

Казахский Национальный университет им. аль-Фараби

УДК 575.174.015.3:616.1(574)

На правах рукописи

СКВОРЦОВА ЛИЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

Ассоциация полиморфизмов генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, с развитием сердечнососудистых заболеваний у жителей Казахстана

6D060700 – Биология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (Ph.D.)

Научные консультанты:
кандидат биологических наук,
профессор Жансугурова Л. Б.;
Ph.D., профессор Henry Jay Forman

Республика Казахстан
Алматы, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
1.1 Эпидемиология сердечнососудистых заболеваний	10
1.2 Мультифакторность и полигенность сердечнососудистых заболеваний	14
1.3 Атеросклероз и ишемическая болезнь сердца.....	16
1.4 Роль окислительного стресса в инициации и развитии ишемической болезни сердца.....	18
1.5 Антиоксидантная защита сердечнососудистой системы	22
1.6 Супероксиддисмутазная антиоксидантная ферментная система	25
1.6.1 Внеклеточная Супероксид Дисмутаза SOD3 (EC-SOD).....	25
1.6.2 Ген <i>SOD3</i> , полиморфизм гена и риск развития сердечнососудистых заболеваний	26
1.7 Глутатионовая антиоксидантная ферментная система.....	26
1.7.1 Сера и Глутатион GSH.....	26
1.7.2 Регуляция синтеза глутатиона	28
1.7.3 Гены <i>GCLC</i> и <i>GCLM</i> , полиморфизм генов и риск развития сердечнососудистых заболеваний.....	29
1.7.4 Селен и глутатионпероксидазы GPX (GSH-Px)	30
1.7.6 Глутатионпероксидаза 1 GPX1 (GSH-Px1).....	33
1.7.7 Ген <i>GPX1</i> , регуляция экспрессии и активности.....	34
1.7.7 Полиморфизм гена <i>GPX1</i> и риск развития сердечнососудистых заболеваний	37
1.7.8 Фосфолипидная глутатионпероксидаза 4 GPX4 (GSH-Px4)	38
1.7.9 Ген <i>GPX4</i> , регуляция экспрессии гена и активности белка	40
1.7.10 Полиморфизм гена <i>GPX4</i> и риск развития сердечнососудистых заболеваний	41
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Объекты исследования	43
2.2 Методы исследования.....	44
2.2.1 Молекулярно-генетические методы.....	44
2.2.2 Экспериментальные методы.....	49
2.2.3 Иммуно-гистохимические методы	49
2.2.2 Методы статистической обработки полученных данных.....	53
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.2 Моделирование экспериментального атеросклероза у кроликов для изучения экспрессии антиоксидантных белков	56
3.2.1 Атеросклероз у кроликов.....	56

3.2.2 Изучение экспрессии антиоксидантного белка SOD3 при развитии атеросклероза у кроликов	58
3.2.3 Изучение экспрессии антиоксидантного белка GPX1 (GSH-Px1) при развитии атеросклероза у кроликов	69
3.1 Генетико-эпидемиологические исследования методом «случай-контроль»	76
3.1.1 Анализ клинического материала и анкетных данных для исследования	76
3.1.2 Генотипирование и логистический регрессионный анализ	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	103
ПРИЛОЖЕНИЕ А	128
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	130
ПРИЛОЖЕНИЕ В	132
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	134

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ССЗ	Сердечнососудистые заболевания
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
ИМ	Инфаркт миокарда
ЛП	Липопротеиды
ЛПВП	Липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	Липопротеиды низкой плотности
ТГ	Триглицериды
ПНЖК	Полиненасыщенные жирные кислоты
АОФ	Антиоксидантные ферменты
АОВ	Антиоксидантные вещества
АФК	Активные формы кислорода
АФА	Активные формы азота
НАДФ(Н)	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
РААС	Ренин-ангиотензиновая система
ГМК	Гладкомышечные клетки
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
GWAS	Genome Wide Association Studies, ассоциативные полногеномные исследования
GSH	Glutathione, восстановленный глутатион
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase, митоген-активированная протеинкиназа
TNF- α	Tumor necrosis factor α , фактор некроза опухоли α
NF- κ B	Nuclear factor kappa B, ядерный фактор каппа Б
LOH	Loss of heterozygosity, потеря гетерозиготности
EPA	Eicosapentaenoic acid, эйкозопентаеновая кислота
DHA	Docosahexaenoic acid, докозагексаеновая кислота
SOD3	Супероксид дисмутаза 3
GPX1	Глутатионпероксидаза 1
GPX4	Глутатионпероксидаза 4
GCLM	Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit, модифицирующая субъединица глутамат-цистеин лигазы
GCLC	Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit, каталитическая субъединица глутамат-цистеин лигазы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Согласно статистическим данным, сердечнососудистые заболевания (ССЗ), остаются наиболее значимой проблемой здоровья населения в мире. Казахстан не является исключением мировых «сердечнососудистых» тенденций. Эксперты всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) прогнозируют дальнейшее увеличение заболеваемости и смертности от ССЗ, преимущественно в развитых и развивающихся странах.

