

РОЛЯТА НА ГЕНОМНИТЕ АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ ЗА ИЗЯСНЯВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ОСНОВИ НА ИСХЕМИЧНАТА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО

Р. ЦВЕОВА^{1,2}, А. МИТКОВА^{1,2}, Р. КЪНЕВА^{1,2}, Г. НАЧЕВ⁴ И В. МИТЕВ^{1,2}

¹Център по молекулярна медицина, Медицински университет – София

²Катедра “Медицинска химия и биохимия”, Медицински университет – София

³Клиника по кардиология, УМБАЛ “Александровска” – София

⁴Университетска многопрофилна болница за активно лечение “Св. Екатерина” – София

THE ROLE OF GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES FOR UNDERSTANDING THE GENETIC BASIS OF CORONARY ARTERY DISEASE

R. TZVEOVA^{1,2}, A. MITKOVA^{1,2}, R. KANEVA^{1,2}, G. NACHEV⁴ AND V. MITEV^{1,2}

¹Molecular Medicine Center, Medical University – Sofia

²Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical University – Sofia

³Clinic of Cardiology, UMHAT “Aleksandrovska” – Sofia

⁴University National Specialized Hospital for Active Treatment of Cardiovascular Diseases “Sv. Ekaterina” – Sofia

Резюме: Проведените през последните пет години асоциативни проучвания на целия геном потвърдиха ролята на генетиката в предразположението към развитие на исхемична болест на сърцето (ИБС). Както заболяемостта, така и смъртността, причинени от сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ), представляват сериозна тежест за общественото здраве в световен мащаб. ИБС е най-честата причина за смърт в индустриализираните страни, като разпространението ѝ бързо се увеличава в развиващите се страни. ИБС има комплексна и хетерогенна етиология, включваща многобройни фактори от околната среда, както и генетични фактори, повишаващи значително риска от развитие на заболяването. По-доброто разбиране на многофакторната сложна основа на това социално значимо заболяване би подпомогнала неговата профилактика и лечение. Широкомащабни проучвания на целия геном при пациенти със сърдечно-съдови усложнения и здрави контроли доведе до огромен тласък в идентифицирането на чувствителни за това заболяване локуси и гени.

Ключови думи: исхемична болест на сърцето, асоциативни проучвания на целия геном, генетични фактори

Summary: In the recent 5 years, genome-wide association studies (GWASs) have confirmed that genetics plays an important role in predisposition to coronary artery diseases (CAD). Cardiovascular disease (CVD) morbidity and mortality pose a major public health burden worldwide. CAD is the most common cause of death in industrialized countries, and its prevalence is rapidly increasing in developing countries. CAD has a complex and heterogeneous etiology involving numerous environmental and genetic factors that increase the risk of developing the disease. Increasing our understanding of the multifactorial, complex underpinnings of CAD promises to have a global impact on the promotion of health. GWASs have led to an enormous boost in the identification of susceptibility loci and genes for cardiovascular diseases.

Key words: coronary artery disease, GWASs, genetic factors

Исхемичната болест на сърцето (ИБС) е най-честата причина за смърт в индустриалните страни, включително и у нас [8]. Рисковите фактори за развитие на това заболява-

не са: повишено съдържание на холестерол в кръвта, артериална хипертония, тютюнопушене, наднормено тегло, обездвижване, захарен диабет. Не на последно място съ-

ществена роля оказват и наследствените (генетични) фактори.

България е сред страните в Европа с най-висока смъртност от атеросклеротични увреждания на съдовете, кръвоснабдяващи сърцето. Епидемиологичните наблюдения показват, че при мъжете в България се установява най-високо нарастване на сърдечно-съдовата смъртност в световен мащаб [1]. Най-добрият начин за избягване последиците на атеросклерозата е нейната профилактика [48].

Геномните асоциативни проучвания (GWASs) представляват съвременен подход, позволяващ сканиране на целия геном за стотици хиляди еднонуклеотидни замени [46]. Посредством този метод е възможно генотипизирането на хиляди несвързани лица с ИБС и здрави контроли [39]. Геномните асоциативни проучвания се основават на хипотезата “чести заболявания, чести генетични варианти” която предполага, че генетичните влияния върху честите болести се дължат на голям брой алелни варианти, които се наблюдават при значителен процент от индивидите в популацията. Счита се, че предразположението към ИБС се дължи на комбинирания ефект от полиморфизми и мутации в гени с ниска пенетрантност [39].

Към този момент резултатите от многобройните GWASs потвърждават факта, че генетичната предразположеност към атеросклероза на коронарните артерии на сърцето е комплексна и включва множество хромозомни локуси в различни части на генома. Най-значими са находките за свързаност във и около гени, но има и такива в генетично бедни региони на генома. Това навежда на мисълта, че причините за появата на това заболяване са по-скоро свързани с регулацията на гените, отколкото с кодиращата им функция [20].

Първите резултати от GWASs, свързани с ИБС, показват най-добри резултати за регион, намиращ се върху хромозома 9, locus 9p21, който е лишен от белтък-кодиращи гени. В съседство на този регион са разположени тумор-супресорните гени CDKN2A и CDKN2B [55]. Откритите на по-късен етап в този locus полиморфни варианти показват силна, статистически значима асоциация с ИБС при репликативни проучвания на групи

болни и здрави контроли за различни популационни групи [12, 16, 35, 47, 56].

