

На правах рукописи

КУРБАТОВА
Ирина Валерьевна

**РОЛЬ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ
CLOCK И *BMAL1* В ИЗМЕНЕНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ РАЗВИТИИ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ИШЕМИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

03.01.04 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2013

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии и лаборатории генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН,

доктор биологических наук, профессор

Немова Нина Николаевна

Официальные оппоненты:

Шпаков Александр Олегович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии.

Мандельштам Михаил Юрьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, заведующий лабораторией биохимической генетики.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук.

Защита состоится «28» ноября 2013 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Автореферат разослан «__» октября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биологические ритмы – фундаментальное свойство организмов, обеспечивающее их способность к адаптации и выживанию в циклически меняющихся условиях внешней среды. Центральное место среди ритмических процессов занимает циркадный ритм, он относится к группе ритмов средних частот и имеет наибольшее значение для организма (Halberg, Reinberg, 1967), поскольку практически все физиологические и биохимические процессы организма подвержены суточным колебаниям (Otto et al., 2004). Циркадные ритмы организма запрограммированы системой циркадных генов, среди которых особое место занимают гены, кодирующие транскрипционные факторы, например *CLOCK* и *BMAL1* (Voinescu, 2009). В настоящее время не подвергается сомнению важная роль системы циркадных генов и кодируемых ими белков в регуляции метаболизма. В экспериментах с модельными объектами показано, что около 10% транскриптома регулируется циркадными генами в печени (Akhtar et al., 2002), примерно столько же в сердце (Storch et al., 2002) и гипоталамусе (Panda et al., 2002). Циркадные гены регулируют гены многих ключевых, скорость-лимитирующих ферментов метаболизма (Oishi et al., 2003). Нарушения молекулярных механизмов регуляции работы циркадных генов могут приводить к дисрегуляции метаболических процессов (Marcheva et al., 2010) и развитию ряда патологий, в том числе кардиоваскулярных расстройств (Takeda, Maemura, 2011). Все чаще циркадные гены рассматриваются как гены-кандидаты, участвующие в этиологии и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (Anea et al., 2009; Curtis et al., 2007; Woon et al., 2007). Однако такого рода сведения малочисленны и касаются в основном экспериментов на модельных объектах. А механизмы, посредством которых варианты циркадных генов могут участвовать в развитии сердечно-сосудистых патологий, практически не изучены.

Степень разработанности темы. Популяционные исследования, касающиеся изучения роли однонуклеотидных замен в генах циркадных ритмов в развитии ССЗ, малочисленны. Так, обнаружена ассоциация мутации в интроне гена *BMAL1* с развитием артериальной гипертензии у жителей Великобритании (Woon et al., 2007). Другими авторами показана ассоциация с развитием гипертензии одной из мутаций гена *NPAS2* в финской популяции (Englund et al., 2009). Нужно отметить, что исследования по оценке риска возникновения ССЗ в зависимости от вариантов генов циркадного ритма в популяциях жителей России не проводились. Известно, что многие гены, вовлеченные в работу сердечно-сосудистой системы, экспрессируются по циркадному типу (Rudic et al., 2005; Saifur et al., 2005; Guney et al., 1999). Уровень транскриптов этих генов регулируется генами циркадных ритмов и зависит от колебаний их экспрессии. На данный момент имеются сведения о молекулярных механизмах

регуляции циркадными генами транскрипционной активности генов-мишеней, вовлеченных в регуляцию гемостаза (Schoenhard et al., 2003), кровяного давления (Doi et al., 2010). Большинство работ по изучению биохимических механизмов связи вариантов циркадных генов с развитием ССЗ касаются отдельных биохимических показателей и выполнены с привлечением модельных объектов (Doi et al., 2010; Somanath et al., 2011; Anea et al., 2009). Комплексное исследование биохимических показателей у человека в зависимости от генотипа по полиморфным маркерам циркадных генов ранее не проводилось.

Цель работы – изучение биологической роли вариантов генов циркадных ритмов в изменении биохимических показателей при развитии эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца (на примере населения Карелии).

Задачи исследования:

1. Проанализировать распределение частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* у людей, страдающих эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ишемической болезнью сердца (ИБС) (острым инфарктом миокарда) (ОИМ), и у людей без клинических проявлений данных заболеваний в зависимости от пола пациентов. Оценить риск развития данных заболеваний у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1*.

2. Провести сравнительное изучение уровней транскриптов генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* в группе людей, страдающих ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2), и у людей без клинических проявлений данного заболевания.

3. Исследовать содержание некоторых гормонов (мелатонина, адренокортикотропного гормона, кортизола, альдостерона, тестостерона), ангиотензин-превращающего фермента, ингибитора активатора плазминогена первого типа в плазме крови, а также уровень экспрессии гена *PAI-1* у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* в группе людей, страдающих ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2), и у людей без клинических проявлений данного заболевания.

4. Провести сравнительный анализ липидного состава плазмы крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* в группах людей с диагнозами ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ИБС (ОИМ) и у людей без клинических проявлений данных заболеваний.

Научная новизна. Впервые исследовано распределение частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* в российской популяции (у жителей республики Карелия). Впервые проведена оценка риска

развития ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ИБС (ОИМ) у носителей определенных вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*. Впервые выявлена связь между полиморфными маркерами 3111TC, 862TC и 257TG гена *CLOCK* и развитием ЭАГ и ИБС (ОИМ).

Впервые получены данные о динамике уровней транскриптов циркадных генов *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1* и гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия людей с диагнозом ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и доноров контрольной группы в зависимости от генотипа по четырем полиморфным маркерам гена *CLOCK* и одному полиморфному маркеру гена *BMAL1*. Впервые показаны достоверные различия уровней экспрессии основных генов циркадных ритмов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам 3111TC и 257TG регуляторных областей гена *CLOCK*. Впервые показано, что уровни транскриптов гена *PAI-1* у больных ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и доноров без клинических проявлений ЭАГ и ИБС различаются в зависимости от генотипа по полиморфному маркеру 3111TC гена *CLOCK*.

Впервые проведено исследование комплекса биохимических показателей плазмы крови носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1*, страдающих ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2), и людей без клинических проявлений данного заболевания. Проведено сравнительное изучение концентрации некоторых гормонов (мелатонина, адренорикортикотропного гормона (АКТГ), кортизола, альдостерона, тестостерона), ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), ингибитора активатора плазминогена первого типа (РАI-1) в плазме крови. Выявлены достоверные различия уровней гормонов (мелатонина, АКТГ, тестостерона) и содержания РАI-1 в плазме крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам регуляторных областей гена *CLOCK*, ассоциированным с риском развития ЭАГ и ИБС. Впервые показаны различия в содержании определенных фракций липидов в плазме крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена *CLOCK* с диагнозами ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ИБС (ОИМ).

Теоретическая и практическая значимость работы. Значение результатов диссертационной работы для фундаментальной биологии и медицины заключается в получении новых сведений о роли вариантов циркадных генов в механизмах регуляции метаболизма человека и в развитии ССЗ. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшего изучения системы циркадных генов и их продуктов в молекулярно-генетическом и физиолого-биохимическом аспектах. Варианты гена *CLOCK*, для которых показана связь с риском развития ЭАГ и ИБС, могут быть использованы в качестве дополнительного критерия для оценки предрасположенности к ССЗ у жителей республики Карелия. Проведенный анализ комплекса биохимических показателей плазмы крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов

CLOCK и *BMAL1* будет полезен для корректировки медикаментозного лечения и профилактики осложнений ССЗ. Материалы диссертации могут быть использованы в лекционных курсах по клинической биохимии, молекулярной биологии и генетике для студентов биологических и медицинских факультетов вузов, для написания учебных пособий, монографической литературы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиморфные маркеры 3111TC, 862TC и 257TG гена транскрипционного фактора *CLOCK* ассоциированы с риском развития ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ИБС (ОИМ) у жителей Республики Карелия.

2. Наличие однонуклеотидных замен в регуляторных областях гена *CLOCK* может приводить к изменению уровней транскриптов как самих циркадных генов (*CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*), так и генов-мишеней (*PAI-1*).

3. Варианты регуляторных областей гена *CLOCK*, ассоциированные с риском развития ЭАГ и ИБС, могут влиять на уровень гормонов (мелатонина, АКТГ, тестостерона), содержание регулятора фибринолитического каскада PAI-1 и липидный состав плазмы крови.