Достижения современной науки и медицины в познании основ ССЗ и установление основных «классических» факторов риска, позволило, в значительной степени, уменьшить, и взять под контроль смертность от сердечных патологий во многих развитых странах. Проспективные исследования по влиянию основных «классических» факторов риска на развитие ССЗ, позволили выявить закономерности изменения концентраций определенных белков в организме при различных патологиях сердечнососудистой системы. Эти данные позволили не только пролить свет на фундаментальные механизмы развития патологий ССЗ, но и выявить и внедрить в клиническую диагностику новые более специфичные «внутренние» маркеры (или предикторы) ССЗ. Такие широко распространенные и доступные во многих клинических лабораториях маркеры, как маркеры липидного спектра крови, провоспалительные и некротические маркеры, маркеры оксидативного стресса – позволяют улучшить проводимую терапию и оценку риска воздействия сердечнососудистых заболеваний на здоровье населения.

Однако на сегодняшний день, ситуация складывается следующая. Зачастую, на практике, свою скрининговую значимость, данные факторы риска и маркеры приобретают на поздних стадиях развития заболевания, когда патологические изменения в тканях сосудов и сердца уже манифестируют длительное время, переходя в генерализованный воспалительный процесс. На этом этапе наиболее эффективным и действенным решением является активная медикаментозная и/или хирургическая терапия, с последующим мониторингом основных маркеров и других биохимических параметров крови. Хотя, борьба с заболеванием на данной стадии и имеет положительную динамику, далеко не всегда это приводит к полной излечимости от ССЗ и полному восстановлению физической/ умственной трудоспособности организма. В сложившейся ситуации, наиболее действенным было бы предупреждение развития заболевания, в особенности для лиц из групп риска. В этой связи, исследования в области превентивной медицины весьма актуальны и востребованы, а так же имеют огромный потенциал для улучшения качества жизни населения.

Белковые маркеры давно применяются в клинической практике для диагностики сердечно-сосудистой патологии, однако их диагностическая значимость весьма ограничена. Поэтому их широкое применение способствовало только частичному снижению параметров заболеваемости и смертности во многих странах. Для дальнейшего стремления к снижению этих параметров, необходимо исследование более чувствительных и

индивидуальных биомаркеров ССЗ. В данной ситуации, перспективным подходом является поиск новых биомаркеров на основе индивидуальных генетических особенностей человека.

Исследования в области молекулярно-генетической предрасположенности к ССЗ привлекают пристальное внимание и интерес, как медиков, так и ученых во всем мире. Реакция организма на различные факторы риска детерминирована взаимодействием индивидуальных генотипов с действием средовых факторов [1]. Различные мутации, в том числе и однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphism SNP) могут иметь определенные молекулярно-фенотипические последствия на разных уровнях реализации генетической информации, и обуславливать индивидуальную реакцию каждого организма при воздействии внешней среды. Анализ индивидуальных генетических особенностей позволяет выявлять мутации и полиморфизмы ключевых генов патогенеза ССЗ, которые, наряду, с общеизвестными средовыми факторами, уже занимают прочное положение в ряду факторов риска ССЗ [2].

Для Казахстана наиболее значимой болезнью системы кровообращения является Ишемическая Болезнь Сердца (ИБС). К 2017 году, эта патология составляла две трети всех патологий системы кровообращения, занимая лидирующие позиции по заболеваемости и смертности. В течение последних десятилетий понимание молекулярно-генетических основ ИБС стремительно развивалось. Методами молекулярной биологии и анализа сцепленного наследования (Genome Wide Association Studies – GWAS), идентифицировано уже более 600 ИБС ассоциированных генов. Это гены, белковые продукты которых могут быть вовлечены в сигнальные пути инициации, течения и прогрессии ИБС: Ras и MAPK сигнальных систем; TNF- α и NF- κ B; активация каскада сигнальных путей воспаления эндотелиальными клетками в ответ на накопление модифицированных липопротеидов; активации, миграции и адгезии лейкоцитов в очаг воспаления; формирования пенистых клеток, и пролиферации гладкомышечных клеток; антиоксидантных систем [3], [4].

Цель исследования. Целью данной научно-исследовательской работы явились оценка характера экспрессии ряда антиоксидантных белков при развитии атеросклероза и выявление роли полиморфизмов генов, кодирующих антиоксидантные белки, в формировании наследственной предрасположенности к ИБС.

Задачи исследования.

1. Определить уровень экспрессии антиоксидантных белков EC-SOD и GSH-Px1 в нормальной сосудистой стенке и пораженной атеросклерозом, на модельном объекте кролика.
2. На добровольной основе, осуществить сбор биоматериала у людей с установленным диагнозом ИБС, для создания когорты пациентов с ИБС. Одновременно, провести анализ полученных анкетных данных участников и осуществить подбор контрольной группы в соответствии с возрастом, полом и этнической принадлежностью.