PHACTR1

През 2011 г. с цел откриване на чувствителни на ИБС генетични локуси от The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium са привлечени 8424 пациенти от европейски произход с този тип заболяване от големите проучвания Precocious Coronary Artery Disease (PROCARDIS) и Heart Protection Study (HPS), както и 6996 пациенти от азиатски произход (главно от Пакистан и Индия) от проучванията Pakistan Risk of Myocardial Infarction Study (PROMIS) и London Life Sciences Prospective Population (LOLIPOP). Като цяло, 81% от случаите, включени в проучването, са имали предварително прекаран инфаркт на миокарда (ИМ), а останалата част са с потвърдена диагноза за симптоматична стенокардия или коронарна реваскуларизация на артериите със средна възраст на първото събитие под 60 години. Всички лица са генотипизирани посредством цялостен геномен скрининг с Illumina BeadChips. Изследване от такъв мащаб позволи анализ на варианти с много ниски честоти (1-5%), които обикновено се изключват от GWAS, поради размера на изследваната популационна група или поради необходимостта да се комбинират данни от различни платформи за определяне на генотипите. След първоначалния анализ на резултатите са подбрани 59 SNPs от 50 различни локуса, които показват потенциална асоциация с ИБС. Впоследствие тези SNPs са тествани в десет репликационни проучвания, включващи общо 21 408 случая с ИБС и 19 185 здрави контроли. Пет SNPs в новите асоциирани локуси постигат предварително определен праг за репликация ($P < 8,5 \times 10^{-4}$) В допълнение към петте новооткрити локуса полиморфен вариант, разположен в интронната област на гена PHACTR1, показва значителна връзка с ИБС ($P = 9.9 \times 10^{-10}$) както при първоначалното откритие, така и при репликацията ($P = 8.7 \times 10^{-26}$) [17].

Отново през 2011 г. изследователската група на Schunkert провежда метаанализ на 14 GWAS проучвания за ИБС, състоящи се общо от 22 233 случая и 64 762 контро-

ли от европейски произход, последвано от определяне на генотипа на основните топ сигнали за асоциация при 60 738 допълнителни лица. Този геномен анализ позволява идентифицирането на 13 нови локуса, които са свързани с ИБС с $P < 5 \times 10^{-8}$, и потвърждава асоциацията на 10 от 12 по-рано докладвани локуси. Тези нови локуси показват честоти на рисковия алел, вариращи от 0.13 до 0.91 и са свързани с 6 до 17% увеличение на риска от ИБС при носителството на рисков алел. Важно е да се отбележи, че само три от новите локуси показват значима връзка с традиционните рискови фактори за ИБС. В по-голямата си част генните региони са замесен в патогенезата на коронарната атеросклероза. Един от локусите във въпросното проучване, който дава силна асоциативна връзка с ИБС, е локализиран в гена PNACTR1, хромозомен регион 6p24.1, което е в съответствие с откритието на The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium от 2011 г. [59]. Подобни проучвания са проведени и за други популационни групи, като напр. афроамериканци, при които също е установен въпросният локус като чувствителен за ИБС при високо ниво на статистическа значимост [7].

Генът PNACTR1 кодира Регулатор 1 на фосфатазата и актина. Протеинът е идентифициран за първи път от Allen и сътр. през 2004 г. [43]. Този белтък съдържа няколко RPEL мотива. Доказано е, че PNACTR1 контролира дейността на протеин-фосфатаза 1 (PP1) – многофункционален ензим с различни роли в нервната система, включително регулиране на синаптичната дейност и дендритната морфология. PNACTR1 се свързва също с цитоплазмения актин и участва в контрола на ремоделирането на F-актина. PNACTR1 се експресира избирателно в мозъка, където високи нива от протеина могат да бъдат открити в кората, хипокампуса и стриатума, както и в синапсите [43].

През 2011 г. Jarraу и сътр. докладват, че PNACTR1 се експресира в ендотелните клетки. Експресията зависи от VEGF-165. Потискането на експресията на PNACTR1 в ендотелните клетки на вена от човешка пъпна връв води до значително увреждане и отклонения при формирането на микротубулите [31]. През 2012 г. Allain и сътр. докладват,

че изчерпването на Neuropilin-1 и VEGFR1 (но не и на NRP2 или VEGFR2) инхибира експресията на PNACTR1 и PNACTR1 в ендотелните клетки. При стимулиране на VEGFA-165, PNACTR1 участва във формирането и поддържането на клетъчните микротубули чрез neuropilin-1 и VEGFR1. Изчерпването на PNACTR1 понижава активността на PP1, а това от своя страна довежда до нарушение във фината настройка на актиновата полимеризация и динамика, което предполага, че PNACTR1 е ключов компонент в регулацията на ангиогенезата [3].

ABO

Колективът на Reilly и съавт. провежда две GWAS проучвания с добре охарактеризирани и диагностицирани ангиографски пациенти с коронарно заболяване от европейски произход. За да установят локусите, предразполагащи към ИБС, те сравняват група лица, които имат това заболяване (N = 12 393), със здрави контроли (N = 7 383). При сравнение на пациенти с ИБС, които са прекарвали МИ, с такива с ИБС, но без МИ, авторите откриват нов локус ABO ($p = 7.62 \times 10^{-9}$), асоцииран с МИ. Причината за асоциацията вероятно е дефицит на ензима глюкотрансфераза. В етап 1 на проведеното проучване 49 SNPs показват $P < 5 \times 10^{-6}$ за миокарден инфаркт при пациенти с ангиографски доказана ИБС. Всички 11 най-силни сигнала на асоциация се локализируют в един и същи хромозомен регион 9q34.2 в рамките на гена ABO, кодиращ кръвноруповите антигени. Кръвни групи А, В и АВ показват по-висока честота на миокарден инфаркт при пациенти с ангиографски доказана ИБС, в сравнение с тези, които имат кръвна група О [52].

