

Толкачева Ольга Михайловна

**Связь полиморфизма некоторых генов-кандидатов
с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их факторами риска у работников
металлургического производства в Западной Сибири**

14.01.05 – кардиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре терапии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Горбатовский Ян Алексеевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Максимов Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:

старший научный сотрудник отдела
проблем атеросклероза
НИИ клинической кардиологии
им. А.Л.Мясникова ФГБУ
«Российский кардиологический
научно-производственный комплекс»
Минздрава России (г. Москва),
доктор медицинских наук

Малышев Павел Прокопьевич

профессор кафедры факультетской
терапии №1 лечебного факультета
ФГБОУ ВО Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И.М.Сеченова
Минздрава России,
доктор медицинских наук, доцент

Напалков Дмитрий Александрович

Ведущая организация: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово

Защита состоится «___»_____2017 г. в_____ на заседании диссертационного совета Д 208.016.01 при ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России, (101990, г. Москва, Петроверигский пер., д. 10 стр. 3)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России и на сайте www.gnicpm.ru

Автореферат разослан «___»_____2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, с.н.с.

Киселева Наталия Васильевна

Список сокращений и условных обозначений

АГ – артериальная гипертензия
АД – артериальное давление
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДАД – диастолическое артериальное давление
ДИ – доверительный интервал
ЗСМК – Западно-Сибирский Metallургический Комбинат
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМ – инфаркт миокарда
ИМТ – индекс массы тела
КМК – Кузнецкий Metallургический Комбинат
КФК – креатининфосфокиназа
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
МИ – мозговой инсульт
МПЗС – metallургическое производство Западной Сибири
НС – нестабильная стенокардия
ОИМ – острый инфаркт миокарда
ОНП – одноклеточный полиморфизм
ОХС – общий холестерин
ПЦР – полимеразно-цепная реакция
ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
СА – семейный анамнез
САД – систолическое артериальное давление
СН – сердечная недостаточность
СД – сахарный диабет
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТГ – триглицериды
ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности
ХС ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности
ФР – факторы риска
ЧСС – частота сердечных сокращений
ЭКГ – электрокардиография
ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс
ОР – отношение шансов
АСЕ – ангиотензинпревращающий фермент
TNF α – фактор некроза опухоли альфа
IL6 – интерлейкин 6
ММР – матриксные металлопротеиназы

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

ССЗ являются основной причиной смертности во многих странах (А.Н. Климов, 1989; Б.М.Липовецкий, 2004; Р.Г. Оганов, 2007, 2011).

Одновременно сохраняется высокий уровень профессиональной и производственно обусловленной патологии (Н.Г. Артамонова и др.2004; В.И. Стародубов, 2005; Э.И. Денисов и др. 2006; Е.И. Акимова, 2011; Н.Ф. Измеров, 2011; В.В. Косарев и др. 2011). Однако среди работающих наиболее распространенными заболеваниями являются ИБС и АГ (Г.И. Тихонова и др.2010; Е.Э. Лайковецкая и др. 2010), которые длительно протекают бессимптомно (С.А. Бойцов, 2007; Р.И. Стрюк и др. 2014) и диагностируются только при углубленном обследовании пациентов (Е.Д. Докина и др. 2009). Уровень ССЗ металлургов сохраняется высоким в течение многих лет (С.Н. Филимонов, 2007).Изучение механизмов заболеваемости и смертности населения РФ, по мнению С.М. Белозеровой (2011) – мультидисциплинарная задача.

В настоящее время сравнительно хорошо изучены ФР ИБС. Однако в 50% случаев ИМ и МИ развиваются у лиц без нарушений липидного обмена (P.M.Redikeretal. 2013). Нередко АС обнаруживается при отсутствии ФР (В.С. Жданов, 2007), а их наличие не означает его обязательное развитие (Л.А. Лещинский и др.2006). Так, в исследовании GISSI-2 только у 33,2% пациентов, перенесших ИМ в возрасте до 50 лет, ранее была диагностирована стенокардия (Mocetti и соавт. 1997). Недостаточно данных и о механизмах развития ИМ у пациентов без коронарного анамнеза.

Трудно оценивать влияние ФР внешней среды в металлургии (С.Н. Филимонов, 2007). Особенности технологического процесса в металлургии не позволяют исключить влияние неблагоприятных производственных факторов на человека, которые могут оказывать модифицирующее влияние на стандартные ФР ИБС, в результате чего роль одних может возрастать, а других – нивелироваться (И.О. Маринкин и др. 2010; Б.М. Липовецкий, 2009; Р.Л. Ньюсбаум и др. 2010).

Несомненно значение генетического статуса человека и влияние генетико-биохимических маркеров, как на профессиональные, так и общие заболевания, при которых факторы труда могут быть патологическими механизмами их развития и прогрессирования. В связи с этим возрастает значение изучения генетической предрасположенности к ССЗ.

В настоящее время, недостаточно исследований по поиску генетических маркеров, определяющих у работающих ответ на неблагоприятные производственные факторы.

В связи с этим возникла необходимость в изучении генов – кандидатов, продукты

экспрессии которых прямо или косвенно могут участвовать в развитии патологических процессов (E.G. Nabel, 2010).

Выбор генов кандидатов определялся известными данными о связи их полиморфизма с ССЗ с учетом возможных механизмов реализации в патогенезе ИБС.

Цель исследования: Изучение ассоциаций полиморфизма ряда генов-кандидатов с ССЗ и их ФР у лиц, контактирующих с вредными производственными факторами, на примере работников МПЗС.

Задачи исследования:

1. Изучить воздействие вредных производственных факторов на развитие ССЗ у работников МПЗС;

2. Определить частоты аллелей и генотипов генов-кандидатов у лиц, контактирующих с вредными производственными факторами, на примере работников МПЗС и в контрольных выборках;

3. Оценить ассоциации полиморфизма генов-кандидатов с ССЗ и их ФР у лиц, контактирующих с вредными производственными факторами, на примере работников МПЗС.

Научная новизна. Впервые показана ассоциация количества вредных производственных факторов и отдельного влияния вибрации и неблагоприятного микроклимата с развитием ИБС у мужчин, работников МПЗС.

Впервые изучены частоты 64 SNP в популяции Западной Сибири.

Впервые отмечена ассоциация полиморфизма генов *LTF*, *FYCO1*, *CCR5*, *TNF*, *XCRI*, *SELE*, *PON2*, *HPSE2*, *ACE*, *IL-6*, *MMP* с развитием ИБС у мужчин, работников МПЗС.

Впервые определена ассоциация полиморфизма генов rs5888(*SCARB1*), rs1805017(*PLA2G7*), rs2638118 (*11p 14.1*), и rs13900(*CCL2*) с развитием ИБС у женщин, работниц МПЗС.

Впервые показано различие среднего уровня глюкозы крови у мужчин исследуемой группы с ИБС у носителей разных генотипов ОНП: rs1520483 (*xp. 3*), rs17078944 (*LRRC2*, *xp. 3*), rs5888 (*SCARB1*, *xp. 12*), rs5369 (*EDNI*, *xp. 6*), rs2638118 (*xp. 11*), индекса массы тела у носителей ОНП: rs17078944 (*LRRC2*, *xp. 3*); rs2734648(*CCR5*; *xp. 3*); rs1034384 (*LTF*, *xp. 3*).

Практическая значимость. По результатам исследования выявлены ОНП маркёры, ассоциированные с ИБС у мужчин, работников МПЗС, которые могут служить основой для формирования групп повышенного риска этого заболевания (после воспроизведения

результатов на большой выборке).