3. Провести генотипирование однонуклеотидного полиморфизма Ala58Thr, гена супероксиддисмутазной ферментной системы – *SOD3* (*EC-SOD*), провести статистическую обработку полученных данных и оценить относительный риск развития ИБС у представителей разных генотипов.
4. Осуществить генотипирование промоторных полиморфизмов, генов глутатионовой антиоксидантной ферментной системы – *GCLC* -129C/T и *GCLM* -588C/T, провести статистическую обработку полученных данных и оценить относительный риск развития ИБС для представителей обладающих аллелями -129T в гене *GCLC* и -588T в гене *GCLM*.
5. Осуществить генотипирование полиморфного tandemного повтора GCG (Ala повтор), гена глутатионовой антиоксидантной ферментной системы – *GPX1* и оценить относительный риск развития ИБС у представителей разных генотипов с учетом трехаллельной системы.
6. Провести генотипирование однонуклеотидного полиморфизма C718T, гена глутатионовой антиоксидантной ферментной системы – *GPX4*, провести статистическую обработку полученных данных и оценить относительный риск развития ИБС у представителей с разными генотипами.
7. Оценить вклад изученных вариантов генов, кодирующих ферменты антиоксидантной защиты, в развитие сердечнососудистой патологии.

Объект исследования. Когорты условно здоровых людей и пациентов с ИБС, кролики породы Chinchilla.

Научная новизна исследования. На модельной системе индуцированного атеросклероза у кроликов породы Chinchilla, определен характер экспрессии белков GPX1 и SOD3 в нормальной стенке артериальных сосудов и пораженных атеросклерозом. Показано, что экспрессия SOD3 индуцируется на ранних стадиях атеросклероза в медиальном слое сосуда, подстилающим непосредственно внутреннюю эластическую мембрану. Экспрессия белка SOD3 зависит от степени деградации внеклеточного матрикса на поздних стадиях развития атеросклеротической бляшки. Начальные стадии атеросклероза характеризуются усиленной экспрессией внутриклеточного белка GPX1 в адвентициальном слое. Экспрессия внутриклеточного белка GPX1 существенно репрессируется в интимальном слое на более поздних стадиях атеросклероза (атеромы). Впервые, для казахстанской популяции жителей г. Алматы было выявлено частотное распределение аллельных вариантов в генах, кодирующих антиоксидантные белки *SOD3* (*EC-SOD*), *GCLC*, *GCLM*, *GPX1* и *GPX4*, и исследована их ассоциация с риском развития ИБС. Установлено, что промоторные полиморфизмы генов *GCLC* -129C/T и *GCLM* -588C/T могут выступать в роли внутренних, генетических факторов риска развития ИБС для казахстанской популяции. Для этнической группы казахов, дополнительным фактором риска развития ИБС может служить полиморфизм числа трехнуклеотидных

тандемных повторов GCG в гене *GPX1*. Изученные полиморфные варианты генов *SOD3* (*EC-SOD*) и *GPX4* не проявляют ассоциацию с риском развития ИБС в казахстанской популяции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы по изучению экспрессии антиоксидантных белков при развитии воспаления сосудистой стенки на модельном объекте дополняют исследования в области раскрытия механизмов развития атеросклероза, как основного патофизиологического звена ИБС. Анализ и теоретическое обоснование полученных данных способствует дальнейшему более детальному изучению молекулярно-генетической причины развития ИБС. Изучение генетических факторов антиоксидантных белков, позволяет глубже понять влияние генетического разнообразия полиморфизмов на эффективность антиоксидантной защиты организма при развитии ИБС. Дальнейшие исследования в этой области будут способствовать выявлению панелей генов вовлеченных в патогенез ИБС, как универсальных, так и с учетом этнических, половых, возрастных особенностей пациентов. Это способствует развитию эффективности превентивной медицины в развитии ИБС, а также оптимальных протоколов ведения и лечения пациентов, находящихся в группе риска ИБС.

Положения, выносимые на защиту.

- Внеклеточный белок антиоксидантной защиты SOD3 экспрессируется в субинтимальном и адвентициальном слоях нормальной аорты кроликов. На начальных стадиях индуцированного атеросклероза (стадия липидных пятен) происходит первичная активация экспрессии внеклеточного белка SOD3 в медиальном слое, подстилающим интимальный, которая коррелирует с наличием внеклеточного матрикса на стадии атером.
- Фоновая экспрессия антиоксидантного белка GPX1 наблюдается в интимальном, адвентициальном и части медиального слоев нормальной аорты кроликов. Увеличение экспрессии белка GPX1 при индуцированном атеросклерозе происходит во всех слоях на стадиях липидных пятен и липидных полосок; экспрессия белка GPX1 подавляется в интимальном слое на стадии атером. Интенсивная экспрессия белка GPX1 в адвентициальном слое опосредована комплексным ответом сосудистой стенки при развитии атеросклероза.
- В популяции здоровых жителей г.Алматы (69,5% казахов, 20,82% русских, другие – 9,68%) частота полиморфного аллеля -588Т гена *GCLM* (0,139) больше соответствует частоте, характерной для европейской популяции (0,152); частота полиморфного аллеля -129Т гена *GCLC* (0,111) соответствует частоте, определенной для азиатской популяции (0,133); частота полиморфного аллеля Ala5 гена *GPX1* (0,661) гораздо выше частоты, представленной для мировой популяции (0,345–0,398); частота полиморфного аллеля 58Thr гена *SOD3* (0,462) выше частот характерных для европейской (0,374–0,383) и азиатской

(0,1–0,279) популяций; частота аллеля Leu220= гена *GPX4* (0,603) соответствует частотам азиатских популяции (0,558–0,606).