През 2011 г. изследователската група на Schunkert провеждат метаанализ на 14 GWAS проучвания, свързани с ИБС, състоящи се от 22 233 случая и 64 762 контроли от европейски произход, последвано от определяне на генотипа на основните топ сигнали за асоциация в 60 738 допълнителни лица. Един от локусите във въпросното проучване, даващ силна асоциативна връзка с коронарната атеросклероза, е локализиран в гена ABO, хромозомен регион 9q34.2, което е в съответствие с откритието на Muredach и съавт. от 2011 г. [59].

През 2012 г. общо 2099 пациенти с остър коронарен синдром (ОКС), включени в общия регистър за остри коронарни инциденти (the GRACE Genetics Study), Великобритания, са проследени проспективно за период от 5 години (1668 дни). В резултат на проведеното проучване е установено, че носителите на С-алел на въпросния вариант, намиращ се upstream от гена ABO и корелиращ с кръвна група А, показват по-висок риск от развитие на МИ [(OR) 2.25, CI = 1.37-3.71; P = 0.001], както и повишен риск от повторен сърдечно-съдов инцидент или внезапна сърдечна смърт [(OR) 1.80, CI = 1.09-2.95; P = 0.021] в рамките на 5 години след индексирание за ОКС. Получената асоциация впоследствие е репликирана при 1250 бр. полски пациенти при 6-месечно проследяване [(OR) 2.70, CI = 1.26-5.82, p = 0.011 за повторен МИ]. На базата на получените резултати би могло да се твърди, че базови замени в локус ABO представляват независим рисков фактор за нежелани сърдечно-съдови инциденти след ОКС [70].

При провеждане на метаанализ на наличните в литературата данни Wu и съавт. докладват 1.79 пъти по-висок риск от сърдечно заболяване за носителите на кръвни групи А, В и АВ, в сравнение с носителите на кръвна група 0 [71].

Посредством GWAS е идентифициран ABO локус и за липопротеините с ниска плътност (LDL-C) [13], диабет тип 2 [62], възпалителния биомаркер Е-селектин, Р-селектин и ICAM1 [6, 44, 45], както и за ангиотензин-конвертиращия ензим [62]. Асоциацията на локуса ABO с плазмените нива на холестерол са били описани преди няколко десетилетия. Взети заедно, тези фактори показват, че ABO може да модулира различни отделни пътеки, свързани със сърдечно-съдови рискови фактори, атеросклероза и тромбоза [52].

Генът ABO кодира ензима 1,3-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза, свързана с ABO кръвногруповата система. Този ензим катализира прехвърлянето на въглехидрати, върху антиген Н, образувайки антигенната структура на ABO кръвните групи [4]. Белтъците, кодирани от алелите А и В на гена ABO, се различават в незначителна степен в своята

аминокиселинна последователност, но те катализират прехвърляне на различни въглехидрати (N-ацетилгалактозамин или галактоза) върху антиген Н, за да формират съответно антигени А или В. Кръвна група 0 при човека се дължи на премахване на гуанин в позиция 258, в близост до N-крайната точка на протеина. Това води до възникване на мутация с изместване на рамката на четене, в резултат на което се транскрипират протеини без гликозилтрансферазна активност [4].

Има редица доказателства за връзката на кръвните групи с различни заболявания. В продължение на много години ABO кръвна група е свързана с предразположение към артериални и венозни заболявания, като например венозен тромбоемболизъм, периферна съдова болест и исхемична болест на сърцето [9].

Епидемиологичните данни относно връзката между ABO кръвните групи и риска от ИБС са противоречиви. Въпреки това съществуват не малко на брой изследвания в тази посока, подкрепящи подобна асоциация. През 2012 г. He и съавт. провеждат метаанализ на голяма част от проучванията за връзката на кръвногруповите антигени с риска от развитие на сърдечно заболяване. В комбинирания анализ при коригиране за сърдечно-съдовите рискови фактори, в сравнение с участниците с кръвна група 0, тези с кръвни групи А, В или АВ, показват по-голяма склонност да развият ИБС (OR [95% CI] 1.23 [1.11-1.36]). Данните показват, че ABO кръвните групи са значително свързани с повишен риск от коронарно заболяване. В сравнение с останалите кръвни групи носителите на кръвна група 0 показват нисък риск от развитие на ИБС [25].

IL-6R

The IL-6R Genetics Consortium представлява колаборативен проект, включващ 46 отделни проучвания, създаден с цел установяване на въздействието на генетични варианти в гена за рецептора на интерлевкин-6 (IL-6R) по отношение на риска от развитие на ИБС, възпалителни процеси и други съдови рискови фактори. Целта на този анализ е да се установи дали IL-6R-медираните пътища играят съществена роля в развитието на ИБС.

Работата на изследователите от тези 46 проучвания включва:

- установяване на генотипните и алелните честоти на базовата замяна Asp358Ala, както и тези на близко разположените проксимални генетични варианти.

- преживяемост при ИБС, МИ или запушване на артериите (стеноза)

- съответните възпалителни биомаркери (интерлевкин-6, рецептор за интерлевкин-6, С-реактивен протеин, фибриноген)

- други съдови рискови фактори (затлъстяване, диабет, холестерол, кръвно налягане, триглицериди, тютюнопушене).