Внедрение в практику. Данные настоящего исследования используются при медико-генетическом консультировании в медико-генетическом отделе ГНОКДЦ и в преподавании на кафедре медицинской генетики НГМУ.

Положения выносимые на защиту

1. ССЗ у мужчин, работников МПЗС, чаще выявляются при воздействии вибрации и неблагоприятного микроклимата, а также при увеличении общего количества вредных производственных факторов.

2. У мужчин, контактирующих с вредными производственными факторами, с ИБС ассоциированы однонуклеотидные полиморфизмы генов: *LTF*, *TNF*, *FYCO1*, *CCR5*, *XCRI*, *SELE*, *PON2*, *HPSE2*, *IL-6*, *MMP*.

3. У женщин, контактирующих с вредными производственными факторами, с ИБС ассоциированы ОНП генов: *SCARB1*, *PLA2G7*, *CCL2*, и *rs2638118 (11p14.1)*,

4. У мужчин исследуемой группы с ИБС показано различие: уровня глюкозы крови у носителей разных генотипов ОНП: *rs1520483 (3p21.31)*, *rs17078944 (LRRC2)*, *rs5888 (SCARB1)*, *rs5369 (EDN1)*, *rs2638118 (11p14.1)*, и ИМТ у носителей ОНП: *rs17078944 (LRRC2)*, *rs2734648 (CCR5)*, *rs1034384(LTF)*.

Апробация диссертации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены 28 октября 2014 г. на заседании проблемной комиссии по внутренним болезням ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 – в журналах из перечня, рекомендованного ВАК. Основные положения диссертации были представлены на международных и российских конференциях: Всероссийская конференция «Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний», Новосибирск, 2008; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов», Новосибирск 2009; Всероссийской научно-практической конференции «Перспективы кардиологии России в XXI веке», Москва 2009; Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии», Новосибирск, 2010.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения; 3 глав, включающих: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и обсуждения; заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, содержащий 168 отечественных и 63 зарубежных

источников. Работа изложена на 109 страницах компьютерной верстки. Работа иллюстрирована 80 таблицами и 1 рисунком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе использованы данные, полученные при обследовании выборки пациентов кардиологических отделений трех городских больниц – работников металлургических комбинатов - всего 266 чел.

Критерии включения (группа исследования)

- работники металлургического производства г.Новокузнецк;
- работающие во вредных условиях труда;
- госпитализированные в кардиологические отделения трех городских больниц г.Новокузнецк с направительным диагнозом: ИБС.

Критерии исключения (контрольная группа n=106)

- работники металлургического производства г.Новокузнецк;
- работающие во вредных условиях труда;
- не имеющие сердечно-сосудистой патологии

Контрольная группа подбиралась во время профосмотров работников на базе поликлиники ЗСМК.

Антропометрический метод. В обеих обследуемых группах для измерения массы тела использовались медицинские рычажные весы, проверенные специалистом. Точность измерения массы тела – до 0,1 кг. Для характеристики массы тела использовали ИМТ – индекс Кетле, рассчитываемый как отношение массы тела в кг к росту в м². Массу тела считали нормальной при значениях индекса Кетле < 25, повышенной – при значениях 25-29,9, ожирение – при значениях > 30.

Измерение роста проводили при помощи ростомера, точность измерения длины тела – до 0,5 см.

Клинические методы. При обследовании пользовались стандартными методами. В программу обследования пациентов сердечно-сосудистых отделений входило анкетирование по разработанной карте комплексного клинико-генетического обследования, где учитывались ФИО, возраст, пол, профессия, наличие профессиональных вредностей, стаж работы во вредных условиях, курение с определением индекса курильщика, употребление алкоголя, наличие СД, АГ и стратификация ее по ФР. Для классификации форм ИБС использованы принятые формулировки - острый коронарный синдром – ИС,

неQ-ИМ, Q-ИМ. Фиксировались осложнения ИМ: отек легких, шок, нарушение ритма и проводимости, сердечная недостаточность. Биохимические исследования – АСТ, АЛТ, КФК, ЛДГ, ОХС, липопротеиды, сахар крови, проводились в лабораториях стационаров по стандартным методикам. Также указывались лекарственные средства, применяемые в лечении пациентов. Наличие профессиональных вредностей брали из карты профилактических осмотров работника, где они фиксированы согласно приказу № 90 МЗ России.

Контрольная группа состояла из практически здоровых работников металлургических комбинатов. Все они имеют стаж работы во вредных условиях, каждый год проходят периодический профилактический медицинский осмотр и не имеют никаких заболеваний сердечно-сосудистой системы. Они также анкетированы и обследованы, как и основная группа.

Измерение АД проводили непрямым аускультативным методом с использованием механического тонометра дважды с интервалом 5 мин и фиксировалось среднее значение. За АГ принимали САД ≥ 140 мм рт. ст., ДАД ≥ 90 мм рт. ст. или любые цифры АД на фоне приема антигипертензивных препаратов.

Представителям обеих групп регистрировали ЭКГ покоя в 12 стандартных отведениях в положении лежа на спине на 6-канальном электрокардиографе 6-НЕК с последующей оценкой специалистом.

Забор крови осуществляли в лабораторных подразделениях стационаров и поликлиник. Кровь для исследований брали из локтевой вены утром, натощак, замораживали и хранили при отрицательной температуре. В лабораторию материал доставляли в контейнерах, не допуская размораживания.

Выбор генов-кандидатов определяли используя известные данные о связи их полиморфизма с ССЗ, которые могли являться ФР ИМ. Также при выборе генов-кандидатов учитывались возможные механизмы их реализации в патогенезе ИМ.

Методы молекулярно-генетического анализа

Выделение ДНК из крови проводилась методом фенол-хлороформной экстракции. Исследование I/D полиморфизма в гене ACE проводилось в лаборатории молекулярно-генетических исследований ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины». Исследование ОНП в генах TNF α , MMP2, MMP9, IL6 проводилось в Институте клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, лаборатории клинической иммуногенетики г.Новосибирск. Генотипирование аллельных вариантов осуществляли с помощью ПЦР с ПДРФ анализом.

Генотипирование 64 ОНП. Пилотный проект по поиску генов предрасположенности к ИМ в ассоциативном исследовании путем массового генотипирования ОНП маркеров с помощью технологии TaqMan SNP Genotyping Assays был выполнен в сибирской популяции в 2004-2005 гг. Сибирская популяция характеризуется высокой распространенностью ИМ и проживает в специфических климатических и социальных условиях. В анализ были включены 64 ОНП маркера. Они были разделены на три группы:

- маркеры в районе p21 3-й хромосомы, содержащем ген CCR2
- маркеры генов других хемокиновых рецепторов и их лигандов
- маркеры других генов-кандидатов ИМ.

Выбор маркеров проводился по базе данных компании Applied. Список представлен в таблице 1. Одной из подвыборок, включённых в пилотный проект, стала выборка пациентов кардиологических отделений трех городских больниц Новокузнецка – работники МПЗС – всего 100 человек с ИБС 85 мужчин и 15 женщин. В качестве контрольной группы были взяты подростки 14-17 лет, учащиеся средних общеобразовательных школ Октябрьского района г. Новосибирска 185 мальчиков и 253 девочки – всего 438 человек. Молодой возраст контрольной группы позволяет получить более строгие оценки ассоциации.

Таблица 1.