- Высокий риск развития ишемической болезни сердца в казахстанской популяции достоверно ассоциирован с наличием в генотипе двух аллелей -588Т гена *GCLM* (OR=2,91; CI=0,93–9,10; p=0,009) и/или двух аллелей -129Т гена *GCLC* (OR=3,22; CI=0,88–11,80; p=0,03). С высокой степенью достоверности, отмечен риск ишемической болезни сердца для этнических казахов с генотипом -588ТТ по гену *GCLM* (OR=4,23; CI=0,89–20,16; p=0,04) и/или с генотипом -129ТТ по гену *GCLC* (OR=4,79; CI=1,02–22,39; p=0,04).
- Риск развития ишемической болезни сердца у этнических казахов может быть связан с наличием пяти аланиновых повторов Ala5 в гене *GPX1* в гомозиготном состоянии (Ala5/5: OR=1,88; 95%CI=1,30-2,71; $\chi^2=16,902$, p=0,005).
- Полиморфизм Ala58Thr гена *SOD3* и полиморфизм Leu220= гена *GPX4* не являются факторами риска ишемической болезни сердца для казахстанской популяции (p>0,05).

Апробация работы. Результаты исследований и основные положения настоящей работы были доложены на международных конференциях: 40th FEBS CONGRESS “The Biochemical Basis of Life” (Berlin, Germany, 2015) и VI Международные Фарабиевские чтения (Алматы, Казакстан, 2-12 апреля 2019).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано: 1 статья в журнале и импакт-фактором; 3 статьи в рейтинговых республиканских изданиях, рекомендованных ККСОН; 2 тезиса в международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, список использованных источников (314 наименований) и 5 приложений. Диссертация проиллюстрирована 19 рисунками и 14 таблицами.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Эпидемиология сердечнососудистых заболеваний

Анализ эпидемиологической ситуации позволяет определить текущую ситуацию по заболеванию с медицинской, популяционной (научной) и экономической точек зрения, а также, выявить тенденции и закономерности дальнейшего хода патологического процесса в популяции и/или обществе, с целью принятия стратегических действий в отношении этого заболевания.

В силу социальной значимости сердечнососудистой патологии, статистические данные по ССЗ ежегодно публикуются как отдельными странами, так и организациями, осуществляющими общемировой контроль здоровья населения. Наиболее обширная база данных распространенности/заболеваемости/смертности представлена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), базы данных в Global Burden of Disease (GBD), в периодическом издании Европейская статистика сердечно-сосудистых заболеваний (European Cardiovascular Disease Statistics). Многочисленные обзоры и статьи дополняют общее представление об эпидемиологии сердечнососудистых заболеваний. Согласно этим данным, сердечнососудистые заболевания, по сей день, остаются наиболее глобальной проблемой здоровья населения Земли. Каждый год от ССЗ умирает 17,5 миллиона человек. По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения, число таких больных будет расти до 2040-го года.

Мировая доля регистрации первичных больных и смертей от ССЗ медленно, но верно увеличивается из года в год. Так, например, проведенный мною анализ заболеваемости за 25 лет (с 1990 года до 2015 года), выявил увеличение показателей по ССЗ в 1,7 раза. По оценкам экспертов, ежегодная смертность от ССЗ составляет не менее 31% всех случаев смерти в мире. 85% этих смертей происходит в результате инфаркта миокарда и инсульта. Таким образом, во всем мире ССЗ остаются основной причиной заболеваемости/смертности населения (422,7млн/17,92млн случаев). К слову, это на несколько порядков выше, чем распространенность/смертность от инфекций нижних дыхательных путей (291млн/2,74млн случаев) и хронических заболеваний легких (174,5млн/3,2млн), расположившихся на второй и третьей ступени соответственно.

В большинстве развитых стран Европы показатель смертности доходит до 40% всех случаев смерти, а в Казахстане – более 50%. В последние годы выросли показатели заболеваемости инфарктом миокарда – смертность достигает 30-50% от общего числа заболевших. В Казахстане зарегистрировано около двух миллионов человек, страдающих ССЗ. Это 12% всего экономически активного населения [5] [6].