Като цяло е предоставена информация относно 51 441 случаи на коронарни заболявания и 136 226 контроли. Установява се, че минорната алелна честота на Asp358Ala е 39%. Asp358Ala не се свързва с концентрацията на липидите, кръвното налягане, затлъстяването, дисгликемията или тютюнопушенето ($P \geq 0.04$ за носителството на рисков алелен вариант). От друга страна, за всяко унаследено копие на 358Ala се установява повишаване на концентрацията на IL-6R от 34.3% (95% CI 30.4-38.2) и на интерлевкин 6 от 14.6% (10.7-18.4), докато средната концентрация на С-реактивния протеин е понижена със 7.5% (5.9-9.1) и тази на фибриногена с 1.0% (0.7-1.3). За всяко копие на алел 358Ala рискът от ИБС е намален с 3.4% (1.8-5.0). Също така е установено, че полиморфен вариант Asp358Ala не се свързва с нивата на IL-6R иРНК или на моноцитите, произвеждащи интерлевкин-6.

Всички проведени проучвания на изследователските групи показват, че IL-6R-медираните пътища са свързани до голяма степен с патофизиологията и етиологията на ИБС [57].

Друг световен консорциум – The Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL-6R MR) Consortium през 2012 г. прилага т.нар. Менделова рандомизация, като използва единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в гена IL-6R за оценка на ефикасността и безопасността на терапевтичното инхибиране на IL-6R за първична превенция на ИБС, в сравнение с ефектите на тоцилизумаб, докладвани в рандомизирани проучвания при пациенти с ревматоиден артрит.

В 40 проучвания, включващи до 133 449 лица, полиморфен вариант в IL-6R се свързва с увеличение на циркуиращите нива на интерлевкин-6 (увеличение за всяко копие на рисков алел с 9.45%, (CI 95% CI 8.34-10.57), както и намаление на стойностите на С-реактивния протеин (намаление за всяко копие на рисков алел с 8.35%, (CI 95% CI 7.31-9.38) и концентрациите на фибриногена (намаление за всяко копие на рисков алел с 0.85%, (CI 95% CI 0.60-1.10). Тези ефекти са в съответствие с ефектите при инхибирането на IL-6R при приема на тоцилизумаб (4-8 mg/kg на всеки 4 седмици) при пациенти с ревматоиден артрит. При 25 458 случаи на коронарно сърдечно-съдово заболяване и 10 074 контроли, въпросната замяна в IL-6R се свързва с намален коефициент на ИБС (OR 0.95, 95% CI 0.93-0.97, $p = 1.53 \times 10^{-5}$).

Въз основа на генетичните доказателства при човек IL-6R сигнализацията изглежда има съществена роля в развитието на ИБС. Инхибирането на IL-6R може да осигури нов терапевтичен подход за превенция на това заболяване, което дава основание за тестване в подходящо проведени, рандомизирани проучвания [26].

През 2012 г. Davies и сътр. провеждат метаанализ на 5 проучвания от типа GWASs, с участието на 13 949 лица (7123 случая, 6826 контроли), при които са генотипизирани над 5 млн. SNPs. Всички силни локуси са проследени в допълнителни 5 проучвания, включващи общо 11 032 лица (5211 случая, 5821 контроли). В резултат на проведените изследвания е установен нов, чувствителен на коронарно заболяване locus, разположен в хромозомен регион 1q21.3. Въпросният генетичен вариант е локализиран в 3' UTR на гена IL-6R и дава асоциация със статистическа значимост с ИБС ($P < 7.10^{-7}$, OR 1.45) [18].

Интерлевкин-6 (IL-6) представлява мултифункционален цитокин, който е от съществено значение за регулацията на имунния отговор, кръвообразуването и възпалителните реакции в тяхната остра фаза. При хората се кодира от гена IL-6 [22]. IL-6 се секретира от Т-клетките и макрофагите, които стимулират имунния отговор по време на инфекция или след травма, особено изгаряния

или друго увреждане на тъканите, водещо до възпаление. IL-6 играе роля в борбата с инфекцията. Доказано е, че IL-6 при мишки е необходим при съпротива срещу бактерията *Streptococcus pneumoniae* [22].

IL-6 е способен да преминава кръвно-мозъчната бариера [5], като стимулира синтеза на PGE2 в хипоталамуса, в резултат на което температурата на тялото се променя. В мускулната и мастната тъкан IL-6 стимулира мобилизирането на енергията, което води до увеличаване на телесната температура. IL-6 може да се секретира от макрофагите в отговор на специфични микробни молекули – различни патогени [5]. IL-6 е от съществено значение за широк спектър заболявания, например диабет [32], атеросклероза [21], депресия [19], болест на Алцхаймер [63], системен лупус еритематозус [64], рак на простатата [61] и ревматоиден артрит [42].

IL-6 е мономер, съставен от 184 аминокиселини, произведени от Т-клетки макрофаги и ендотелни клетки. Генът, кодиращ IL-6, е разположен в хромозомен локус 7p21 [38]. IL-6 стимулира реакциите в острата фаза на възпалението, което засилва вродената имунна система и предпазва от увреждане тъканите на организма [68]. Освен това стимулира освобождаването на определени протеини, наречени острофазови, в кръвната плазма от чернодробните клетки и потиска скоростта на синтеза на други протеини. Острофазовите протеини имитират антителя, но имат много широка специфика [30].

IL-6 увеличава синтеза на двата основни острофазови протеина – С-реактивен протеин (CRP), увеличаващ скоростта на фагоцитозата на бактерии, и серумния амилоид А (SAA), посредством регулиране на промените в скоростта на генната транскрипция на тези протеини. По същия начин IL-6 увеличава синтеза на фибриноген, който е изключително важен за кръвосъсирването. При присъствието на IL-6, нивата на албумин и трансферин намаляват драстично [68]. Локалната острофазова реакция води до системна реакция, която включва: повишена температура, повишена скорост на утаяване на еритроцитите, повишена секреция на глюкокортикоиди и активиране на системата на комплемента и каскадите на съсирване на кръвта [11].