Достоверность результатов. Результаты получены современными биохимическими и молекулярно-генетическими методами. Основные выводы работы и выносимые на защиту положения являются обоснованными и полностью соответствуют полученным результатам. Достоверность выводов подтверждается корректной статистической обработкой данных.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены и обсуждены на российских и международных научных мероприятиях: Всероссийский научно-образовательный форум «Профилактическая кардиология 2010» (Москва, 2010); VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика - 2010» (Москва, 2010); 11-ая Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, образование, промышленность» (Санкт-Петербург, 2011); IV Всероссийская конференция с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2011); IX молодежная научно-практическая конференция «Интеллектуальный потенциал XXI века: степени познания» (Новосибирск, 2012); I и II Международная интернет-конференция «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы» (Казань, 2012, 2013); Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы лабораторной диагностики и биотехнологии» (Кемерово, 2012); IV Всероссийская научная конференция с международным участием «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения» (Апатиты, 2012); II Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (результаты отмечены дипломом III степени за устный доклад) (Санкт-Петербург, 2012); Международный форум

по проблемам науки, техники и образования «III тысячелетие – новый мир» (Москва, 2012). Работа прошла апробацию на объединенном семинаре лаборатории генетики, лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН и лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета ПетрГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК. Исследования проводились при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.», № г.р. 01201056445, ГК № 02.740.11.0700; программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»; Гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РАН» НШ-3731.2010.4; Гранта Правительства РФ по постановлению №220 (вед. ученый А.Н. Полторак); Гранта Российского фонда фундаментальных исследований 12-04-31368 мол. а.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в работу включал разработку идей, последовательное планирование и постановку комплексных экспериментов, обработку и анализ полученных данных, участие в написании статей.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 198 страницах машинописного текста, содержит 34 таблицы, 56 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов. Список литературы включает 361 источник, в том числе 326 работ зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы изложены современные представления о циркадных ритмах и их роли в организме. Рассмотрены физиологические и биохимические механизмы регуляции, а также молекулярно-генетические механизмы генерации циркадных ритмов. Приведены известные факты, свидетельствующие о роли циркадных генов в развитии патологических состояний организма, в том числе об ассоциации полиморфных маркеров циркадных генов с заболеваниями. Рассмотрены биохимические механизмы взаимосвязи циркадных генов и патологических процессов. Обобщены данные литературы о связи физиологических функций органов сердечно-сосудистой системы с циркадными ритмами, а также о биохимических механизмах влияния циркадных генов на развитие сердечно-сосудистых патологий. Обозначены нерешенные вопросы и перспективы исследования роли циркадных генов в развитии ССЗ.

Материал и методы исследования. Для исследований использовали образцы венозной крови и клеток буккального эпителия ротовой полости пациентов с диагнозами: эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) (I-II стадии, степень АГ 1-2); ишемическая болезнь сердца (ИБС), конкретно – острый инфаркт миокарда (ОИМ); а также доноров контрольной группы (без клинических проявлений данных заболеваний). Взятие проб для молекулярно-генетического и биохимического анализа проводили в осенний период, в сен-

тябре. Пациенты и доноры контрольной группы проходили обследование на базе ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска с 2009 по 2013 год. Диагнозы установлены врачами ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска в соответствии и с учетом клинических рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов. Доноры являлись жителями Республики Карелия. На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Минздравсоцразвития РК и ПетрГУ.

Критерии включения, общие для доноров изучаемых групп: возраст от 35 до 60 лет, информированное согласие, русская национальность (по результатам анкетирования), промежуточный хронотип (согласно опроснику Horne, Ostberg, 1976). Кроме указанных, критерии включения для больных ЭАГ: впервые установленный диагноз ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2), для больных ИБС (ОИМ): впервые установленный диагноз ОИМ; критерии включения в контрольную группу: отсутствие клинических проявлений и установленных диагнозов ЭАГ и ИБС. Критерии исключения, общие для доноров всех изучаемых групп: беременность и лактация, алкогольная зависимость, курение, сахарный диабет, индекс массы тела ≥ 30 кг/м², работа в ночную смену и по скользящему графику. Кроме указанных, критерии исключения для больных ЭАГ: наличие установленного диагноза ИБС; для больных ОИМ – наличие установленного диагноза АГ. Дополнительные критерии исключения из биохимического анализа: для пациентов с ЭАГ – гипотензивная терапия, для пациентов с ИБС – терапия статинами. Критерии исключения из контрольной группы объединяли критерии, установленные для больных ЭАГ и ОИМ.

Генотипирование. Для изучения были выбраны полиморфные маркеры: 257TG (промоторная область гена), 862TC (экзон 9), 2121GA (экзон 20), 3111TC (3'-нетранслируемая область (3'-НТО)) гена *CLOCK* и 56445TC (интрон) гена *BMAL1*. Использованы 435 образцов крови доноров контрольной группы (179 мужчин и 256 женщин; возраст (здесь и далее в виде $M \pm m$) $47,3 \pm 0,6$ лет), 434 образца крови больных ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) (220 мужчин и 214 женщин; возраст $48,2 \pm 0,5$ лет) и 299 образцов крови больных ИБС (ОИМ) (166 мужчин и 133 женщин; возраст $50,1 \pm 0,5$ года). ДНК выделяли из 200 мкл венозной крови с помощью набора для выделения геномной ДНК AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit («Axygen», США). Генотипирование проводилось методом ПЦР-ПДРФ. Ранее описаны праймеры для проведения ПЦР и условия рестрикции для генотипирования по маркерам гена *CLOCK*: 3111TC (Desan et al., 2000), 257TG (Pedrazzoli et al., 2007) и 2121GA (Scott et al., 2008). Конструирование праймеров для амплификации участка гена *CLOCK*, содержащего маркер 862TC, и участка гена *BMAL1*, содержащего маркер 56445TC, а также подбор эндонуклеаз рестрикции, проводились с помощью программы Primer Premier 5.

Определение уровня транскриптов генов. Использованы образцы клеток буккального эпителия доноров: 32 образца людей контрольной группы (16 мужчин, 16 женщин; возраст $46,2 \pm 1,5$ лет) и 30 образцов пациентов с ЭАГ (15 мужчин, 15 женщин; возраст $47,7 \pm 1,7$ лет). Оценивали относительный уровень экспрессии (уровень транскриптов) циркадных генов (*CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*) и гена *PAI-1* в 9, 13 и 17 часов, методом ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Bio-Rad», США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Уровень транскриптов изучаемых генов был рассчитан относительно уровня транскриптов референсного гена – *GAPDH*. Относительный уровень экспрессии исследуемого гена (Ratio) вычисляли по формуле (1) (Livak, Schmittgen, 2001):

$$\text{Ratio (test/ref)} = 2^{-\Delta C_t}, \text{ где } \Delta C_t = C_t(\text{test}) - C_t(\text{ref}), \quad (1)$$

где $C_t(\text{test})$ – пороговый цикл для исследуемого гена; $C_t(\text{ref})$ – пороговый цикл для референсного гена.

Имуноферментный анализ. Использованы 29 - 52 образца венозной крови людей контрольной группы (возраст $46,8 \pm 1,4$ лет) и 39 - 63 образца – пациентов с ЭАГ ($47,6 \pm 1,6$ лет), с равным количеством мужчин и женщин в группах. Забор крови производился натощак в 8 ч утра. Концентрацию в плазме крови мелатонина («IBL International GmbH», Германия), кортизола («Вектор-Бест-Балтика», Россия), альдостерона («DRG TechSystems», США), тестостерона («ХЕМА», Россия) определяли методом твердофазного конкурентного ИФА; АКТГ («Biomerica», США), АПФ («R&G Systems», США), PAI-1 («Technoclone GmbH», Австрия) – методом твердофазного неконкурентного ИФА, на анализаторе АИФ-Ц-01С (ООО «Системы анализа», Россия).

Определение липидного состава плазмы крови. Использованы 124 образца крови больных ЭАГ (61 мужчины, 63 женщин; возраст $47,3 \pm 0,9$ лет), 102 – больных ИБС (51 мужчины, 51 женщины; возраст $48,0 \pm 1,1$ лет), 130 – доноров контрольной группы (64 мужчин, 66 женщин; возраст $47,3 \pm 1,0$ лет). Забор крови производился натощак в 8 часов утра. Концентрацию в плазме крови общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) определяли в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе «COBAS INTEGRA 400 PLUS» («Roshe Diagnostics GmbH», ФРГ-Австрия-США), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) – расчетным методом по Friedewald et al., 1972.