В сравнении со скоростью роста мировой популяции, прирост ССЗ незначителен, но тем не менее, это вносит отрицательные моменты в обремененность мировой популяции болезнями. Хотя общемировую популяцию еще можно считать достаточно молодой (средний возраст

населения Земли на 2018 год - 30,5 лет), уже отмечаются тенденции к ее старению: увеличивается продолжительность жизни и снижаются показатели рождаемости. Это отражается на возрастной структуре населения Земли. Общеизвестно, что мировая популяция людей – стареющая популяция [7]. Так, статистические данные свидетельствуют, что в 1990 году доля возрастной группы старше 40 лет составляла 26,2% от общего населения Земли, а в 2015 году - уже 35,07% [8]. Доля населения старше 40 лет за последние 25 лет выросла в 1,3 раза. По прогнозам United Nations, доля возрастной группы старше 40 лет будет продолжать расти, с одновременным уменьшением доли молодой возрастной группы (0 – 40 лет). Учитывая то, что ССЗ являются возраст-зависимыми заболеваниями и чаще выявляются у людей старше 40 лет, доля которых ежегодно увеличивается, прирост числа больных ССЗ и смертей будет расти из года в год по причине старения общемировой популяции. На выявляемость сердечно-сосудистой патологии также будут влиять такие факторы, как улучшение возможностей диагностики и «омоложение» ССЗ. Хотя, по общемировым показателям развитие ССЗ у людей младше 40 лет составляет менее 1%, этот показатель также неуклонно растет из года в год.

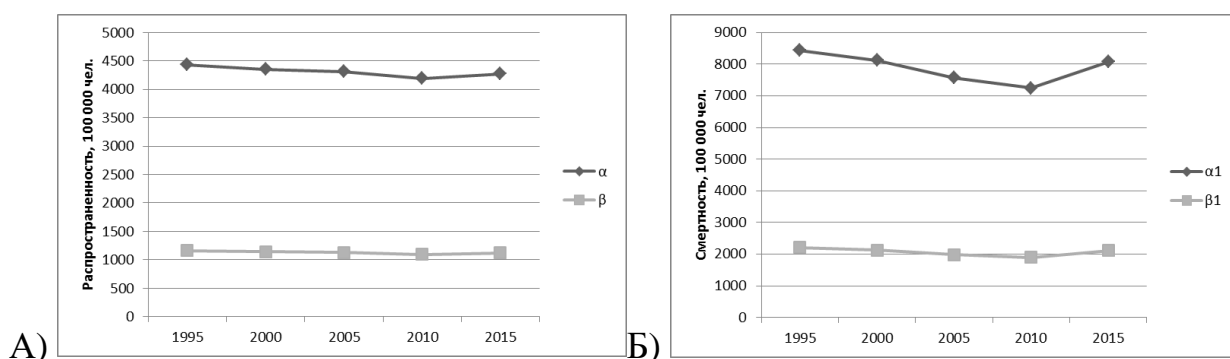
ССЗ представляют собой гетерогенную группу дисфункций системы кровообращения, которые, условно, затрагивают три главных звена: сердце, сосуды мозга и тела. Их патофизиология может значительно отличаться, включая и возрастные особенности их манифестации. Среди всех ССЗ, ишемическая болезнь сердца (ИБС) и инфаркт миокарда (ИМ) являются самыми значимыми причинами смерти (ИБС и ИМ распространенность/смертность в 2015 году составила 110,55млн/8,92млн случаев). Эти показатели неуклонно растут: в 2016 году по ИБС и ИМ зарегистрировано уже 174млн/9,48млн случаев. Таким образом, ИБС и ИМ составляют, примерно, 2/3 численности всех ССЗ в мире, и основные показатели по этим заболеваниям отражают главную структурную динамику заболеваемости/распространенности/смертности от ССЗ в мире.

ИБС и ИМ – яркий пример возраст-ассоциированных заболеваний, манифестация которых начинается с 39–40 лет. Доля случаев ИБС/ИМ в возрастной группе 0 – 40 лет, ничтожно мала и стремится к нулевым значениям в доле мировой популяции. При различных подсчетах, данные по этой группе, на данный момент, не оказывают значимого влияния на различные демографическо-эпидемиологические показатели. Поэтому, для настоящего анализа общей динамики ССЗ и ИБС ими можно пренебречь. Так, в пересчете на 100 000 человек, уровень распространенности ИБС, в мировой популяции за последние ≈20 лет снизился незначительно (Рисунок 1 А, кривая α). Тогда как, уровень смертности от ИБС снизился более значительно за этот же промежуток времени (Рисунок 1 Б, кривая α_1).

Изменение возрастного статуса мировой популяции за последние десятилетия необходимо учитывать для объективной оценки уровня распространенности/смертности. Так, по литературным данным, возраст-скорректированный уровень распространенности/смертности от ИБС на 100 000

человек, при учете предложенной ВОЗ (стандарт) возрастной структуры населения Земли, снижается для населения старше 40 лет. Однако, если в качестве «стандарта» возрастной структуры населения Земли, взять данные 1990 года (0 – 40 лет: 73,8%, старше 40 лет: 26,2%), то, возраст-скорректированный уровень распространенности/смертности от ИБС с учетом возможного сохранения доли населения старше 40 лет на уровне 1990 года, показывает относительное постоянство показателей в выбранном временном интервале. Эта возраст-скорректированная скорость распространенности/смертности по уровню 1990 года (26,2%) представлена на Рисунке 1 А и Б, кривые β и β_1 , соответственно. Кривые β и β_1 отчетливо показывают отсутствие значимого улучшения эпидемиологической обстановки по ИБС во всем мире. И это, не смотря на, достижения медицины и науки в этой области. Хотя, возможно, если бы современная мировая популяция людей не была бы стареющей (ежегодное увеличение доли населения старших возрастных групп), достижения современной медицины были бы видны гораздо более отчетливо.