Список ОНП

	ОНП	Ген	Хромосома
1.	rs12740458		1
2.	rs1764390	GJA4	1
3.	rs5368	SELE	1
4.	rs5361	SELE	1
5.	rs6125	SELP	1
6.	rs17141079		3
7.	rs1520483		3
8.	rs13100243		3
9.	rs13084057		3
10.	rs1471962		3
11.	rs6771900		3
12.	rs4683222		3
13.	rs916092		3
14.	rs35568430	CCRL2	3
15.	rs1491962		3
16.	rs3136673	CCR1	3
17.	rs1799865	CCR2	3
18.	rs1799864	CCR2	3
19.	rs746492	CCR5	3
20.	rs2734648	CCR5	3
21.	rs1488371	CCR9	3

22.	rs3732378	CX3CR1	3
23.	rs3732379	CX3CR1	3
24.	rs751552	FYCO1	3
25.	rs76597151	FYCO1	3
26.	rs2234358	FYCO1	3
27.	rs34478154	LRRC2	3
28.	rs17078944	LRRC2	3
29.	rs3806701	LRRC2	3
30.	rs2073495	LTF	3
31.	rs1034384	LTF	3
32.	rs13097556	XCR1	3
33.	rs425535	CXCL5	4
34.	rs2367288	LOC728045	4
35.	rs4914	CD14	5
36.	rs13159715	LOC285588	5
37.	rs1805017		6
38.	rs5370	EDN1	6
39.	rs5369	EDN1	6
40.	rs2229094	LTA	6
41.	rs1805018	PLA2G7	6
42.	rs11975458		7
43.	rs1115715	C7orf10	7
44.	rs11465293	CCL24	7
45.	rs1198062		10
46.	rs1471352	HPSE2	10
47.	rs2638118		11
48.	rs679620	MMP3	11
49.	rs5888	SCARB1	12
50.	rs5892	SCARB1	12
51.	rs338164	WSCD2	12
52.	rs11616478		13
53.	rs11629070	RAD51L1	14
54.	rs34379253	CCL17	16
55.	rs4359426	CCL22	16
56.	rs241854292	CCR7	17
57.	rs7206979		17
58.	rs1129844	CCL11	17
59.	rs16971802	CCL14	17
60.	rs13900	CCL2	17
61.	rs4586	CCL2	17
62.	rs1133763	CCL8	17
63.	rs34202026	CCL8	17
64.	rs7493	PON2	17

Статистическая обработка полученных результатов проводили на персональном компьютере типа "IBM PC" с использованием пакета программ "SPSS-11.5". На первом этапе определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых генов-кандидатов в группе больных и в контрольных выборках. Для оценки соответствия частот генотипов

равновесию Харди-Вайнберга использовался критерий χ^2 . Сравнение уровня таких показателей, как рост, масса тела, ИМТ, АД (систолическое, диастолическое, пульсовое), ЧСС, ОХС, ХС ЛНП, ХС ЛВП, ТГ, индекс атерогенности, глюкоза крови, у носителей разных генотипов проводили после проверки нормальности распределения этих признаков по тесту Колмогорова-Смирнова. Если признак отвечал критериям нормального распределения, то использовали однофакторный дисперсионный анализ и многогранговый тест Дункана. В случае, если изучаемый признак не удовлетворял критериям нормального распределения, сравнение уровня этого признака у носителей разных генотипов проводилось с помощью теста Крускала-Уоллиса, достоверность различий между двумя генотипическими классами дополнительно проверяли с помощью теста Манна-Уитни для двух независимых выборок. Ассоциация ОНП с ФР проверялась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырёхпольных таблиц сравнение выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия, если вероятность абсолютно случайного их характера не превышала 5% ($p < 0,05$)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура исследуемой выборки. Анализ ассоциаций с вредными производственными факторами.

Исходно в исследование были включены 266 пациентов с направительным диагнозом ИМ, однако в процессе обследования у 55 пациентов диагноз ОИМ был изменен на нестабильную стенокардию, а у 20 пациентов был исключен диагноз ИБС. 106 человек составили контрольную группу. Клиническая характеристика исследуемой и контрольной групп представлена в таблице 2. Выявлены достоверные различия между группами здоровых и пациентов с ИМ по таким показателям, как ИМТ, масса тела, уровень АД. По такому ФР, как курение, достоверные различия между группами отсутствовали.

Таблица 2

Общая характеристика обследованных пациентов с ИМ в анамнезе и здоровых лиц

Параметры	Здоровые лица (n = 106)	Пациенты с ИБС (n = 246)	p
Возраст, лет	51,990± 4,208	53,701±7,815	0,058
Стаж курения, лет	23,150±15,400	21,093±15,203	0,390

Индекс курильщика	162,840±111,401	158,269±120,846	0,800
Масса тела, кг	74,350±10,076	78,038±13,914	0,025
ИМТ	24,893±2,894	26,550±4,393	0,001
САД, мм рт. ст.	124,190±9,478	143,227±24,435	0,000
ДАД, мм рт. ст.	79,300±5,397	92,539±13,103	0,000
ТГ мг/дл	-	149,400±107,195	-
ОХС, мг/дл	-	217,933±48,316	-
ХС ЛВП	-	50,380±13,082	-
Индекс атерогенности		3,872±1,689	-

При анализе распространенности вредных факторов производственной деятельности в контроле и в группах больных с разными формами ССЗ были обнаружены некоторые тенденции. В контроле меньше лиц, которые контактировали с вибрацией, по сравнению с больными ИМ – 2,8 % и 9 %. ОР обнаружить мужчин, работавших с вибрацией среди больных ИМ в 3,5 раза выше, чем в группе контроля – 95 % ДИ 1.0-12.5 (p=0.046). В неблагоприятном микроклимате работал 21 % мужчин из контроля и 67 % мужчин с ИМ ОР 8,0; 95 % ДИ 4,5-14,2 (p=0,0001). Больные НС, АГ также часто работали в неблагоприятном микроклимате. Кроме того, больные с ССЗ значительно чаще трудились в условиях, требующих физического и нервно-психического напряжения (таблица 3).

Таблица 3

Доля мужчин, на которых действовали вредные факторы в процессе производственной деятельности в контроле и в группах больных

Вредный фактор	Группы							
	Контроль		Q-ИМ		неQ-ИМ		Нестабильная стенокардия	
	п	%	п	%	п	%	п	%
Пыль	106	100,0	89	69,5	25	75,8	28	73,7
Шум	81	76,4	89	69,5	25	75,8	25	65,8
Вибрация	3	2,8	12	9,4	3	9,1		
Неблагоприятный микроклимат	22	20,8	87	68,0	22	66,7	31	81,6
Физическое напряжение	24	22,6	68	53,1	21	63,6	29	76,3
Нервно-психическое напряжение			35	27,3	6	18,2	8	21,1

Различий по возрасту начала работы во вредных условиях между контролем и группами

с разными ССЗ не выявлено. Однако удалось обнаружить значительное повышение в основной группе больных (в 5-7 раз), по сравнению с контрольной группой, контактировавших с четырьмя вредными факторами в процессе производственной деятельности. В контроле не оказалось лиц контактировавших с пятью вредными факторами, тогда как среди больных они составляли от 5% до 15 %.

Половина мужчин в контроле имели контакт с 2 вредными факторами, с 3 – 26,4 %, с 4 – 6,6 %; иными словами, чем больше вредных факторов, тем меньше доля таких лиц в контроле. Тогда как при ССЗ у мужчин, независимо от формы наблюдается обратная тенденция – чем больше вредных факторов (1-- 4), тем больше доля таких лиц в группе больных (рисунок 1). У женщин такой зависимости выявить не удалось.