Статистическая обработка данных. Использовались общепринятые методы вариационной статистики с применением пакетов программ MS Excel и StatGraphics. Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия χ^2 (Коросов, Горбач, 2007). Для оценки риска заболевания рассчитывали показатель соотношения шансов Odds Ratio (OR) и доверительный интервал (Флетчер и др., 1998). Достоверность различий изу-

чаемых биохимических показателей между группами оценивали с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни. Степень влияния исследуемых факторов оценивали при помощи многофакторного дисперсионного анализа MANOVA (в качестве факторов рассматривались генотипы по изучаемым полиморфным маркерам, изучаемые биохимические показатели, пол). Взаимосвязь исследуемых показателей оценивали при помощи регрессионного и корреляционного анализа по Спирмену (Коросов, Горбач, 2007).

Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднее арифметическое (M) \pm стандартная ошибка среднего (m).

Результаты исследований и их обсуждение

1. Ассоциация полиморфных маркеров генов *CLOCK* и *BMAL1* с риском развития ЭАГ и ИБС

Результаты исследований показывают достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфному маркеру 3111ТС гена *CLOCK* в группах больных ЭАГ, ИБС и контрольной группе (Таблица 1). У пациентов с ЭАГ и ИБС, по сравнению с контролем, повышена встречаемость аллеля С и генотипа ТС, ниже частота генотипа ТТ. Встречаемость генотипа СС в группах больных ЭАГ и ИБС значительно выше, чем в контрольной группе. Среди мужчин, страдающих ЭАГ и ИБС, достоверно больше носителей генотипа СС (21 и 23% соответственно), чем среди мужчин контрольной группы (8%). У женщин также частота генотипа СС оказалась ниже в контрольной группе (9%), чем в группах больных ЭАГ (14%) и ИБС (15%).

Таблица 1 – Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфному маркеру 3111ТС гена *CLOCK* в группах пациентов с ЭАГ и ИБС, и в контрольной группе.

| | | Контрольная группа, n=435 | Группа больных ЭАГ, n=434 | Группа больных ИБС, n=299 |
|-------------------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Аллели | Т | 0.69 | 0.58 | 0.54 |
| | С | 0.31 | 0.42 | 0.46 |
| Критерий χ^2 | | | 11.34 (df=1, p<0.05) | 17.08 (df=1, p<0.05) |
| Генотипы | ТТ | 0.48 | 0.33 | 0.27 |
| | ТС | 0.43 | 0.49 | 0.54 |
| | СС | 0.09 | 0.18 | 0.19 |
| Критерий χ^2 | | | 26.81 (df=2, p<0.05) | 37.88 (df=2, p<0.05) |

Примечание – критерий χ^2 показывает достоверность отличий распределения от распределения в контрольной группе.

Обнаружено, что в группах пациентов с диагнозами ЭАГ и ИБС повышена встречаемость генотипа СС по полиморфному маркеру 862ТС гена *CLOCK* (39% и 38% соответственно), по сравнению с контролем (19%). Распределения частот аллелей в исследуемых группах практически не различаются.

Изучено распределение частот аллелей и генотипов по маркеру 257TG в 5'-

НТО (промоторе) гена *CLOCK*. В контрольной группе преобладает аллель Т (63%), в то время как в группах больных ЭАГ и ИБС встречаемость обоих аллелей примерно одинаковая. Частота генотипа GG намного выше в группах ЭАГ (36%) и ИБС (36%), по сравнению с контролем (18%).

Не обнаружено достоверных различий распределений частот аллелей и генотипов по маркерам 2121GA гена *CLOCK* и 56445TC гена *BMAL1* в группах больных ЭАГ и ИБС по сравнению с контролем. У женщин с ЭАГ наблюдается более высокая частота генотипа AA (30%) по маркеру 2121GA по сравнению с контролем (23%); по маркеру 56445TC у женщин с ЭАГ и ИБС частота генотипа CC выше (25% и 31% соответственно), чем в контроле (22%).

Генотипы, для которых отмечена более высокая встречаемость в группах больных ЭАГ и ИБС по сравнению с контролем, были включены в анализ ассоциации с риском развития данных заболеваний. Рассчитывали соотношение шансов OR с 95%-м доверительным интервалом (95%CI). Достоверное повышение риска развития ЭАГ и ИБС выявлено у носителей генотипа CC по маркеру 3111TC, генотипа CC по маркеру 862TC и генотипа GG по маркеру 257TG гена *CLOCK* (Таблица 2). Статистически значимая ассоциация маркера 3111TC с риском развития ЭАГ и ИБС обнаружена у мужчин (OR=3.06 (1.63;5.74) и OR=3.44 (1.79;6.58)), но не у женщин (OR=1.65 (0.92;2.93) и OR=1.78 (0.94;3.38)). Для других маркеров показана ассоциация определенных генотипов с риском развития ЭАГ и ИБС как для мужчин, так и для женщин.

Таблица 2 – Риск развития ЭАГ и ИБС у носителей определенных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1*.

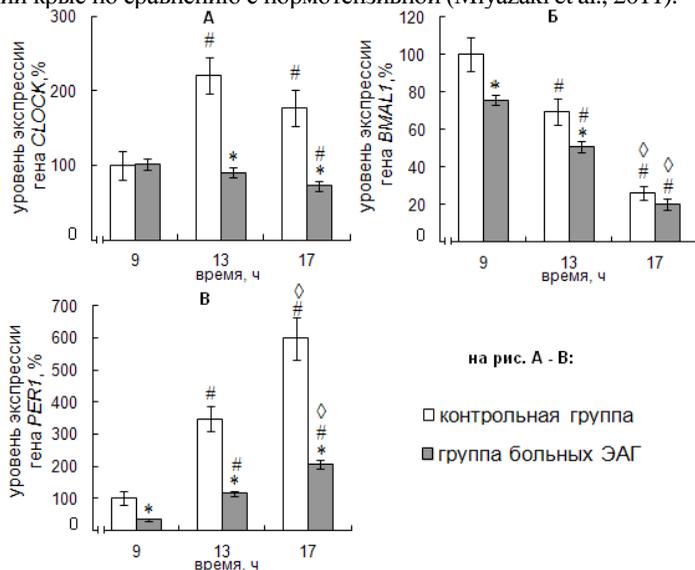
| Полиморфный маркер | Генотип | OR (95%CI) | |
|---------------------------|---------|------------------|------------------|
| | | ЭАГ | ИБС |
| 3111TC гена <i>CLOCK</i> | CC | 2.22 (1.47;3.34) | 2.37 (1.53;3.67) |
| 862TC гена <i>CLOCK</i> | CC | 2.73 (2.00;3.72) | 2.61 (1.86;3.66) |
| 257TG гена <i>CLOCK</i> | GG | 2.56 (1.86;3.53) | 2.56 (1.81;3.62) |
| 2121GA гена <i>CLOCK</i> | AA | 1.23 (0.90;1.66) | 1.05 (0.75;1.49) |
| 56445TC гена <i>BMAL1</i> | CC | 1.06 (0.77;1.47) | 1.25 (0.88;1.77) |

Т.о., установлена ассоциация маркеров 3111TC, 257TG (регуляторных областей) и 862TC (экзона 9) гена *CLOCK* с развитием ЭАГ и ИБС (ОИМ). Следует отметить, что мутация 862TC приводит к замене изолейцина на валин в 169 положении аминокислотной последовательности белка, в PAS-домене).