Този про- и антивъзпалителен цитокин оказва своите въздействия посредством хетеродимерен рецептор, състоящ се от 2 мембранносвързани гликопротеина – IL6R- α и GP130 (отговорен за сигналната трансдукция и стабилизирането на алфа-комплекса). Още през 1988 г. Yamasaki и сътр. изолират кДНК, кодираща рецептора за интерлевкин-6. Авторите показват, че тази ДНК кодира протеин, състоящ се от 468 аминокиселини (АК), включително един сигнален пептид от около 19 АК и функционален домен от около 90 АК, подобен на домена на имуноглобулиновото суперсемејство. В цитоплазмения домен на IL6R, състоящ се от около 82 АК, липсва тирозин-киназен домен, за разлика от рецепторите за останалите растежни фактори [72].

Генът за IL6R се състои от 10 екзона. Функционални анализи на Schuster и съавт. от 2003 г. показват, че димерният IL6R съществува в плазмената мембрана в отсъствието на IL6 [60]. Свързването на лиганда IL6 към рецептора, изглежда, не оказва влияние върху димеризацията на IL6R. Авторите на научната публикация стигнат до заключението, че димеризацията на IL6R може да протече както на повърхността на клетката, така и в разтвор [60].

IL-6 рецептор се намира на повърхността на множество различни типове клетки, включително нормални Т-клетки, активирани В-клетки, миелоидни клетъчни линии, хепатомни клетъчни линии, миелом-клетъчни линии и на Епщайн-Бар вируса (EBV) [27, 28]. IL-6 може да доведе до транскрипцията на голямо разнообразие от протеини чрез трите основни пътища на сигнално преобразуване – протеин киназа С, протеин киназа А и калций-свързания път [33].

IL-6 може да се активира посредством различни стимули [38]. При свързването на IL-6 към α -субединицата на неговия рецептор IL-6R, гликопротеин 130 хомодимеризира, което активира каскада от реакции, водещи до фосфорилиране на транскрипционните фактори STAT1 и STAT3 от различни тирозин кинази. Рецепторът IL-6R, както и гликопротеин 130 са установени в разтворима форма в биологични течности, а също така са пречистени от човешки серум и урина. Броят на клетъчните типове, експресиращи IL-6R, не

отразява пълния спектър от клетъчни типове, чувствителни на IL-6. Към клетъчните типове, известни да експресират IL-6R, се отнасят CD4+ и CD8+ Т-клетки, хепатоцити, CD34+ стволови клетки, неврони, неутрофили, моноцити и остеобласти [58, 65].

Интерлевкин-6 е особено важен в ранните етапи на Т-клетъчната диференциация. В тази фаза той подсилва ефекта на IL-2 и насърчава диференциацията на CD4 клетките в Т-хелперните клетки [30]. Този протеин има много важна роля в живота на NK клетките. Той се явява като активатор, а по-късно ги стимулира да извършват по-ефективно лизиса на патоген.

Интерлевкин-6 е много важен за стимулиране на диференциацията и пролиферацията на В-клетките [23]. Най-известният ефект се свързва с предизвикване на постоянна диференциация на В-клетките в плазмени клетки и антитяло-продуциращите клетки [53]. IL-6 увеличава освобождаването на антитела, действайки като фактор за растеж върху вече диференцираните плазмени клетки. Той стимулира най-вече освобождаването на IgG и IgA антитела от въпросните клетки [23]. Нокаут на IL-6 води до тежки последици за имунната система, включително голям спад в острата фаза на имунната реакция и в производството на антитела IgA [30].

Повишаване на експресията на IL-6 може да доведе до значително поликлонално разпространение на плазмени клетки. Освен това липсата на регулация на гена може да отключи автоимунно заболяване и да доведе до много лимфоидни злокачествени заболявания, включително множествен миелом [68]. Неконтролирано или дефектно производството на този протеин най-често води до болести и участва в патогенезата на много автоимунни и други заболявания [67].

Познаването на функциите на IL-6 може да намери широко приложение в клиничната практика. Ако в острата фаза на възпалителния процес не се контролират температурата на тялото и възпалението, те могат да станат пагубни за организма и да доведат до сепсис и шок. Също така е доказано, че мутация в гена за IL-6 може да оказва съществена роля в растежа на злокачествените клетки, особено при мултиплен миелом [23].

IL-6 се намира в големи количества в синовиалната тъкан на пациенти с ревматоиден артрит. При тези случаи той предизвиква увеличаване на производството на антитела от В-клетките [41]. Чрез множество проучвания е установено, че пациенти с автоимунно заболяване на черния дроб, включително първична билиарна цироза, показват понижени нива на експресия на IL-6 и на IL-1 и TNF-В. Тези данни показват, че IL-6 е от съществено значение за патогенезата на тези заболявания [67].

Въз основа на генетичните доказателства при човек IL-6R сигнализацията изглежда да играе съществена роля в развитието на ИБС. Инхибирането на IL-6R може да осигури нов терапевтичен подход за превенция на това заболяване, а това дава основание за тестване в подходящо проведени, рандомизирани проучвания [26].