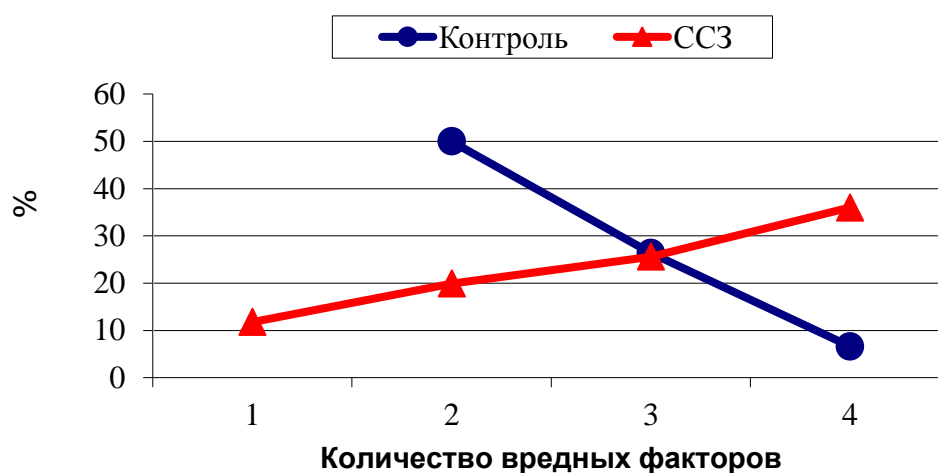


Рис. 1 Доля мужчин в контроле и в группе больных ССЗ, работавших в контакте разным количеством вредных факторов

Если сравнить долю мужчин с СД в контроле и в группе с Q-ИМ, то имела место тенденция к накоплению случаев СД в группе с Q-ИМ. Для мужчин с СД иметь Q-ИМ в 4.8 раза выше, чем без СД 95 % ДИ 1.3-18.0 ($p=0,016$) (таблица 4).

Таблица 4.

Распространенность СД у мужчин в контроле и в группах больных

СД	Группы									
	Контроль		Q-ИМ		неQ-ИМ		НС		АГ	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Нет	104	98,1	119	93,0	33	100	37	97,4	12	100
Есть	2	1,9	9	7,0			1	2,6		

Анализ ассоциаций некоторых ОНП маркёров с ССЗ

IL6 – ключевой медиатор воспалительного ответа, продуцируемый в основном активированными макрофагами, может играть важную роль в совокупных процессах

воспаления и атерогенеза. IL6 оказывает разнообразное и очень существенное влияние на многие органы и системы организма: кровь, печень, иммунную и эндокринную системы, а также на метаболизм. Показано, что IL6 влияет на синтез белков острой фазы воспаления гепатоцитами и способствует увеличению концентрации СРБ – одного из маркеров развития воспаления и острого инфаркта миокарда. Следует отметить, что пик концентрации СРБ коррелирует с максимальным увеличением концентрации IL6. С уровнем продукции этого провоспалительного белка связывают аллельный полиморфизм промоторного региона гена IL6, в частности в позиции -174 G/C.

Была выявлена ассоциация этого полиморфизма с развитием ИМ. CC-генотип чаще встречается в группе с ИМ, GG-генотип в группе контроля ($p=0,044$) (рисунок 2).

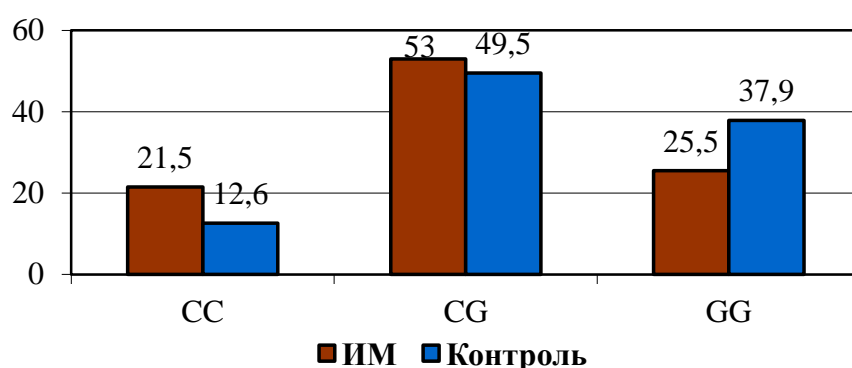


Рис. 2 Особенности распределения генотипов IL6 у пациентов, перенесших ИМ, и здоровых лиц

ММР играют важную роль в развитии ССЗ, в частности, в появлении и прогрессировании атеросклеротического процесса. ММР – группа протеолитических ферментов, активно участвующих в процессах ремоделирования ЭЦМ, разрушающих его компоненты, такие как эластан, коллаген и т.д. Большое значение в деградации ЭЦМ отводится ММР2 и ММР9, которые облегчая проникновение моноцитов через эндотелий способствуют активации тромбоцитов и каскаду коагуляции. При анализе образцов крови, взятых из аорты в пределах 12ч от начала ИМ и 48ч от начала НС, выявлено достоверное повышение уровня ММР9 по сравнению с таковым у больных стенокардией напряжения и здоровых людей. На основании этого, ряд авторов рекомендуют использовать ММР9 в качестве маркера острой фазы, т.е. фазы разрыва АБ. Динамика уровня ММР2 у больных с разными формами ИБС нуждается в дальнейшем изучении, тем не менее, в ряде исследований показано достоверное повышение уровня ММР2 у больных с НС и ИМ по сравнению с таковым у здоровых. Исходя из этого, был проведен анализ полиморфизма промоторного региона гена ММР2 в позиции -1306 и гена

ММР9 в позиции -1562 у пациентов с ИМ, НС в анамнезе. Была выявлена достоверная ассоциация изучаемых полиморфизмов с возрастом развития ИМ. Для полиморфизма гена ММР9 различия были достоверны в подгруппе пациентов < 55 лет (48-29%) по сравнению с контролем. В подгруппе > 55 лет различия отсутствовали. В случае с полиморфизмом ММР2, СС-генотип чаще встречается в подгруппе > 55 лет (таблица 5).

Таблица 5

Частота генотипов и аллелей полиморфизма rs243865 гена ММР2 и полиморфизма rs3918242 гена ММР9 у пациентов с ИМ в возрастных подгруппах

Полиморфизм	Пациенты с ИМ < 55 лет, %	Пациенты с ИМ > 55 лет, %	Здоровые, %	OR ИМ < 55 лет/ здоровые	OR ИМ > 55 лет/ здоровые
ММР9 (-1562)	n=52	n=74	n=95		
СС	27 (51,92)	52 (70,27)	67 (70,54)	0,46*	0,99
СТ + ТТ	25 (48,08)	22 (29,73)	28 (29,48)	2,21*	1,01
С	79 (75,96)	126 (85,14)	159 (83,68)	0,62*	1,12
Т	25 (24,04)	22 (14,86)	31 (16,32)	1,62*	0,90
ММР2 (-1306)	n=39	n=45	n=95		
СС	18 (46,15)	31 (68,89)	49 (52,12)	0,79	2,03*
СТ + ТТ	21 (53,85)	14 (31,11)	45 (47,88)	1,27	0,49*
С	55 (70,51)	74 (82,22)	134 (71,27)	0,96	1,86*
Т	23 (29,49)	16 (17,78)	54 (28,73)	1,04	0,54*

Ген ACE локализован на 17-хромосоме, экспрессируется во многих тканях, включая эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, с мембран которых попадает в кровь, гидролизует ангиотензин I в ангиотензин II и инактивирует брадикинин, который способствует развитию АГ, атеросклероза, фиброза и тромбоза, супрессируя фибринолиз. Было доказано, что уровень концентрации ACE в сыворотке на 50% связан с инсерционно-делеционным полиморфизмом (I/D) 16 интрона гена ACE. Достоверных ассоциаций изучаемого полиморфизма с ИБС получено не было. Но была выявлена ассоциация инсерционно-делеционного полиморфизма гена ACE с развитием СН у пациентов с ИМ. OR развития СН, как осложнения ИМ, оказалось выше у носителей гетерозиготного генотипа, по сравнению с носителями двух других генотипов – OR =2,8 95% ДИ 1,2-6,4 (p=0,018).