Возрастной «стандарт» популяции, предложенный ВОЗ [9], представляет собой теоретически ожидаемую структуру популяции мира по возрасту, который периодически корректируется. Данный стандарт, действительно, удобен при расчетах для сравнения и оценки скоростей распространенности/заболеваемости/смертности между различными странами, когда необходимо уравновесить и сравнить между собой страны, гетерогенные по возрастной структуре населения. Однако, для оценки динамики скорости за определенный временной интервал, наибольший интерес (по мнению автора) представляет использование в качестве стандарта именно фактических данных по выбранной популяции в прошлом, вследствие того, что эти данные отражают реально существовавшую/существующую возрастную и численную структуру популяции в мире.



α/α_1 – уровень распространенности/смертности, β/β_1 – возраст-скорректированный уровень распространенности/смертности, относительно возрастного статуса мировой популяции 1990 года

Рисунок 1 – Сравнительный анализ данных по уровню распространенности (А) и смертности (Б) от ИБС в мировой популяции (+40 лет) с 1995 по 2015 год

При более детальном рассмотрении эпидемиологической проблемы ССЗ в разрезе отдельных стран, обнаруживается изменение численных параметров по заболеваемости/распространенности/смертности от ССЗ в довольно широких пределах. Эти флуктуации естественны, исходя из понимания того, что во-первых, мы рассматриваем проблему на более детальном уровне, и учитываем факторы, “господствующие и слагающие” именно этот уровень организации жизни, а, во-вторых, каждая популяция имеет свои эволюционно-исторические особенности развития. Благодаря этим особенностям, выявление каких-либо общих эпидемиологических закономерностей по отдельным странам сопряжено с возникновением ряда трудностей. Например, в силу активных миграционных потоков за последние десятилетия, многие популяции уже не являются исторически/эволюционно однородными. Причем, эта неоднородность может быть весьма значительной и, выделять генетико-функциональные основы предрасположенности к ССЗ, в таких популяциях, задача не простая. Учет этнической составляющей при расчетах, в таких странах, может в какой-то степени минимизировать данный фактор. Возрастные особенности каждой страны так же различны: страны Африканского региона являются более “молодыми” по соотношению возрастных групп (преобладающая 0-40 лет), а в странах, например, Европейского региона преобладающей является возрастная группа старше 40 лет [10] [11]. Доступность медицины, ее качество и возможности, для жителей той или иной страны, разнятся в широких пределах, что вносит определенную необъективность числовых данных по странам с низким и, частично, средним уровнем дохода. Кроме того, следует отметить, что достижения современной медицины в большей степени могут уменьшить скорость смертности от ИБС, чем заболеваемость. И это очевидно, исходя из того арсенала лекарственных средств, хирургических манипуляций и четких протоколов, разработанных и доступных для лечения ИБС. А вот, возможности медицины для предотвращения развития ИБС, по сей день, остаются на нулевом уровне. Причина сложившейся ситуации, как по распространенности/заболеваемости, так и по смертности от ИБС, кроется в недостаточном понимании генетико-функциональных процессов происходящих при инициации и развитии этой патологии. Этот вопрос освещен более подробно в следующих главах.

Таким образом, результаты эпидемиологического обзора показывают, что при постоянстве фонового уровня факторов окружающей среды, определенная часть населения Земли (мировая популяция, возраст старше 40 лет) *a priori* подвержена развитию сердечно-сосудистых патологий. Это означает, что не внешние, а внутренние средовые факторы, то есть генетико-функциональное состояние организма человека более значимо для развития сердечно-сосудистой патологии. И это понятно, поскольку любой живой организм функционирует в течение всей своей жизни под действием факторов окружающей среды, его функциональность и склонность к развитию патологий определяется реакцией индивидуального генотипа на действие внешних

средовых факторов. В случае с ССЗ, для которых определен широкий спектр внешнесредовых факторов риска, изучение разнообразия генетических реакций на их действие весьма актуально для понимания механизмов развития и установления генетических маркеров ССЗ.

1.2 Мультифакторность и полигенность сердечнососудистых заболеваний

Подавляющее большинство сердечнососудистых дисфункций, в том числе и ИБС, принято относить к, так называемым, приобретенным заболеваниям, с возраст-зависимой тенденцией. Они могут включать в себя различного рода сердечные дефекты, ревматические заболевания сердца, болезнь коронарных артерий, инсульт, инфаркт миокарда, атеросклероз и т. д. Происхождение заболеваний может кардинально различаться, но, тем не менее, они имеют общие симптомы, осложнения, последствия и факторы риска. Революционные знания о понимании путей и механизмов развития ССЗ были получены благодаря Фрамингемскому исследованию сердца (Framingham heart study (FHS)). В результате этого исследования, длинной в 70 лет, была постулирована концепция «факторов риска» ИБС, кардинально изменившая подходы к профилактике и лечению ССЗ в целом [12] [13]. Факторы риска - обстоятельства, наличие которых предрасполагает к развитию болезней систем кровообращения: высокое кровяное давление, высокий уровень холестерина в крови, курение, ожирение, диабет и отсутствие адекватной физической активности, уровень триглицеридов в крови и уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), возраст, пол и психосоциальный статус. Результаты последующих за FHS многочисленных исследований, показывают, что эти основные факторы риска имеют место быть во многих популяциях мира. Универсальные для всех расовых и этнических групп, факторы риска воздействуют как правило мультифакторно. По крайней мере, на сегодняшний день, не идентифицировано ни одного случая монофакторного развития ССЗ [14].