MTHFD1L

За първи път през 2009 г. Wellcome Trust Case – Control Consortium (WTCCC) идентифицират хромозомни локуси, които са силно свързани с ИБС посредством GWAS. В изследването участват 1926 пациенти с ИБС и 2938 контроли. Последващото репликативно проучване за най-силните асоциативни сигнали е проведено в немска група от 875 пациенти с инфаркт на миокарда и 1644 контроли. Генотипът при двете проучвания е определен с използването на GeneChip Human Mapping 500 K Array Set (Affymetrix). И при двете проучвания най-силна връзка с ИБС както в WTCCC, така и в германските проучвания, дава хромозомен locus 9p21.3 (съответно $P = 1.80 \times 10^{-14}$ и $P = 3.40 \times 10^{-6}$). Като цяло проучването на WTCCC разкрива девет основни локуса, силно свързани с коронарната болест на сърцето ($P < 1,2 \times 10^{-5}$ и по-малко от 50% шанс за фалшивоположителен резултат). В допълнение към хромозома 9p21.3 два от тези локуси са успешно повторени (коригирано $P < 0.05$) в немско проучване: хромозома 6q25.1 и хромозома 2q36.3. Комбиниран анализ на двете проучвания определя четири допълнителни локуса, значително свързани с ИБС ($P < 1,3 \times 10^{-6}$) и висока степен на вероятност ($> 80\%$) за истинска асоциация на хромозоми 1p13.3, 1q41, 10q11.21, и 15q22.33.

Всички участници в двете проучвания са от европейска раса [55].

Изследваните от WTCCC 1988 пациенти в проучването са имали история на един МИ или коронарна реваascularизация преди навършване на 66 години, както и силна фамилна анамнеза за коронарно артериално заболяване [2, 54].

Хромозомен локус 6q25.1 съдържа гена MTHFD1L [49, 69]. Генетични варианти в MTHFD1L може да допринесат за промяна в плазмените нива на хомоцистеин [49, 51], което повишава възможността за връзка между MTHFD1L и този рисков фактор за коронарно, артериално заболяване [24]. Предварителният анализ на данните от 1070 души в AtheroGene Study не разкрива връзка между локус MTHFD1L и плазмените нивата на хомоцистеина [66]. Независимо от това са необходими по-нататъшни проучвания в по-големи популационни извадки, както и изследвания при нови популационни групи, за изясняване ролята на въпросния локус в етиологията и патофизиологията на коронарното заболяване [55].

Протеинът, кодиран от гена MTHFD1L, участва в синтеза на тетраhydrofolат (THF) в митохондриите. THF е изключително важен за *de novo* синтеза на пурины и тимидилат и при обновлението на метионина от хомоцистеина. Открити са няколко транскрипционни варианта на този ген [49]. Митохондриалната монофункционална тетраhydrofolат синтетаза, известна също като формилтетраhydrofolат синтетаза, е ензим, който при хората се кодира от гена MTHFD1L [14, 15, 49]. Едновъглеродно заместени форми на тетраhydrofolат (THF) участват в *de novo* синтеза на пурините и тимидилат, както и в клетъчните реакции на метилиране чрез регенерация на метионина от хомоцистеина. MTHFD1L е ензим, участващ в синтеза на THF в митохондриите. За разлика на MTHFD1, който има дехидрогеназна метилтетраhydrofolат циклохидразна и формилтетраhydrofolат синтетазна ензимна активност, MTHFD1L притежава само формилтетраhydrofolат синтетазна активност [15].

През 2003 г. Prasanna и сътр. установяват, че генът MTHFD1L обхваща 236 кило-

бази и се състои от 28 екзона, както и един алтернативен екзон (8a). Екзон 1 е GC-богат и съдържа множество CPG острова. Промоторът на гена съдържа множество потенциални места за свързване на транскрипционни фактори, включително такива за SP1 (189 906) и СЕВР-алфа (116897). Посредством геномен секвенционен анализ Prasanna и др. през 2003 г. картират гена MTHFD1L върху хромозомен локус 6q25.2 [49].

PSRC1

PSRC1 кодира богат на пролин протеин. Проучвания в тази област показват, че генът се регулира от p53 и вероятно участва в p53-медираното потискане на клетъчния растеж. Кодираният белтък може да функционира като микротубулен, дестабилизиращ протеин, който контролира динамиката на делителното вретено и митотичната прогресия посредством регулиране на микротубулната деполяризация. Най-малко една генетичната вариация в този ген се свързва с понижаване на серумните нива на липопротеините с ниска плътност (LDL) и холестерола [36, 37].

Посредством геномен секвенционен анализ Lo и Wang (2002) картират гена PSRC1 върху хромозома 1p13.1 [37]. Същите автори установяват, че генът съдържа 8 екзона и обхваща регион с дължина 7.7 килобази [37]. Hsieh и сътр. (2008) откриват три на брой p53 response elements (RE) в 5-промоторния регион на гена [29].

PSRC1 в 1p13.3 играят роля в растежа на клетките или клетъчното инхибиране. Тези процеси са от основно значение за формирането и прогресията на атеросклеротичната плака, а също и за нейната нестабилност [30]. Резултатите от проведеното проучване показват, че генетичното регулиране на тези процеси играе важна роля в развитието на ИБС и ИМ [10, 34, 36, 40, 50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на ролята на така описаните генетични варианти, свързани с висок риск от появата на ИБС, за патогенезата на това тежко и социално значимо заболяване би спомогнал за откриване на нови прогностични маркери за болестта. Наред с това информацията за генетичните фактори, отговорни за появата на ИБС, би облекчила провеждането на генетична консултация за роднините на за-

сегнатите и ще доведе до разработването на надеждна и ефективна програма за превенция и ранно откриване на заболяването сред високорисковите индивиди.