Ген TNFα является ключевым медиатором формирования и прогрессирования атеросклеротических поражений сосудов. Концентрация TNFα в плазме ассоциирована со степенью развития раннего АС.

G-238-A – достоверное увеличение у пациентов с НС более, чем в 2 раза;

G-308-A- ассоциирован с высоким уровнем в плазме маркеров ишемии, чаще развитие Q-ИМ, развитие МС; раннее развитие РА;

C-863-A-ассоциирован с развитием РА

Достоверных ассоциаций изучаемых полиморфизмов с ИБС получено не было. Но, было выявлено влияние полиморфизма G-238-A на развитие СН, как осложнения ИМ – OR = 3; 95% ДИ 1,1-8,4 (p=0,05).

Анализ ассоциаций 64 ОНП маркёров с ИБС на подвыборке больных ИБС (n=100).

Маркеры в районе р21 3-й хромосомы, содержащем ген CCR2

Ген лактоферина (LTF) находится на хромосоме 3, является членом семейства генов трансферринов, его белковый продукт обнаружен в гранулах нейтрофилов, в молоке, сыворотке крови. Этот белок является важным компонентом неспецифической иммунной системы. Полиморфизм rs2073495 гена LTF достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа CG в группе с ИБС в 2,1 раза выше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,2-3,5 (p=0,008). В то время как носительство генотипа CC, наоборот ассоциировано со снижением риска развития ИБС – OR=0,054; 95% ДИ 0,32-0,91 (p=0,025) (рисунок 3).

Ещё один ОНП в гене LTF достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин – rs1034384. OR обнаружить носителя аллеля G в группе с ИБС в значимо меньше, чем в контроле – 95 % ДИ 0,3-0,9 (p=0,03) (рисунок 4).

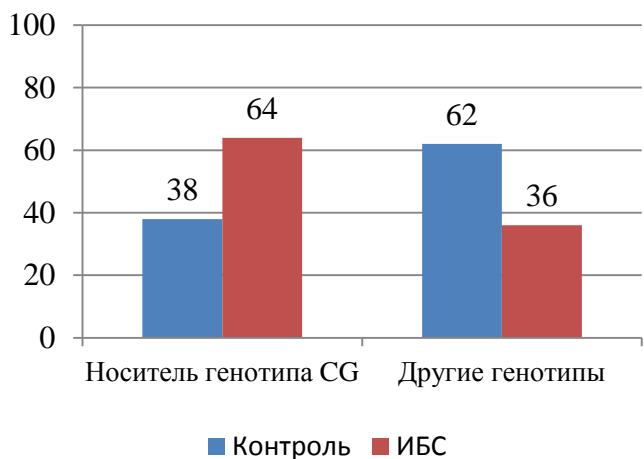


Рис.3 Генотип rs 2073495 LTF

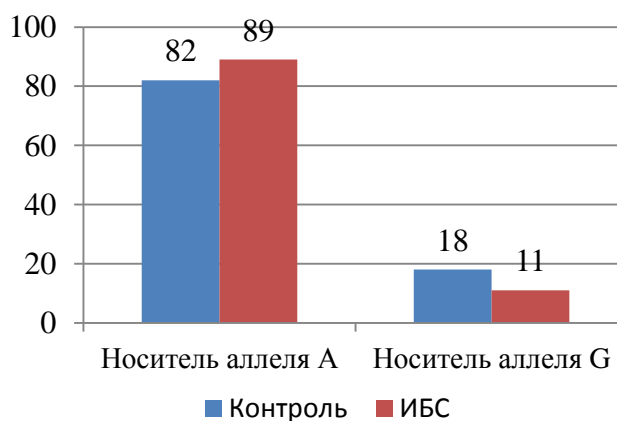


Рис. 4 Генотип rs1034384 гена LTF

Полиморфизм rs751552 гена FYCO1 достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа TT в группе с ИБС в 2 раза выше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,0-3,8 (p=0,05) (рисунок 5).

Полиморфизм rs3806701, который находится на хромосоме 3 вблизи 5' конца гена LRRC2, достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа AG в группе с ИБС в 1,9 раза выше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,1-3,2 (p=0,022) (рисунок 6).

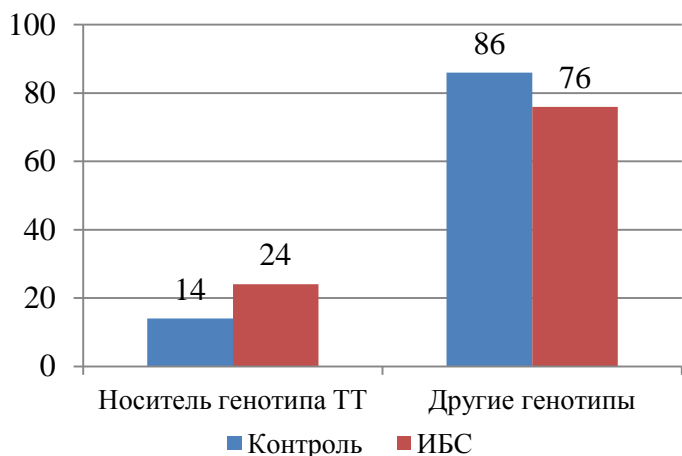


Рис.5 Генотип rs751552 гена FYCO1

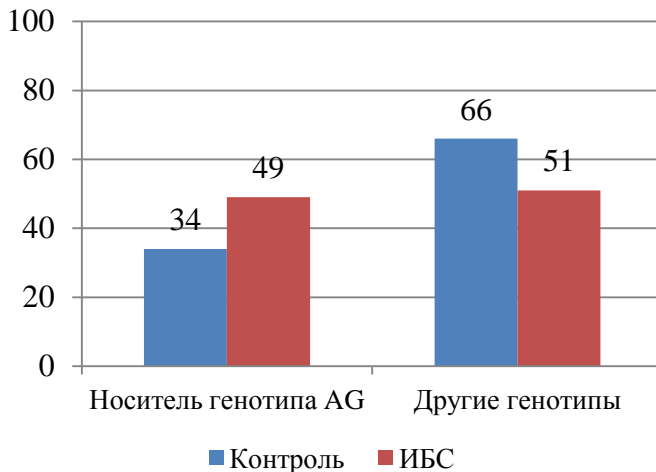


Рис. 6 Генотип rs3806701 гена LRRC2

Полиморфизм rs2734648 гена CCR5 расположенного на хромосоме 3, достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа GT в группе с ИБС в 1,9 раза выше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,1-3,1 (p=0,025) (рисунок 7).

