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
Sp – Specificity (специфичность)
АГ – артериальная гипертензия
КГ - контрольная группа
ЛПЛ - липопротеинлипаза
ТГ – триглицериды
ОХС – общий холестерин
ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности
ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности
ХС-ЛПОНП – холестерин липопротеинов очень низкой плотности
ЭАГ - эссенциальная артериальная гипертензия