Библиография

1. Данни на Националния статистически институт (2011-2012).
2. Al Fakih, K. et al. Effect of a common X-linked angiotensin II type 2-receptor gene polymorphism (-1332 G/A) on the occurrence of premature myocardial infarction and stenotic atherosclerosis requiring revascularization. – *Atherosclerosis*, **195**, 2007, e32-38.
3. Allain, B. et al. Neuropilin-1 regulates a new VEGF-induced gene, Phactr-1, which controls tubulogenesis and modulates lamellipodial dynamics in human endothelial cells. – *Cell Signal*, **24**, 2012, 214-223.
4. Amundadottir, L. et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. – *Nat. Genet.*, **41**, 2009, 986-990.
5. Banks, W. A., A. J. Kastin et E. G. Gutierrez. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. – *Neurosci. Lett.*, **179**, 1994, 53-56.
6. Barbalic, M. Large-scale genomic studies reveal central role of ABO in sP-selectin and sICAM-1 levels. – *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 2010, 1863-1872.
7. Barbalic, M. et al. Genome-wide association analysis of incident coronary heart disease (CHD) in African Americans: a short report. – *PLoS Genet.*, **7**, 2011, e1002199.
8. Bauters, C. [Pathophysiology of coronary artery disease]. – *Rev. Prat.*, **58**, 2008, 1523-1526.
9. Biswas, J. et al. Relationship between blood groups and coronary artery disease. – *Mymensingh Med. J.*, **17**, 2008, S22-27.
10. Bosserhoff, A. K. et R. Buettner. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). – *Histol. Histopathol.*, **17**, 2002, 289-300.
11. Castell, J. V. et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. – *FEBS Lett.*, **242**, 1989, 237-239.
12. Chan, K. et al. Common variant on chromosome 9p21 predicts severity of coronary artery disease. – *J. Am. Coll. Cardiol.*, **57**, 2011, 1497-1498.
13. Chasman, D. I. Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis. – *PLoS Genet.*, **5**, 2009, e1000730.
14. Christensen, K. E. et R. E. Mackenzie. Mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase, and formyltetrahydrofolate synthetases. – *Vitam. Horm.*, **79**, 2008, 393-410.
15. Christensen, K. E. et al. Disruption of the *mthfd1* gene reveals a monofunctional 10-formyltetrahydrofolate synthetase in mammalian mitochondria. – *J. Biol. Chem.*, **280**, 2005, 7597-7602.
16. Cluett, C. et al. The 9p21 myocardial infarction risk allele increases risk of peripheral artery disease in older people. – *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **2**, 2009, 347-353.
17. Consortium. CADCDG. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. – *Nat. Genet.*, **43**, 2011, 339-344.
18. Davies, R. W. et al. A genome-wide association study for coronary artery disease identifies a novel susceptibility locus in the major histocompatibility complex. – *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **5**, 2012, 217-225.
19. Dowlati, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. – *Biol. Psychiatry*, **67**, 2010, 446-457.
20. Dube, J. B. et R. A. Hegele. Genetics 100 for cardiologists: basics of genome-wide association studies. – *Can. J. Cardiol.*, **29**, 10-17.
21. Dubinski, A. et Z. Zdrojewicz [The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis]. – *Pol. Merkur. Lekarski*, **22**, 2007, 291-294.
22. Ferguson-Smith, A. C. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. – *Genomics*, **2**, 1988, 203-208.
23. Fernandez-Botran, R. et al. Linked in vivo expression of soluble interleukin-4 receptor and interleukin-4 in murine schistosomiasis. – *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1995, 649-656.
24. Fruchart, J. C. et al. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. – *Circulation*, **109**, 2004, III15-19.
25. He, M. et al. ABO blood group and risk of coronary heart disease in two prospective cohort studies. – *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 2012, 2314-2320.
26. Hingorani, A. D. et J. P. Casas. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. – *Lancet*, **379**, 2012, 1214-1224.
27. Hirano, T. et T. Kishimoto. Interleukin-6: possible implications in human diseases. – *Ric. Clin. Lab.*, **19**, 1989, 1-10.
28. Hirano, T. et al. Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor. – *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **557**, 1989, 167-178.
29. Hsieh, W. J. et al. Human DDA3 is an oncoprotein down-regulated by p53 and DNA damage. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 2008, 567-572.
30. Janeway, C., Jr. et R. Medzhitov. Viral interference with IL-1 and toll signaling. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2000, 10682-10683.
31. Jarray, R. et al. Depletion of the novel protein PHACTR-1 from human endothelial cells abolishes tube formation and induces cell death receptor apoptosis. – *Biochimie*, **93**, 2011, 1668-1675.
32. Kristiansen, O. P. et T. Mandrup-Poulsen. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? – *Diabetes*, **54**, 2005, Suppl 2, S114-124.
33. Kuyama, J. et al. Synchronous fluctuation of interleukin-6 and platelet count in cyclic thrombocytopenia and thrombocytosis. – *Intern. Med.*, **34**, 1995, 636-639.
34. Libby, P. et P. Theroux. Pathophysiology of coronary artery disease. – *Circulation*, **111**, 2005, 3481-3488.
35. Lin, H. F. et al. Chromosome 9p21 genetic variants are associated with myocardial infarction but not with ischemic stroke in a Taiwanese population. – *J. Investig. Med.*, **59**, 2011, 926-930.
36. Lo, P. K. et al. Identification of a novel mouse p53 target gene DDA3. – *Oncogene*, **18**, 1999, 7765-7774.
37. Lo, P. K. et F. F. Wang. Cloning and characterization of human and mouse DDA3 genes. – *Biochim. Biophys. Acta*, **1579**, 2002, 214-218.
38. May, L. T. et al. Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 1989, 991-998.
39. McCarthy, M. I. et J. N. Hirschhorn. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. – *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 2008, R156-165.