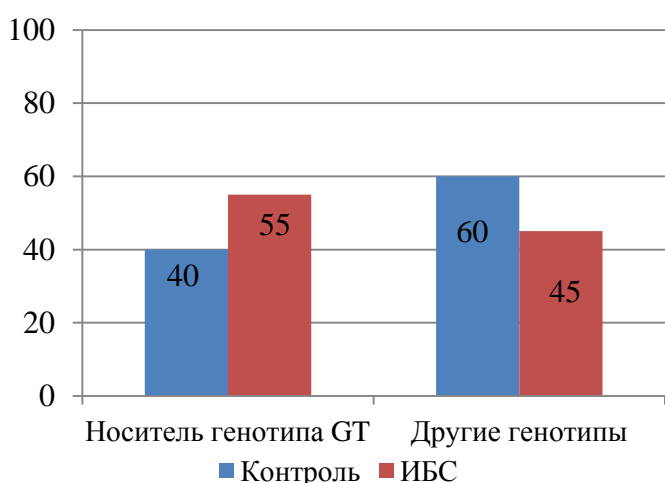


Рис.7 Генотип rs2734648 гена CCR5

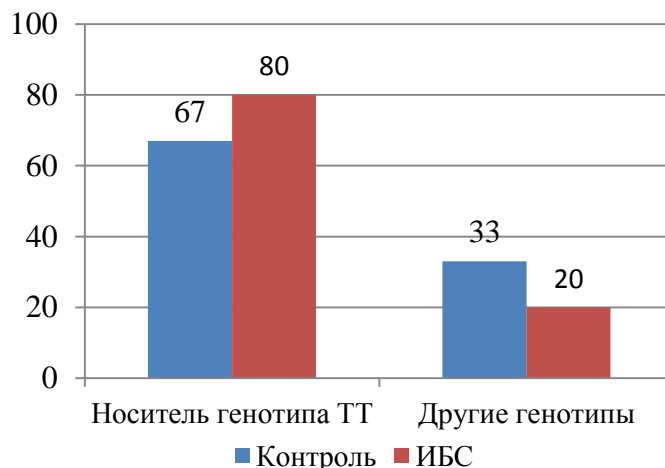


Рис.8 Генотип rs13097556 гена XCR1

Полиморфизм rs13097556, расположенного на хромосоме 3 вблизи 3' конца гена XCR1, достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа TT в группе с ИБС в 2 раза выше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,1-3,6 (p=0,008). В то время как носительство аллеля С, наоборот ассоциировано со снижением риска развития ИБС – OR=0,53; 95 % ДИ 0,30-0,92 (p=0,023) (рисунок 8).

Маркеры в генах других хемокиновых рецепторов и их лигандов

Ген селектина Е (SELE) находится на хромосоме 1, экспрессируется клетками эндотелия в ответ на стимуляцию цитокинами. Белок ответственен за аккумуляцию лейкоцитов крови в месте воспаления посредством их адгезии. Носители генотипов с аллелем Т полиморфизма

rs5368 гена SELE у мужчин реже встречаются в группе с ИБС, по сравнению с контролем, OR – 3,3 (p=0,004) (рисунок 9).

Полиморфизм rs13900 гена CCL2 (хр. 17) достоверно ассоциирован с ИБС у женщин. OR обнаружить носителя генотипа CC в группе с ИБС меньше, чем в контроле – 0,24; 95 % ДИ 0,07-0,87 (p=0,031) (рисунок 10).

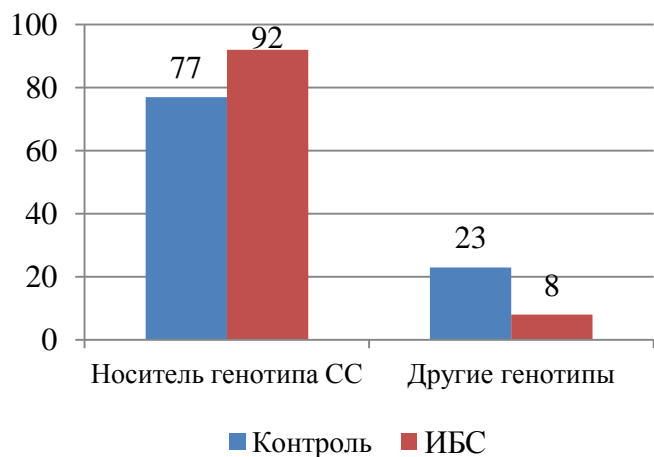


Рис. 9. Генотип rs5368 гена SELE

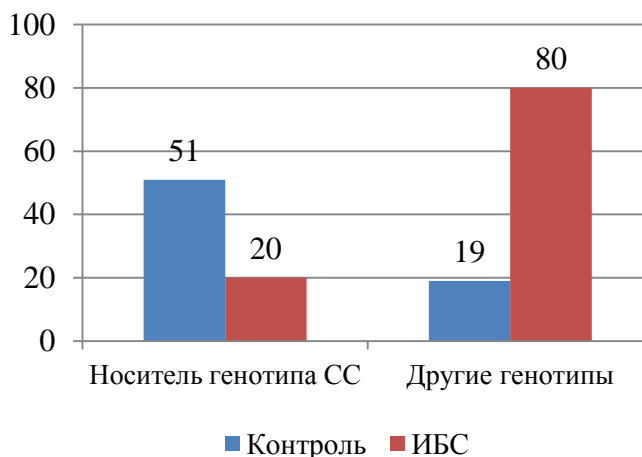


Рис. 10. Генотип rs13900 гена CCL2

Маркеры в других генах-кандидатах ИБС

Полиморфизм rs1471352 гена гепараназы 2 (HPSE2) находится на хромосоме 10, достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа СТ в группе с ИБС значительно выше, чем в контроле (p=0,013) (рисунок 11).

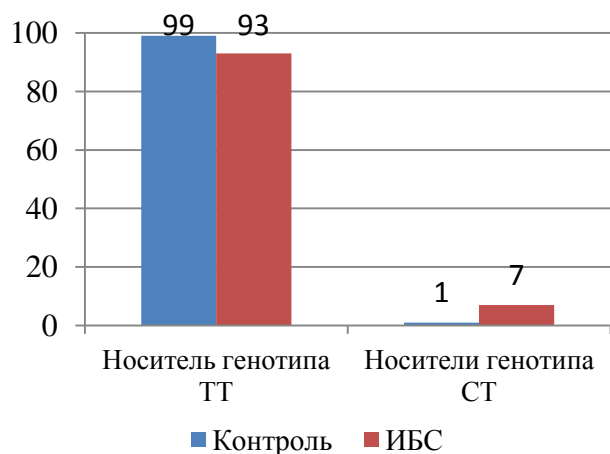


Рис. 11. Генотип rs1471352 гена HPSE2

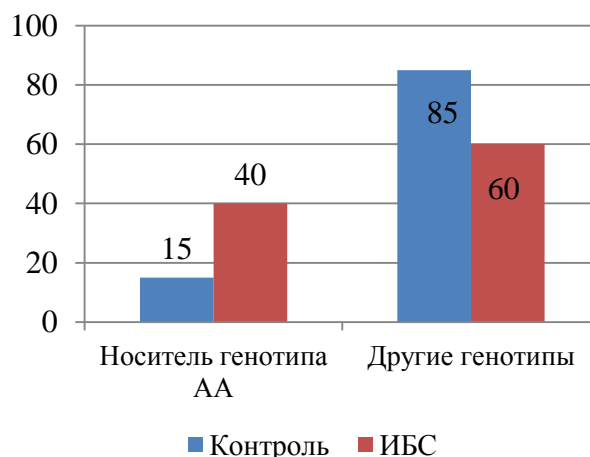


Рис. 12. Генотип rs5888 гена SCARB1

Полиморфизм rs5888 гена SCARB1 (хр. 12), достоверно ассоциирован с ИБС у женщин. OR обнаружить носителя генотипа AA в группе с ИБС в 3,8 раза больше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,3-11,2 (p=0.022) (рисунок 12).