2. Уровень транскриптов генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия доноров контрольной группы и пациентов с диагнозом ЭАГ в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Обнаружено снижение уровней транскриптов циркадных генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в буккальном эпителии у больных ЭАГ по сравнению с контролем в некоторых временных точках наблюдения. Так, экспрессия гена

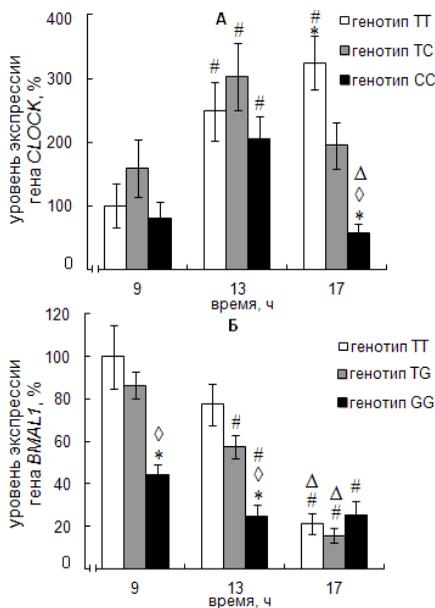
CLOCK достоверно ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контролем, в 13 и 17 часов (Рисунок 1А). Уровень транскриптов гена *BMAL1* достоверно ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контрольной группой, в 9 и 13 часов; экспрессия гена *PER1* ниже у больных ЭАГ, по сравнению с контролем, во всех временных точках (Рисунки 1Б, 1В). Есть данные, что уровни транскриптов некоторых циркадных генов различаются в контрольных группах и группах объектов, имеющих различные патологии, в том числе ССЗ (Gomez-Abellan et al., 2012; Stamenkovic et al., 2012; Young et al., 2001). Нарушения транскрипционной активности циркадных генов наблюдаются в гипертрофированном миокарде крыс (Young et al., 2001), в скелетных мышцах и печени у гипертензивной линии крыс по сравнению с нормотензивной (Miyazaki et al., 2011).



Условные обозначения: достоверные отличия: * – по сравнению с контрольной группой в той же временной точке, # – по сравнению с уровнем экспрессии в 9 ч. у доноров одной группы, ◇ – по сравнению с уровнем экспрессии в 13 ч. у доноров одной группы. За 100% принят уровень экспрессии в 9 ч. у доноров контрольной группы.

Рисунок 1 – Динамика уровней экспрессии генов *CLOCK* (А), *BMAL1* (Б) и *PER1* (В) в буккальном эпителии пациентов, страдающих ЭАГ, и доноров контрольной группы.

Уровень экспрессии гена *CLOCK* у больных ЭАГ практически не изменяется в период с 9 до 17 часов. Выявлена общая тенденция снижения уровня экспрессии гена *BMAL1* и повышение экспрессии гена *PER1* с 9 до 17 часов как в контрольной группе, так и в группе больных ЭАГ. Выявленный характер динамики экспрессии циркадных генов в буккальных клетках согласуется с данными других исследователей о суточном ритме данных генов в периферических тканях (Von Schantz, 2008; Bjarnason et al., 2001), в т. ч. тканях сердечно-сосудистой системы (Reilly et al., 2007; Rudic et al., 2005; Young et al., 2001),



Условные обозначения: достоверные отличия: * – по сравнению с гетерозиготами в той же временной точке, \diamond – по сравнению с носителями ТТ генотипа в той же временной точке, # – по сравнению с уровнем экспрессии в 9 ч. у носителей одного генотипа, Δ – по сравнению с уровнем экспрессии в 13 ч. у носителей одного генотипа. За 100% принят уровень экспрессии в 9 ч. у носителей ТТ генотипа.

Рисунок 2 – Динамика уровня экспрессии генов *CLOCK* (А) и *BMAL1* (Б) в клетках буккального эпителия носителей разных генотипов по маркерам 3111ТС (А) и 257ТГ (Б) гена *CLOCK* в контрольной группе.

экспрессии генов *CLOCK* и *BMAL1* у носителей разных генотипов по маркеру 862ТС гена *CLOCK* в контроле. Носители генотипа СС отличаются более низким уровнем транскриптов гена *CLOCK* в 13 часов (по сравнению с носителями генотипов ТТ и ТС) и в 17 часов (по сравнению с носителями ТТ генотипа), и более низким уровнем транскриптов гена *BMAL1* в 9 и 13 часов (по сравнению с носителями ТТ генотипа). Предполагаем, что снижение экспрессии основных циркадных генов у больных ЭАГ по сравнению с контролем, а также у носителей генотипов, ассоциированных с риском развития ЭАГ и ИБС, может приводить к нарушению регуляции системы циркадных генов, что, в свою очередь, способно повлиять на экспрессию генов-мишеней.

согласно которым экспрессия гена *CLOCK* не является ритмичной, экспрессия генов *BMAL1* и *PER1* ритмична и ритмы экспрессии этих генов находятся в противофазе.

Уровни экспрессии изучаемых генов различаются у носителей разных генотипов по некоторым маркерам гена *CLOCK*, наиболее значимые различия показаны по маркерам 3111ТС и 257ТГ. В контроле у носителей генотипа СС по маркеру 3111ТС отмечается достоверно более низкий уровень транскриптов гена *CLOCK* в 17 часов, по сравнению с носителями других генотипов (Рисунок 2А). Аналогичные данные получены для гена *BMAL1* – в 9 и 13 часов, гена *PER1* – в 13 и 17 часов. Пациенты с ЭАГ, носители генотипа СС, имеют достоверно более низкий уровень экспрессии генов *CLOCK* и *PER1* во всех временных точках. Что касается маркера 257ТГ, в контроле у носителей ГГ генотипа отмечается более низкий уровень транскриптов *BMAL1* – в 9 и 13 часов (Рисунок 2Б), *PER1* – в 13 и 17 часов (по сравнению с носителями других генотипов) и *CLOCK* – в 17 часов (по сравнению с гомозиготами по аллелю Т). Больные ЭАГ с данным генотипом имеют более низкий уровень экспрессии изучаемых генов во всех временных точках. Выявлены различия уровней

3. Содержание мелатонина в плазме крови больных ЭАГ и доноров контрольной группы в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Уровень мелатонина в крови больных ЭАГ ($4,10 \pm 0,19$ пг/мл) ниже по сравнению с контролем ($6,95 \pm 0,23$ пг/мл). Результаты согласуются с данными других авторов по снижению продукции мелатонина при сердечно-сосудистых расстройствах (Dominguez-Rodriguez et al., 2002; Kawashima et al., 1984). Содержание мелатонина в крови различается у носителей разных генотипов по маркеру 3111TC гена *CLOCK*: носители генотипа СС, в контрольной группе и группе больных ЭАГ, имеют наименьшее содержание гормона в плазме крови ($5,45 \pm 0,33$ и $3,07 \pm 0,22$ пг/мл соответственно), по сравнению с носителями генотипов ТС ($6,86 \pm 0,23$ и $4,78 \pm 0,20$ пг/мл) и ТТ ($7,86 \pm 0,36$ и $4,49 \pm 0,36$ пг/мл). У женщин с ЭАГ обнаружены различия содержания гормона по маркеру 862ТС гена *CLOCK*: у носителей генотипа СС уровень мелатонина ($3,17 \pm 0,06$ пг/мл) ниже, чем у носителей генотипов ТТ ($4,52 \pm 0,36$ пг/мл) и ТС ($4,40 \pm 0,41$ пг/мл).

По данным дисперсионного анализа, дисперсия концентрации мелатонина в плазме крови больных ЭАГ на 29,02% определялась фактором «генотип по полиморфному маркеру 3111TC гена *CLOCK*» ($F=20,19$; $p<0,0001$), у доноров контрольной группы также показано влияние генотипа по данному маркеру на уровень мелатонина (степень влияния 13,21%; $F=8,53$; $p<0,001$). Влияние вариантов циркадных генов на уровень мелатонина может быть опосредовано изменением уровня экспрессии циркадных генов в гипоталамусе, что приводит к изменению продукции мелатонина эпифизом (Korf, Stehle, 2002).