40. Miyazono, K., P. ten Dijke et C. H. Heldin. TGF-beta signaling by Smad proteins. – *Adv. Immunol.*, **75**, 2000, 115-157.
41. Nawata, Y. et al. IL-6 is the principal factor produced by synovia of patients with rheumatoid arthritis that induces B-lymphocytes to secrete immunoglobulins. – *Ann. N Y Acad. Sci.*, **557**, 1989, 230-238.
42. Nishimoto, N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. – *Curr. Opin. Rheumatol.*, **18**, 2006, 277-281.
43. Ouimet, C. C. et al. Cellular and subcellular distribution of spinophilin, a PP1 regulatory protein that bundles F-actin in dendritic spines. – *J. Comp. Neurol.*, **479**, 2004, 374-388.
44. Pare, G. et al. Novel association of ABO histo-blood group antigen with soluble ICAM-1: results of a genome-wide association study of 6,578 women. – *PLoS Genet.*, **4**, 2008, e1000118.
45. Paterson, A. D. et al. Genome-wide association identifies the ABO blood group as a major locus associated with serum levels of soluble E-selectin. – *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 2009, 1958-1967.
46. Pearson, T. A. et T. A. Manolio. How to interpret a genome-wide association study. – *Jama*, **299**, 2008, 1335-1344.
47. Peng, W. H. et al. Chromosome 9p21 polymorphism is associated with myocardial infarction but not with clinical outcome in Han Chinese. – *Clin. Chem. Lab. Med.*, **47**, 2009, 917-922.
48. Pepine, C. J. et W. W. Nichols. The pathophysiology of chronic ischemic heart disease. – *Clin. Cardiol.*, **30**, 2007, 14-19.
49. Prasanna, P. et al. Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immunolocalization in Chinese hamster ovary cells. – *J. Biol. Chem.*, **278**, 2003, 43178-43187.
50. Qin, B. Y. et al. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. – *Genes Dev.*, **16**, 2002, 1950-1963.
51. Randa, C. et al. Three siblings with nonketotic hyperglycaemia, mildly elevated plasma homocysteine concentrations and moderate methylmalonic aciduria. – *J. Inher. Metab. Dis.*, **23**, 2000, 520-522.
52. Reilly, M. P. et al. Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. – *Lancet*, **377**, 2011, 383-392.
53. Roitt, I. M. et N. Sumar. IgG and rheumatoid factor at a glance. – *Clin. Exp. Rheumatol.*, **8**, 1990, Suppl 5, 89-91.
54. Samani, N. J. et al. A genomewide linkage study of 1,933 families affected by premature coronary artery disease: The British Heart Foundation (BHF) Family Heart Study. – *Am. J. Hum. Genet.*, **77**, 2005, 1011-1020.
55. Samani, N. J. et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. – *N. Engl. J. Med.*, **357**, 2007, 443-453.
56. Samani, N. J. et H. Schunkert. Chromosome 9p21 and cardiovascular disease: the story unfolds. – *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **1**, 2008, 81-84.
57. Sarwar, N. et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. – *Lancet*, **379**, 2012, 1205-1213.
58. Schooltink, H. et al. Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. – *FEBS Lett.*, **314**, 1992, 280-284.
59. Schunkert, H. et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. – *Nat. Genet.*, **43**, 2011, 333-338.
60. Schuster, B. et al. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. – *J. Biol. Chem.*, **278**, 2003, 9528-9535.
61. Smith, P. C. et al. Interleukin-6 and prostate cancer progression. – *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**, 2001, 33-40.
62. Storry, J. R. et M. L. Olsson. The ABO blood group system revisited: a review and update. – *Immunohematology*, **25**, 2009, 48-59.
63. Swardfager, W. et al. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. – *Biol. Psychiatry*, **68**, 2010, 930-941.
64. Tackey, E. et al. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. – *Lupus*, **13**, 2004, 339-343.
65. Taga, T. et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. – *Cell*, **58**, 1989, 573-581.
66. Tiret, L. et al. Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease. – *Circulation*, **112**, 2005, 643-650.
67. Tovey, M. G. et al. Expression of IL-6 in normal individuals and in patients with autoimmune disease. – *Ann. N Y Acad. Sci.*, **557**, 1989, 363-371.
68. Van Parijs, L. et al. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. – *J. Immunol.*, **158**, 1997, 3738-3745.
69. Walkup, A. S. et D. R. Appling. Enzymatic characterization of human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase. – *Arch. Biochem. Biophys.*, **442**, 2005, 196-205.
70. Wauters, E. et al. Influence of 23 coronary artery disease variants on recurrent myocardial infarction or cardiac death: the GRACE Genetics Study. – *Eur. Heart J.*, **34**, 2012, № 13, 993-1001, Epub. 2012 Nov. 15.
71. Wu, O. et al. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. – *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 2008, 62-69.
72. Yamasaki, K. et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. – *Science*, **241**, 1988, 825-828.

✉ Адрес за кореспонденция:

Рени Цвеова
 Център по молекулна медицина
 Медицински университет
 ул. „Св. Г. Софийски“ № 1
 1431 София
 e-mail: renitzveova@abv.bg

✉ Address for correspondence:

Reni Tzveova
 Molecular Medicine Center
 Medical University
 1 Sv. G. Sofiyski st.
 Bg – 1431 Sofia
 e-mail: renitzveova@abv.bg