Детальному описанию различных факторов риска посвящено множество исследовательских и обзорных статей, книг. Причем, для каждой этнической или расовой группы людей в пределах разных стран, выделяются и активно изучается свой набор главных/основных факторов риска. Некоторые факторы риска, можно частично или полностью контролировать, т.н. модифицируемые факторы риска. Например, высокое артериальное давление; высокий уровень холестерина в крови; курение; диабет; избыточный вес или ожирение; отсутствие физической активности; вредные пищевые привычки и стресс. Другие факторы риска не модифицируемые, влияние которых невозможно устранить или лимитировать: возраст (старение увеличивает риск ИБС); пол (мужчины, как правило, подвержены большему риску ИБС); семейная наследственность и этническая принадлежность.

Существует ряд тяжелых редких наследственных дислипидемий, связанных с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний. Для

разработки оптимальной диагностической и терапевтической стратегии потребуются комплексная оценка фенотипических и генетических факторов. Семейная гиперхолестеринемия - заболевание с аутосомно-доминантным наследованием, вызванное дефектным геном-рецептором холестерина-LDL-гена. Всего в мире описано более 700 мутаций этого гена, но в пределах одной и той же страны встречается значительно меньшее их количество. Болезнь диагностирована у 5-10% пациентов с ранним ИБС (до 55 лет) [15]. Поскольку диагноз уровня холестерина у пациентов с семейной и не семейной гиперхолестеринемией скрещен, предполагается, что генетическое тестирование может сыграть важную диагностическую роль. Из-за высокого риска раннего ИБС при выявлении семейных пациентов с гиперхолестеринемией, начиная с молодого возраста, следует назначать агрессивную терапию статинами и рекомендуемые меры по изменению образа жизни. Также есть уместность каскада генетических тестов у родственников. Семейная комбинированная гиперлипидемия - болезнь, которая обладает полигенным способом наследования и более распространена, чем семейная гиперхолестеринемия [14].

Таким образом, подробный сбор семейной истории является обязательным для всех пациентов с ИБС или другими атеросклеротическими заболеваниями, а также у лиц с высоким риском развития этих заболеваний. Риск ИБС выше, чем ближе степень родства. Он максимален, когда у родственников первой степени (родители, дети, братья и сестры) есть обремененная история, и уменьшается у родственников второй степени (бабушки и дедушки, тети и дяди) и родственников третьей степени (двоюродные братья). Риск ИБС увеличивается с увеличением числа пациентов с ИБС в семье и проявлением ИБС у родственников в раннем возрасте.

ССЗ: от фенотипа к генотипу. Фенотип (из греческого слова phainotip - выясняется) - набор неотъемлемых характеристик человека на определенном этапе развития. Фенотип основан на генотипе, обусловленном факторами окружающей среды. Вклад генетических факторов достаточно прочен; их влияние оценивается с использованием «наследуемости». Таким образом, уровень апопротеинов и липидов на 40-60% зависит от генетических характеристик и уровня липопротеина (а) (Lp (a)) - 90% (то есть образ жизни практически не влияет на уровень). Эксперты проанализировали ряд публикаций, основанных как на эпидемиологических, так и на генетических данных, что позволило сделать вывод о том, что независимая роль Lp (a) в качестве фактора риска ССЗ (его влияние на прочность, сравнимую с эффектом курения) и полиморфизм его гена является мощным генетическим FR. Также в настоящее время получены доказательства умеренной и высокой важности «наследуемости» таких маркеров, как интерлейкин-6, фосфолипаза A2.

В настоящее время наиболее распространенной системой взглядов на развитие ИБС является многофакторная болезнь, вызванная сложным взаимодействием различных генетических факторов и факторов окружающей среды. Длительный латентный период, время клинического проявления, ход и