4. Содержание адренокортикотропного гормона в плазме крови больных ЭАГ и доноров контрольной группы в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Концентрация АКТГ в плазме крови больных ЭАГ ($36,46 \pm 2,39$ пг/мл) выше, чем у доноров контрольной группы ($24,94 \pm 1,55$ пг/мл). Значения в пределах нормы. Выявлены достоверные различия уровней АКТГ в крови больных ЭАГ с разными генотипами по маркерам 3111TC и 257TG гена *CLOCK* (Таблица 3).
Таблица 3 – Содержание АКТГ в плазме крови носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* в группах здоровых и больных ЭАГ людей.

| Полиморфный маркер | Генотип | Концентрация АКТГ, пг/мл | |
|--------------------------|---------|--------------------------|------------------------------|
| | | Контрольная группа | Группа людей, страдающих ЭАГ |
| 3111TC гена <i>CLOCK</i> | ТТ | 24.13±2.15 | 30.53±4.34 |
| | ТС | 23.34±2.85 | 31.82±3.27 |
| | СС | 28.52±3.40 | 47.63±2.56 ^{а*} |
| 862ТС гена <i>CLOCK</i> | ТТ | 29.07±2.62 | 32.70±2.46 |
| | ТС | 24.07±2.25 | 36.28±3.27 |
| | СС | 22.36±3.10 | 39.19±3.43 |
| 2121GA гена <i>CLOCK</i> | АА | 21.14±2.50 | 36.67±4.66 |
| | GA | 22.67±2.88 | 32.51±3.47 |
| | GG | 21.74±2.28 | 38.43±3.92 |

Продолжение таблицы 3.

| Полиморфный маркер | Генотип | Концентрация АКТГ, пг/мл | |
|---------------------------|---------|--------------------------|------------------------------|
| | | Контрольная группа | Группа людей, страдающих ЭАГ |
| 257TG гена <i>CLOCK</i> | ТТ | 24.40±2.36 | 32.07±4.07 |
| | TG | 23.92±2.55 | 35.48±3.06 |
| | GG | 29.58±3.05 | 50.25±4.51 ^{△*} |
| 56445TC гена <i>BMAL1</i> | ТТ | 23.84±3.51 | 40.44±4.48 |
| | TC | 24.36±2.08 | 33.46±3.77 |
| | CC | 27.95±2.72 | 38.46±4.05 |

Примечание – достоверные отличия: * – по сравнению с гетерозиготами в той же группе; △ – по сравнению с носителями генотипа ТТ в той же группе.

У носителей генотипов СС по маркеру 3111ТС и GG по маркеру 257TG содержание АКТГ в крови выше, чем у носителей альтернативных генотипов. Дисперсия концентрации АКТГ в крови больных ЭАГ на 12,11% определялась уровнем мелатонина ($F=10,15$; $p<0,001$) и на 8,02% – генотипом по маркеру

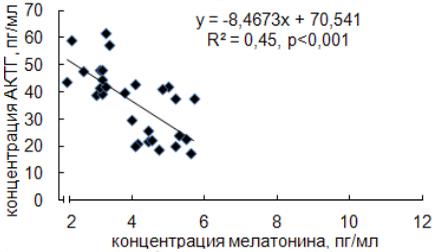
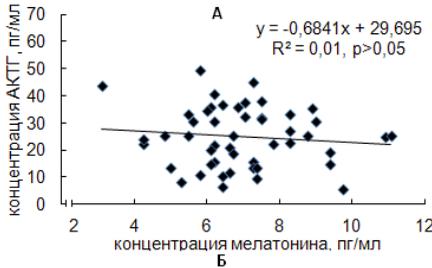


Рисунок 3 – Соотношение концентраций АКТГ и мелатонина в плазме крови доноров контрольной группы (А) и доноров с диагнозом ЭАГ (Б).

АКТГ вследствие десинхронизации ритмов стероидогенеза (Nader et al., 2010) или изменений чувствительности тканей к глюкокортикоидам (Kino, 2012).

5. Содержание кортизола в плазме крови больных ЭАГ и доноров контрольной группы в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Уровень кортизола в плазме крови больных ЭАГ ($268,18 \pm 21,12$ нмоль/л) достоверно ниже, чем у доноров контрольной группы ($336,89 \pm 19,87$ нмоль/л).

3111ТС гена *CLOCK* ($F=9,95$; $p<0,05$). У здоровых доноров концентрации АКТГ и мелатонина не зависят друг от друга (Рисунок 3А), у больных ЭАГ выявлена линейная зависимость концентрации АКТГ от концентрации мелатонина (Рисунок 3Б). Вероятно, снижение уровня мелатонина у носителей СС генотипа по маркеру 3111ТС с диагнозом ЭАГ может обуславливать повышение уровня АКТГ, что объясняется ингибирующим действием мелатонина на секрецию АКТГ гипофизом (Juszczak, Michalska, 2006). Различия уровней АКТГ в зависимости от генотипа по маркеру 257TG могут быть объяснены механизмом, опосредованным не мелатонином, а дисрегуляцией циркадной периодичности процессов в системе органов гипоталамус-гипофиз-надпочечники, что вызывает изменение продукции

В контрольной группе достоверные различия содержания кортизола выявлены у женщин с разными генотипами по маркеру 3111ТС гена *CLOCK*. У гомозигот по аллелю С уровень кортизола достоверно выше ($408,66 \pm 50,01$ нмоль/л), чем у носителей генотипов ТТ ($236,44 \pm 69,42$ нмоль/л) и ТС ($297,35 \pm 38,76$ нмоль/л). В группе больных ЭАГ женщины с генотипом ТТ по маркеру 862ТС гена *CLOCK* имеют более низкое содержание кортизола ($285,67 \pm 40,92$ нмоль/л) по сравнению с носителями генотипов ТС ($369,29 \pm 31,19$ нмоль/л) и СС ($388,96 \pm 40,32$ нмоль/л). Различия уровней кортизола у носителей разных генотипов могут быть обусловлены влиянием циркадных генов как на уровень секреции АКТГ и кортизола, так и непосредственно на ферменты стероидогенеза (Nader et al., 2010; Valenzuela et al., 2008). По данным дисперсионного анализа, достоверного влияния генотипов по изучаемым маркерам на уровень кортизола ни в одной из групп не выявлено, в то время как дисперсия концентрации кортизола в крови больных ЭАГ на 16,23% определялась уровнем мелатонина ($F=7,66$; $p<0,05$). Продукцию кортизола, вызванную стимулирующим действием АКТГ, может подавлять мелатонин, связываясь с МТ1 рецептором надпочечников (Camrino et al., 2008), что может объяснять тот факт, что повышенный уровень кортизола выявлен у носителей генотипов, для которых показан пониженный уровень мелатонина. Это пред-

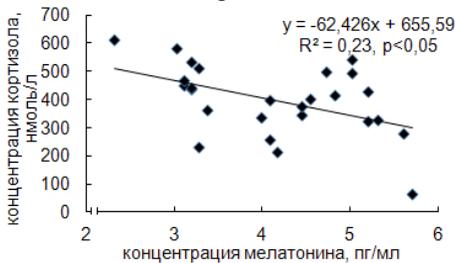


Рисунок 4 – Соотношение концентраций кортизола и мелатонина в плазме крови доноров с диагнозом ЭАГ.

положение подтверждают данные регрессионного анализа о зависимости концентрации кортизола от уровня мелатонина у больных ЭАГ (Рисунок 4). Отсутствие различий уровней кортизола у мужчин с разными генотипами по маркеру 862ТС можно объяснить переключением синтеза глюкокортикоидов на синтез андрогенов (Делягин и др., 2010).

6. Содержание альдостерона в плазме крови больных ЭАГ и доноров контрольной группы в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Концентрация альдостерона в плазме крови пациентов с ЭАГ ($226,21 \pm 17,68$ пг/мл) выше, чем у доноров контрольной группы ($114,15 \pm 16,82$ пг/мл). Достоверные различия содержания гормона в плазме крови выявлены у женщин с ЭАГ, имеющих разные генотипы по маркеру 862ТС гена *CLOCK*. Носители генотипов ТС ($214,78 \pm 25,34$ пг/мл) и СС ($220,73 \pm 43,88$ пг/мл) имеют более высокий уровень альдостерона в плазме крови, чем гомозиготы по аллелю Т ($118,74 \pm 32,05$ пг/мл). Влияния генотипа по изучаемым маркерам на содержание альдостерона в крови у здоровых и больных ЭАГ людей не выявлено.

7. Содержание АПФ в плазме крови больных ЭАГ и доноров контрольной группы в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

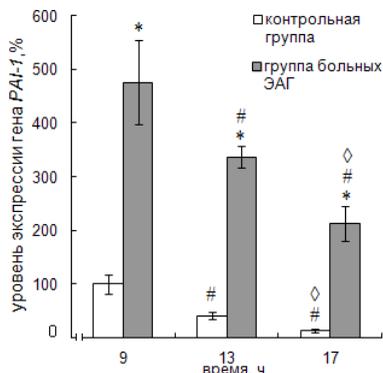
Содержание АПФ в плазме крови больных ЭАГ ($8464,78 \pm 50,22$ пг/мл) выше, чем у доноров контрольной группы ($8092,81 \pm 135,36$ пг/мл). В контрольной группе у гомозигот по аллелю Т маркера 3111ТС гена *CLOCK* уровень АПФ достоверно ниже ($7782,74 \pm 141,67$ пг/мл), чем у носителей генотипов ТС ($8228,84 \pm 245,99$ пг/мл) и СС ($8575,92 \pm 196,54$ пг/мл). Достоверного влияния генотипа на содержание АПФ в крови у здоровых и больных ЭАГ не выявлено ни по одному из полиморфных маркеров. Десинхронизация циркадного ритма приводит как к изменениям профилей экспрессии некоторых циркадных генов, так и к изменениям экспрессии гена, кодирующего АПФ (Martino et al., 2007). На основании этого можно предположить, что изменение содержания АПФ опосредуется изменениями уровней экспрессии циркадных генов.