Ген PLA2G7, phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma) расположен на хромосоме 6. Полиморфизм rs1805017 достоверно ассоциирован с ИБС у женщин. OR обнаружить носителя генотипа AA в группе с ИБС в 6,1 раза больше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,7-21,6 (p=0,013) (рисунок 13).

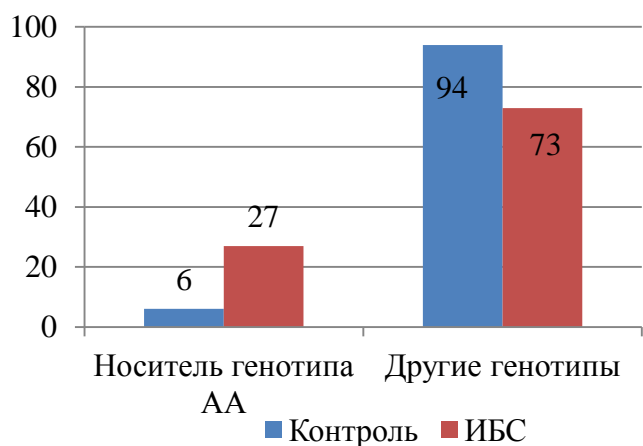


Рис.13 Генотип rs1805017 гена PLA2G7

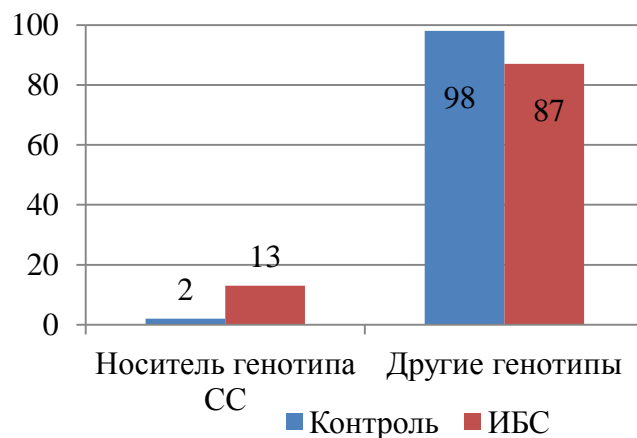


Рис. 14 Генотип rs2638118

Полиморфизм rs2638118 (хромосома 11) достоверно ассоциирован с ИБС у женщин. OR обнаружить носителя генотипа CC в группе с ИБС в 7,6 раза больше, чем в контроле – 95 % ДИ 1,4-43,1 (p=0,05) (рисунок 14).

Полиморфизм rs7493 гена параоксаназы 2 (PON2), находящегося на хромосоме 7, достоверно ассоциирован с ИБС у мужчин. OR обнаружить носителя генотипа GG в группе с ИБС в 2.8 раза выше, чем в контроле - 95% ДИ 1.3-6.5 (p=0,014) (рисунок 15).

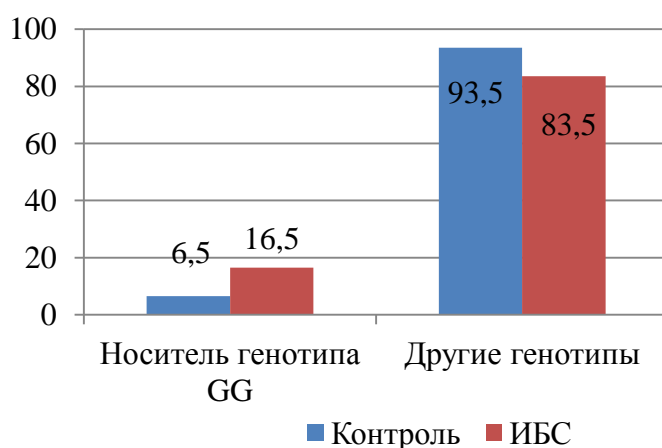


Рис. 15. Генотип rs7493 PON2

ОНП ассоциированные с клиническими фенотипами

Средний уровень глюкозы крови у мужчин с ИБС, работников металлургического производства в Западной Сибири достоверно различается ($p=0.035$, в тесте Крускалла-Уоллиса) у носителей разных генотипов полиморфизма rs5888 гена SCARB1 (таблица 6).

Таблица 6

Средний уровень глюкозы крови у носителей разных генотипов полиморфизма rs5888 гена SCARB1

Генотипы	n	Глюкоза	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
AA	10	4,100	1,1470	,3627	3,280	4,920
AG	42	4,450	1,0526	,1624	4,122	4,778
GG	28	5,057	1,6347	,3089	4,423	5,691

Также значимо отличается средние уровни глюкозы ($p=0,039$) у носителей разных генотипов полиморфизма rs2638118 в тесте Крускалла-Уоллиса в группе мужчин с ИБС (таблица 7).

Таблица 7

Средние уровни глюкозы крови у носителей разных генотипов полиморфизма rs2638118 у мужчин с ИБС

Генотипы	n	Глюкоза	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
AA	49	4,802	1,5757	,2251	4,349	5,255
AC	26	4,150	,4885	,0958	3,953	4,347
CC	4	5,325	1,1615	,5808	3,477	7,173

Ген эндотелина EDN1 находится на хромосоме 6. Белок вырабатывается эндотелием сосудов, является вазоконстриктором. Полиморфизм rs5369, синонимичная замена G на A. Глюкоза крови ($p=0,002$) значимо отличаются у носителей разных генотипов полиморфизма rs5369 гена EDN1 в группе мужчин с ИБС (таблица 8).

Средние уровни глюкозы крови у носителей разных генотипов полиморфизма rs5369 гена EDN1

	Генотипы	n	Среднее	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
Глюкоза	AG	13	3,785	,6336	,1757	3,402	4,167
	GG	67	4,781	1,3655	,1668	4,448	5,114

Полиморфизм rs1520483 находится на хромосоме 3, вблизи этой позиции нет идентифицированных генов. Средний уровень глюкозы крови у мужчин с ИБС, работников МПЗС достоверно различается ($p=0,034$, в тесте Крускалла-Уоллиса) у носителей разных генотипов этого ОНП (таблица 9).

Средний уровень глюкозы крови у носителей разных генотипов полиморфизма rs1520483

Генотипы	n	Глюкоза	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
CC	24	4,796	1,1871	0,2423	4,295	5,297
CT	42	4,721	1,5245	0,2352	4,246	5,197
TT	13	3,931	0,5391	0,1495	3,605	4,257

Средний уровень глюкозы крови у мужчин с ИБС достоверно различается ($p=0,038$, в тесте Крускалла-Уоллиса) у носителей разных генотипов rs17078944 гена LRRC2. Кроме того, у носителей разных генотипов значимо отличается ИМТ ($p=0,05$) (таблица 10).