8. Содержание тестостерона в плазме крови мужчин в группе больных ЭАГ и в контрольной группе в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Уровень тестостерона в плазме крови мужчин с ЭАГ ниже ($12,46 \pm 0,94$ нмоль/л), чем в контрольной группе ($17,82 \pm 0,91$ нмоль/л). Достоверные различия уровней тестостерона обнаружены у мужчин с разными генотипами по маркеру 257TG гена *CLOCK*. В контроле и группе больных ЭАГ мужчины с генотипом GG имеют более низкий уровень тестостерона ($10,95 \pm 1,55$ и $5,17 \pm 1,38$ нмоль/л соответственно), по сравнению с носителями генотипов ТС ($18,94 \pm 1,23$ и $12,39 \pm 0,97$ нмоль/л) и ТТ ($19,78 \pm 1,19$ и $19,87 \pm 1,08$ нмоль/л). У больных ЭАГ с генотипом GG отмечается уровень тестостерона, соответствующий андроген-дефицитному состоянию (Шарвадзе и др., 2010), которое на современном этапе принято считать фактором риска сердечно-сосудистых осложнений (Kaplan et al., 2006). Дисперсия концентрации тестостерона определялась генотипом по маркеру 257TG: у мужчин с ЭАГ на 34,28% ($F=92,07$; $p < 0,0001$), у мужчин контрольной группы на 22,12% ($F=6,09$; $p=0,007$). На основании данных о роли гена *BMAL1* и кодируемого им фактора транскрипции в регуляции синтеза тестостерона (Alvarez et al., 2008), можно предположить, что более низкий уровень тестостерона у носителей генотипа GG по маркеру 257TG может быть связан с пониженным уровнем экспрессии гена *BMAL1*.

9. Содержание ингибитора активатора плазминогена первого типа в плазме крови и уровень транскриптов гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия доноров контрольной группы и пациентов с диагнозом ЭАГ в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

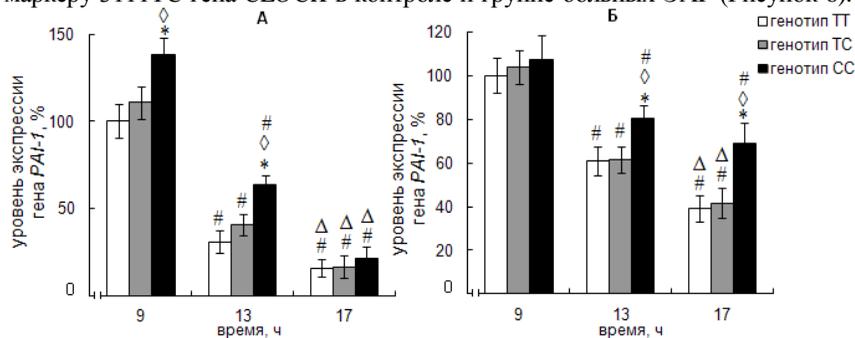
Концентрация PAI-1 в плазме крови людей с ЭАГ достоверно выше ($65,03 \pm 3,49$ нг/мл), чем у доноров контрольной группы ($37,62 \pm 5,80$ нг/мл). Относительный уровень экспрессии гена *PAI-1* выше у больных ЭАГ по срав-



Условные обозначения: достоверные отличия: * – по сравнению с контрольной группой в той же временной точке, # – по сравнению с уровнем экспрессии в 9 ч. у доноров одной группы, ◇ – по сравнению с уровнем экспрессии в 13 ч. у доноров одной группы. За 100% принят уровень экспрессии в 9 ч. у доноров контрольной группы.

Рисунок 5 – Динамика уровня экспрессии гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия пациентов с ЭАГ и доноров контрольной группы.

Уровней транскриптов гена *PAI-1* у носителей разных генотипов выявлены по маркеру 3111TC гена *CLOCK* в контроле и группе больных ЭАГ (Рисунок 6).



Условные обозначения: достоверные отличия: * – по сравнению с гетерозиготами в той же временной точке, ◇ – по сравнению с носителями ТТ генотипа в той же временной точке, # – по сравнению с уровнем экспрессии в 9 ч. у носителей одного генотипа, Δ – по сравнению с уровнем экспрессии в 13 ч. у носителей одного генотипа. За 100% принят уровень экспрессии в 9 ч. у носителей ТТ генотипа.

Рисунок 6 – Динамика уровня экспрессии гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия носителей разных генотипов по полиморфному маркеру 3111TC гена *CLOCK* в контрольной группе (А) и группе доноров с диагнозом ЭАГ (Б).

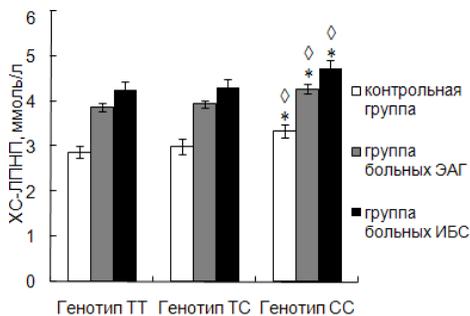
нению с контролем во всех временных точках (Рисунок 5). Максимальный уровень транскриптов *PAI-1* зарегистрирован в 9 часов, минимальный – в 17 часов. Данные согласуются с представлением о циркадной периодичности экспрессии *PAI-1* (Maemura et al., 2000). Достоверные различия содержания *PAI-1* в крови обнаружены у носителей разных генотипов по маркеру 3111TC гена *CLOCK*. Носители СС генотипа в контроле и группе больных ЭАГ отличаются достоверно более высоким уровнем *PAI-1* в крови ($45,13 \pm 1,71$ и $86,68 \pm 7,81$ нг/мл соответственно), по сравнению с носителями ТС ($37,56 \pm 2,82$ и $62,59 \pm 4,06$ нг/мл) и ТТ ($33,24 \pm 2,56$ и $50,72 \pm 3,07$ нг/мл) генотипов. Влияние генотипа по данному маркеру на содержание *PAI-1* достоверно в контроле (степень влияния 8,14%; $F=5,18$; $p<0,05$) и в группе больных ЭАГ (степень влияния 19,12%; $F=17,82$; $p<0,001$). Различия

У людей с генотипом *CC* зарегистрирован более высокий уровень экспрессии *PAI-1*, по сравнению с носителями других генотипов, в контроле – в 9 и 13 часов, в группе больных ЭАГ – в 13 и 17 часов. У больных ЭАГ с генотипами *TT* и *TC* прослеживается тенденция снижения экспрессии гена *PAI-1*, в период с 9 до 17 часов, в то время как у людей с генотипом *CC* различий между уровнями экспрессии *PAI-1* в 13 и 17 часов нет. В контроле уровни экспрессии генов *BMAL1* и *PAI-1* отрицательно коррелируют в 9 ($r_s = -0,48$, $p < 0,05$) и 13 часов ($r_s = -0,61$, $p < 0,001$). В литературе имеются сведения, подтверждающие роль гена *BMAL1* в регуляции уровня *PAI-1* в крови (Somanath et al., 2011).

Повышение уровня экспрессии гена *PAI-1* у больных ЭАГ с генотипом *CC* по маркеру 3111TC можно объяснить десинхронизацией механизмов генерации циркадных ритмов системой циркадных генов (Oishi, Ohkura, 2013) вследствие снижения экспрессии генов как позитивных факторов транскрипции (*CLOCK*), так и факторов отрицательной обратной связи (*PER1*). Вероятно существование и других механизмов. Один из них предполагает регуляцию продукции *PAI-1* компонентами ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (Devaraj et al., 2003). Так, повышение уровня *PAI-1* у носителей *CC* генотипа в контрольной группе может быть связано с повышенным уровнем АПФ (Vaughan, 1997). Выявлена положительная корреляция между уровнями *PAI-1* и АПФ в контроле ($r_s = 0,48$; $p < 0,05$). С другой стороны, снижение уровня мелатонина у больных ЭАГ с генотипом *CC* может быть дополнительным фактором повреждения сосудов (Cuzzocrea, Reiter, 2001), при этом возможна стимуляция провоспалительными цитокинами синтеза *PAI-1* в эндотелии (Долгов, Свириной, 2005). Выявлена отрицательная корреляция между уровнями мелатонина и *PAI-1* в крови больных ЭАГ ($r_s = -0,62$; $p < 0,05$).

10. Липидный состав плазмы крови больных ЭАГ и ИБС и доноров контрольной группы в зависимости от вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1*

Показано, что у доноров контрольной группы, а также у больных ЭАГ и ИБС, с генотипом *CC* по маркеру 3111TC гена *CLOCK*, зарегистрирован достоверно более высокий уровень ХС-ЛПНП в плазме крови, по сравнению с носителями генотипов *TC* и *TT* (Рисунок 7). У женщин с ЭАГ и ИБС, имеющих генотип *TT* по маркеру 862TC, уровень ХС-ЛПВП достоверно выше ($1,49 \pm 0,08$ и $1,28 \pm 0,06$ ммоль/л соответственно), по сравнению с носителями *TC* ($1,38 \pm 0,05$ и $1,12 \pm 0,07$ ммоль/л) и *CC* ($1,20 \pm 0,04$ и $0,95 \pm 0,07$ ммоль/л) генотипов. По данным дисперсионного анализа, дисперсия концентрации ХС-ЛПНП в плазме крови доноров контрольной группы определялась генотипом по маркеру 3111TC гена *CLOCK* на 11,51% ($F = 8,26$; $p = 0,031$) и фактором «пол» на 9,76% ($F = 6,45$; $p = 0,035$). В общую дисперсию уровня ХС-ЛПНП в крови пациентов с ЭАГ вносили вклад такие факторы, как «пол» (степень влияния 10,23%; $F = 7,42$; $p = 0,038$), «генотип по полиморфному маркеру



Условные обозначения: достоверные отличия: * – по сравнению с гетерозиготами в той же группе, ◊ – по сравнению с носителями генотипа ТТ в той же группе. Рисунок 7 – Концентрация ХС-ЛПВП в плазме крови доноров контрольной группы и доноров с ЭАГ и ИБС, в зависимости от генотипа по полиморфному маркеру 3111ТС гена *CLOCK*.

ЭАГ ($r_s = -0,42$; $p < 0,05$). Установлена положительная корреляция между уровнями мелатонина и ХС-ЛПВП в крови больных ЭАГ женщин ($r_s = 0,22$; $p < 0,05$). Кроме того, мутации в циркадных генах могут влиять на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма липидов плазмы крови (Oishi et al., 2003).

Обнаружены достоверные различия содержания ХС-ЛПВП у мужчин – носителей разных генотипов по маркеру 257ТГ гена *CLOCK*. Мужчины с генотипом GG в контроле и в группах больных ЭАГ и ИБС имеют более низкий уровень ХС-ЛПВП ($1,19 \pm 0,05$; $0,96 \pm 0,04$ и $0,84 \pm 0,05$ ммоль/л соответственно), по сравнению с носителями генотипов TG ($1,31 \pm 0,06$; $1,13 \pm 0,05$ и $0,99 \pm 0,06$ ммоль/л) и TT ($1,40 \pm 0,06$; $1,28 \pm 0,06$ и $1,12 \pm 0,05$ ммоль/л). Дисперсия концентрации ХС-ЛПВП в плазме крови доноров контрольной группы на 10,15% ($F = 11,51$; $p = 0,026$) определялась фактором «пол», в то время как влияние других изучаемых факторов оказалось не достоверным. В группе больных ЭАГ в общую дисперсию концентрации ХС-ЛПВП в плазме крови, кроме фактора «пол» (степень влияния 15,13%; $F = 10,41$; $p = 0,026$), вносил вклад фактор «генотип по полиморфному маркеру 257ТГ гена *CLOCK*» (степень влияния 19,53%; $F = 18,31$; $p = 0,018$). Выявлена положительная корреляция между уровнями циркулирующего тестостерона и ХС-ЛПВП в плазме крови мужчин с диагнозом ЭАГ ($r_s = 0,41$; $p < 0,05$). У мужчин с генотипом GG по маркеру 257ТГ регистрируются значения концентраций тестостерона в крови, соответствующие андроген-дефицитному состоянию. Можно предположить, что понижение уровня ХС-ЛПВП в плазме крови у мужчин с ЭАГ и ИБС, имеющих данный генотип, может быть связано со снижением уровня тестостерона (Simon et al., 1997; Phillips et al., 1994).

3111ТС гена *CLOCK*» (степень влияния 9,13%; $F = 8,11$; $p = 0,034$) и «уровень мелатонина» (степень влияния 7,12%; $F = 6,15$; $p = 0,040$). Предположительно, обнаруженные различия уровней липидов у носителей разных генотипов по маркерам 3111ТС и 862ТС могут быть связаны с различиями содержания мелатонина в крови (Koziróg et al., 2011; Hussain, 2007; Bhattacharyya et al., 2006; Sewerynek, 2002). Выявлена отрицательная корреляция между уровнями мелатонина и ХС-ЛПВП в плазме крови больных

ВЫВОДЫ

1. Установлена связь полиморфных маркеров гена транскрипционного фактора *CLOCK* 3111ТС, 257ТГ и 862ТС с риском развития ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ИБС (ОИМ) у жителей Республики Карелия. Повышение риска развития ЭАГ и ИБС характерно для мужчин, имеющих генотип СС по маркерам 3111ТС, 862ТС и генотип GG по маркеру 257ТГ гена *CLOCK*; и для женщин, имеющих генотип СС по маркеру 862ТС и генотип GG по маркеру 257ТГ гена *CLOCK*.

2. В контрольной группе и группе больных ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) у носителей генотипов СС по маркеру 3111ТС и GG по маркеру 257ТГ гена *CLOCK* в буккальном эпителии отмечаются достоверно более низкие уровни транскриптов генов *CLOCK* и *PER1*. У доноров контрольной группы с данными генотипами уровень экспрессии гена *BMAL1* ниже, чем у носителей других генотипов. У больных ЭАГ уровень транскриптов этого гена снижен у носителей GG генотипа по маркеру 257ТГ. В контрольной группе у доноров, имеющих СС генотип по маркеру 862ТС гена *CLOCK*, показаны достоверно более низкие уровни транскриптов генов *CLOCK* и *BMAL1*.

3. Обнаружены различия в содержании гормонов в плазме крови доноров контрольной группы и группы больных ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) в зависимости от генотипа по полиморфным маркерам гена *CLOCK*. Содержание мелатонина в плазме крови ниже у носителей генотипа СС по маркеру 3111ТС, а также у женщин с ЭАГ, имеющих генотип СС по маркеру 862ТС. Концентрация АКТГ в плазме крови повышена у больных ЭАГ, имеющих генотип СС по маркеру 3111ТС и генотип GG по маркеру 257ТГ. Для мужчин, имеющих генотип GG по маркеру 257ТГ, характерен более низкий уровень тестостерона.

4. У носителей генотипа СС по полиморфному маркеру 3111ТС гена *CLOCK* в контрольной группе и группе пациентов с ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) содержание PAI-1 в плазме крови и уровень транскриптов гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия достоверно выше, чем у носителей других генотипов.

5. Существуют значимые различия в содержании липидов в плазме крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена *CLOCK*. Доноры контрольной группы и пациенты с диагнозами ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ИБС (ОИМ), имеющие генотип СС по маркеру 3111ТС, отличаются более высоким содержанием ХС-ЛПНП, по сравнению с носителями других генотипов. Женщины, носители генотипа СС по маркеру 862ТС с диагнозами ЭАГ и ИБС, имеют более низкое содержание ХС-ЛПВП в плазме крови, по сравнению с носителями других генотипов. Мужчины с генотипом GG по маркеру 257ТГ имеют более низкий уровень ХС-ЛПВП, по сравнению с носи-

телями других генотипов, как в контрольной группе, так и в группах больных ЭАГ и ИБС.