Средние уровни некоторых показателей у носителей разных генотипов полиморфизма rs17078944 гена LRRC2

	Генотипы	n	Среднее	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
ИМТ	GG	38	25,1816	2,98709	,48457	24,1998	26,1635
	GT	40	25,9975	3,80412	,60148	24,7809	27,2141
	TT	6	29,6435	5,38272	2,19749	23,9947	35,2923
Глюкоза	GG	34	4,397	,7880	,1351	4,122	4,672
	GT	40	4,543	1,1908	,1883	4,162	4,923
	TT	5	6,660	3,1628	1,4144	2,733	10,587

Средний ИМТ у мужчин с ИБС достоверно различается ($p=0,04$, в тесте Крускала-Уоллиса) у носителей разных генотипов rs2734648 гена CCR5 (таблица 11).

Таблица 11

Средний ИМТ у носителей разных генотипов полиморфизма rs2734648 гена CCR5

Генотипы	n	ИМТ	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
GG	35	25,4441	3,11061	,52579	24,3755	26,5126
GT	47	26,4268	4,02394	,58695	25,2453	27,6083
TT	3	21,9110	1,81136	1,04579	17,4114	26,4107

Средний ИМТ у мужчин с ИБС, работников МПЗС достоверно различается ($p=0,024$, в тесте Крускала-Уоллиса) у носителей разных генотипов полиморфизма rs1034384 гена LTF у мужчин с ИБС (таблица 12).

Таблица 12

Средний ИМТ у носителей разных генотипов полиморфизма rs1034384 гена LTF у мужчин с ИБС

Генотипы	n	ИМТ	Станд. отклон.	Ст. ошибка среднего.	95 % ДИ	
AA	67	25,3590	3,46968	,42389	24,5126	26,2053
AG	18	27,7381	4,01068	,94533	25,7436	29,7325

Заключение

Главное достоинство генетических исследований – определение высокого риска ИБС возможно уже в детском возрасте, когда формируются основные вредные привычки, такие как переедание и низкая физическая активность. Раннее исследование генетических маркеров, не изменяющихся в течение жизни, дает неоспоримое преимущество перед другими способами прогнозирования ИБС, при которых критерии ее риска выявляются поздно и теряется время для профилактики заболевания. Необходимо сочетание антропометрических методов (вес, рост, ОТ), молекулярно-генетических исследований с обязательным учетом внешнесредовых факторов, включающих производственные (что особенно важно в промышленных регионах России) для прогнозирования развития ССЗ. Имеются сведения о генетическом риске ИМ у молодых, неблагоприятному течению ИБС

после перенесенного ИМ и коронарного атеросклероза у пожилых, но связь генетической предрасположенности с неблагоприятным влиянием производственных факторов на человека изучена впервые и требует дальнейших исследований.

Кроме того, в Сибири, из-за специфичности внешнесредовых факторов, просто необходимо уточнять вклад генетических факторов в формирование предрасположенности к ИБС. Это поможет определить правомочность имеющегося в настоящее время безоговорочного перенесения на Сибирскую популяцию закономерностей развития патологических процессов, установленных при изучении популяций, проживающих в существенно отличных условиях и разработанных на их основе диагностических и лечебных рекомендаций.

Выводы

1. Сердечно-сосудистые заболевания у мужчин, работников металлургического производства в Западной Сибири, чаще выявляются при воздействии вибрации и неблагоприятного микроклимата, а также при увеличении общего количества вредных производственных факторов.

2. У мужчин, контактирующих с вредными производственными факторами в условиях металлургического производства в Западной Сибири:

- с ишемической болезнью сердца ассоциированы однонуклеотидные полиморфизмы генов: *LTF*, *TNF*, *FYCO1*, *CCR5*, *XCRI*, *SELE*, *PON2*, *HPSE2*;

- инфаркт миокарда реже выявляется у носителей генотипа GG гена IL-6 (-174) по сравнению с носителями других генотипов (отношение шансов = 0,56; $p = 0,044$);

- вероятность выявления инфаркта миокарда у носителей генотипов СТ и ТТ гена MMP9 (-1562) выше у лиц моложе 55 лет (отношение шансов = 2,21; $p = 0,01$), а у носителей генотипа СС гена MMP2 (-1306) у лиц старше 55 лет (отношение шансов = 2,03; $p = 0,02$).

- сердечная недостаточность, как осложнение инфаркта миокарда, ассоциирована с носительством генотипа I/D гена ACE ($p = 0,018$) и генотипов AA и AG полиморфизма гена TNF (-238 A/G) ($p = 0,05$);

3. У женщин, контактирующих с вредными производственными факторами в условиях металлургического производства в Западной Сибири, с ишемической болезнью сердца ассоциированы однонуклеотидные полиморфизмы генов: *SCARB1*, *PLA2G7*, *CCL2* и rs2638118 (11p14.1).

4. У мужчин исследуемой группы с ишемической болезнью сердца показано различие: уровня глюкозы крови у носителей разных генотипов однонуклеотидных полиморфизмов: rs1520483 (3p21.31), rs17078944 (*LRRC2*), rs5888 (*SCARB1*), rs5369 (*EDN1*), rs2638118 (11p14.1), и индекса массы тела у носителей однонуклеотидных полиморфизмов: rs17078944 (*LRRC2*), rs2734648 (*CCR5*), и rs1034384 (*LTF*).

Практические рекомендации

1. При формировании групп повышенного риска среди мужчин, работников МПЗС, с целью проведения первичной профилактики развития ИБС, целесообразно учитывать количество воздействующих на них вредных производственных факторов и особенно вибрации.
2. Учёт данных СА и результатов молекулярно-генетического тестирования, после проведения реплицирующих исследований и выработки обоснованных алгоритмов, может существенно повысить эффективность мероприятий по профилактике ССЗ у работников металлургического производства.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Толкачева О.М., Максимов В.Н., Воевода М.И., Ромащенко А.Г. Анализ полиморфизма матриксной металлопротеиназы 9 у пациентов с атеросклерозом и инфарктом миокарда. // Сб. тез. докл. Рос. конф. «Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний», 25-26 марта 2008г. Новосибирск 2008 года, С. 208-209.
2. Толкачева О.М., Максимов В.Н., Куликов И.В., Завьялова Л.Г., Денисова Д.В., Васильев Г.В., Юдин Н.С., Воевода М.И., Ромащенко А.Г. Гены предрасположенности к ИБС в популяции Сибири // Материалы Всерос. науч-практ. конф. с междунар. участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов», 13-14 апреля 2009г. Новосибирск 2009 года, С. 362-365.
3. Максимов В.Н., Толкачева О.М., Куликов И.В., Завьялова Л.Г., Денисова Д.В., Васильев Г.В., Юдин Н.С., Воевода М.И., Ромащенко А.Г. Гены предрасположенности к ИБС в популяции Сибири // Материалы Всерос. науч-практ. конф. «Перспективы кардиологии России в XXI веке», 8-10 июня 2009г. Москва 2009 года, С. 49-50.
4. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимов 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. 557-566.
5. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Толкачева О.М., Максимов В.Н., Воевода М.И., Ромащенко А.Г. Анализ полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ 2 и 9 у пациентов с ишемической болезнью сердца. // **Терапевтический архив**, 2010, № 1, С. 31-34.
6. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Толкачева О.М., Ромащенко 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.
7. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимов В.Н., Толкачева О.М. Анализ взаимосвязи полиморфизма генов цитокинов и классических факторов риска у пациентов с острым инфарктом миокарда в анамнезе // Сборник материалов Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии», 15-17 сентября 2010г. Новосибирск 2010 года, С.165.