Заключение.

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые установлена ассоциация полиморфных маркеров 3111ТС, 862ТС и 257ТG гена *CLOCK* с развитием ЭАГ и ИБС (ОИМ). Показано, что наличие однонуклеотидных замен в гене *CLOCK* может приводить к изменению уровней транскриптов как самих циркадных генов (*CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*), так и генов-мишеней (*PAI-1*). Полученные данные также позволяют сделать предположение о том, что мутации в циркадных генах могут вносить вклад в развитие сердечно-сосудистых заболеваний посредством влияния на биохимические показатели, такие как: уровень гормонов (мелатонина, АКТГ, тестостерона), уровень регулятора фибринолитического каскада PAI-1 и липидный состав плазмы крови.

Работы, опубликованные по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. Коломейчук, С.Н. Связь полиморфного маркера 3111ТС 3'-нетранслируемой области гена *CLOCK* с риском развития эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей республики Карелия / С.Н. Коломейчук, **И.В. Макеева (Курбатова)**, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // Генетика. — 2011. — Т. 47, № 10. — С. 1411–1415.
2. **Макеева (Курбатова), И.В.** Связь полиморфных маркеров 3111ТС и 843ТС гена *CLOCK* с риском развития эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей республики Карелия / **И.В. Макеева (Курбатова)**, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. Серия Экспериментальная биология. — 2011. — № 3. — С. 88–96.
3. **Курбатова, И.В.** Экспрессия генов циркадных ритмов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия человека в зависимости от полиморфных вариантов гена *CLOCK* / **И.В. Курбатова**, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // Доклады академии наук. — 2012. — Т. 446, №6. — С. 703–706.
4. **Курбатова, И.В.** Экспрессия генов циркадного ритма *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у больных эссенциальной артериальной гипертензией / **И.В. Курбатова**, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, С.Н. Коломейчук, Н.Н. Немова // Медицинская генетика. — 2013. — №4. — С. 27–31.

Публикации в других изданиях:

1. Коломейчук, С.Н. Влияние полиморфизма Т3111С 3'-нетранслируемой области гена *CLOCK* на риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у населения республики Карелия / С.Н. Коломейчук, **И.В. Макеева (Курбатова)**, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // Медицинский академический журнал. — 2010. — Т. 10, № 5. — С. 122–123.
2. Корнева, В.А. Метаболические нарушения у работающих в ночную смену / В.А. Корнева, С.Н. Коломейчук, Н.Л. Рендаков, **И.В. Макеева (Курбатова)**, Н.Н. Алях-

- нович // Материалы Всероссийского научно-образовательного форума «Профилактическая кардиология 2010». — Москва. — 2010. — С. 69–70.
3. Коломейчук, С.Н. Влияние полиморфизма T3111C 3'-нетранслируемой области гена *CLOCK* на риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у населения республики Карелия / С.Н. Коломейчук, **И.В. Макеева (Курбатова)**, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2010». — Москва. — 2010. — Т. 3. — С. 67–69.
 4. **Макеева (Курбатова), И.В.** Связь полиморфных маркеров 3111TC и 843TC гена *CLOCK* с риском развития эссенциальной артериальной гипертензии у жителей республики Карелия / **И.В. Макеева (Курбатова)**, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева // Сборник статей 11-ой Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, образование, промышленность». — Санкт-Петербург. — 2011. — Т. 1. — С. 298–299.
 5. **Макеева (Курбатова), И.В.** Влияние полиморфного маркера 3111TC гена *CLOCK* на содержание гормонов кортизола и альдостерона у жителей Карелии, страдающих эссенциальной артериальной гипертензией / **И.В. Макеева (Курбатова)**, Э.В. Гуров, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева // Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека». — Ульяновск. — 2011. — С. 152–153.
 6. **Курбатова, И.В.** Связь полиморфных маркеров 3111TC и 862TC гена *CLOCK* с риском развития эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у мужчин республики Карелия / **И.В. Курбатова**, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева // Биомика. — 2011. — Т. 1, № 2. — С. 65–67.
 7. Немова, Н.Н. Роль генетических факторов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у жителей Республики Карелия / Н.Н. Немова, Л.В. Топчиева, С.Н. Коломейчук, И.Е. Малышева, **И.В. Курбатова**, Э.В. Гуров, Н.Л. Рендаков // Фундаментальные науки – медицине: тезисы докладов на конференциях и семинарах по научным направлениям Программы в 2011 году. — Москва. — 2011. — С. 88–90.
 8. **Курбатова, И.В.** Содержание гормонов кортизола и альдостерона в плазме крови здоровых и больных эссенциальной артериальной гипертензией людей в зависимости от полиморфных вариантов гена *CLOCK* / **И.В. Курбатова**, Л.В. Топчиева, С.Н. Коломейчук, Н.Н. Немова // Сборник материалов IX молодежной научно-практической конференции «Интеллектуальный потенциал XXI века: ступени познания»: в 2-х частях. Часть 1. — Новосибирск. — 2012. — С. 20–23.
 9. **Курбатова, И.В.** Роль полиморфного маркера 3111TC гена *CLOCK* в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у жителей республики Карелия / **И.В. Курбатова**, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева, Н.Н. Немова // Сборник трудов I международной Интернет-конференции «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы». — Казань. — 2012. — С. 134–137.
 10. **Курбатова, И.В.** Полиморфные маркеры гена транскрипционного фактора *CLOCK* и риск возникновения эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей Республики Карелия / **И.В. Курбатова**, Л.В. Топчиева, С.Н. Коломейчук, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы лабораторной диагностики и биотехнологии». — Кемерово. — 2012. — С. 51–52.

11. **Курбатова, И.В.** Содержание ангиотензинпревращающего фермента в плазме крови здоровых и больных эссенциальной артериальной гипертензией людей в зависимости от полиморфных вариантов гена *CLOCK* / **И.В. Курбатова**, С.Н. Коломейчук, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // *Материалы IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения»*. Часть 2. — Апатиты. — 2012. — С. 64–67.
12. **Курбатова, И.В.** Риск возникновения эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца и некоторые биохимические показатели крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена *CLOCK* (жителей республики Карелия) / **И.В. Курбатова**, Л.В. Топчиева, С.Н. Коломейчук, В.А. Корнева, К.С. Зименкова, Н.Н. Немова // *Медицинский академический журнал*. — 2012. — Т. 12, № 4. — С. 29–31.
13. **Курбатова, И.В.** Роль полиморфных вариантов циркадного гена *CLOCK* в механизмах развития эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей Республики Карелия / **И.В. Курбатова**, Л.В. Топчиева, С.Н. Коломейчук, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // *Сборник трудов Международного форума по проблемам науки, техники и образования «III тысячелетие – новый мир»*. — Москва. — 2012. — С. 117–119.
14. Немова, Н.Н. Роль полиморфных вариантов генов циркадных ритмов и цитокинов в механизмах развития болезней, характеризующихся повышенным кровяным давлением и оценка риска их развития у жителей Республики Карелия / Н.Н. Немова, Л.В. Топчиева, **И.В. Курбатова**, С.Н. Коломейчук, И.Е. Малышева, В.А. Корнева // *Фундаментальные науки – медицине: тезисы докладов на конференциях и семинарах по научным направлениям Программы в 2012 году*. — Москва. — 2012. — С. 116–117.
15. **Курбатова, И.В.** Содержание PAI-1 в плазме крови и уровень транскриптов гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия доноров контрольной группы и пациентов с диагнозом ЭАГ в зависимости от полиморфных вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1* / **И.В. Курбатова**, Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, Н.Н. Немова // *Сборник трудов II международной Интернет-конференции «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы»*. — Казань. — 2013. — Т. 2. — С. 9–16.

Список использованных сокращений

АКТГ – адренокортикотропный гормон, АПФ – ангиотензинпревращающий фермент, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИФА – иммуноферментный анализ, НТО – нетранслируемая область, ОИМ – острый инфаркт миокарда, ОХС – общий холестерин, ПДРФ – полиморфизм длин рестриционных фрагментов, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания, ТГ – триглицериды, ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, ЭАГ – эссенциальная артериальная гипертензия, CI – доверительный интервал (от англ. Confidence Interval), OR – соотношение шансов (от англ. Odds Ratio), PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена первого типа (от англ. plasminogen activator inhibitor-1).