прогноз такого заболевания во многом зависят от экологических и генетических факторов. Комплексный механизм клинического фенотипа заболевания связан с большим количеством генов, участвующих в патогенезе. Из 40000 генов, представленных в геноме человека, более половины уникальных генов (>25000) выражены в сердечно-сосудистой системе [15]. На основе современных представлений о патофизиологических механизмах ИБС выделяется группа генов, нарушение структуры и функционирования которых может способствовать патогенезу ИБС. Гены, определяющие физиологическую признаку, и, следовательно, полиморфизм которых может увеличить риск заболевания, называются генами-кандидатами. Они представляют собой гены системы ренин-ангиотензин-альдостерона (РААС), антиоксидантную систему (АОС), ионные каналы, эндотелины, аполипопротеины пути калликрейна кинина и ферменты метаболизма липидов и углеводов, молекулы адгезии, факторы роста и гормоны, тромбоксаны, простагландины и другие. В настоящее время широко распространенный ассоциативный метод исследования основан на формировании достаточно больших групп «случая» и «контроля» и сравнении частотного распределения аллельных вариантов полиморфных локусов у индивидуумов с различными фенотипами. Одним из наиболее изученных генов-кандидатов ИБС является ген ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ). В настоящее время описано более 10 полиморфных вариантов гена АСЕ [16]. Полиморфизм I/D используется в качестве маркера для изучения роли гена АСЕ в определении риска многофакторных заболеваний. Отличительной особенностью АСЕ является то, что она играет ключевую роль в многочисленных физиологических и патологических реакциях в организме человека. Списки потенциальных генов болезни могут включать десятки или сотни. Также, в последние годы, большое внимание уделяется генам антиоксидантной системы ферментов: супероксиддисмутазы (SOD), глутатионпероксидазы (GPX), каталазы (CAT) и параоксоназы (PON). В то же время, активность ферментов эволюционно и генетически запрограммирована для оптимизации баланса окислительных процессов и активности систем антиоксидантной защиты.

1.3 Атеросклероз и ишемическая болезнь сердца

Атеросклероз - хроническое очаговое заболевание артерий, характеризующееся отложением и накоплением липидсодержащих белков и доставленным ими холестерином в интимальном слое сосуда. Заболевание сопровождается ростом соединительной ткани и образованием, так называемых, атеросклеротических бляшек, которые перекрывают просвет артерии и вызывают хроническую недостаточность кровоснабжения организма. Сосудистые стенки, пораженные рассеянным склерозом, теряют особую им эластичность. Склерозированные сосуды замедляют кровоток, приводя к кислородной недостаточности органов и тканей и накоплению продуктов метаболизма [7], [8], [9].

Исходным пунктом атеросклероза являются липидные пятна/полоски в интиме сосудов, без видимых признаков воспалительных реакций. Липидные пятна представляют собой участки небольшого размера (до 1,0-1,5 мм) на поверхности аорты и крупных артериях, которые имеют желтоватый цвет. Липидные пятна состоят в основном из пенистых клеток, содержащих большое количество липидов и небольшого количества Т-лимфоцитов. В небольших количествах они также представлены в макрофагах и клетках гладкой мускулатуры. Со временем липидные пятна увеличиваются в размере и сливаются друг с другом, а затем образуют так называемые липидные полосы, слегка поднимающиеся над поверхностью эндотелия. Они также состоят из макрофагов, лимфоцитов, гладких мышц и пенистых клеток, содержащих липиды. На этом этапе липопротеины низкой плотности (ЛПНП) по непонятным пока причинам накапливаются в эндотелии и подвергаются окислительной модификации, что приводит к окислению ЛПНП (окЛПНП). ОкЛПНП стимулируют эндотелиальные клетки экспрессировать молекулы адгезии (молекулу адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), Р-селектин) и различные воспалительные хемокины (например, моноцитарный хемоаттрактант-белок-1 (MCP-1), интерлейкин 8). Это приводит к активации моноцитов и их трансмиграции в интиму, где они дифференцируются в проатерогенные макрофаги [12].

Липидные пятна и полосы образованы липидными отложениями в интиме артерий. Первым элементом этого процесса является эндотелиальное повреждение и появление эндотелиальной дисфункции, сопровождающееся повышенной проницаемостью барьера, что, в свою очередь, может вызвать воспалительный ответ.

В результате эндотелиальных поражений образуется эндотелиальная дисфункция, которая проявляется в снижении производства сосудорасширяющих факторов (простациклин, оксид азота и т. д.) И повышенное образование сосудосуживающих веществ (эндотелин, АП, тромбоксан А2 и т. д.), Что еще больше разрушает эндотелий и усиливает его проницаемость. ЛПНП и липопротеин (а), вместе с моноцитами, лимфоцитами входят в интиму артерии и подвергаются перекисному окислению или гликозилированию (модификации), что способствует дальнейшему повреждению эндотелия и облегчает миграцию из кровотока в интиму артерий клеточных элементов.

Моноциты, проникшие в интиму, превращаются в макрофаги, которые с помощью определенных рецепторов поглощают модифицированный ЛПНП и накапливают свободный и эстерифицированный холестерин. Макрофаги, перегруженные липидами, трансформируются в пенистые клетки. Пенистые клетки и тромбоциты, проникающие в интиму сосуда, секретируют факторы роста и митогены, действующие на гладкомышечные клетки (ГМК). Под действием факторов роста и митогенов ГМК мигрируют к интиме и начинают размножаться. Будучи в интиме, они захватывают и накапливают модифицированный ЛПНП, также превращаясь в пенистые клетки. Кроме того,

ГМК приобретают способность самостоятельно создавать компоненты соединительной ткани (коллаген, эластин и гликозаминогликаны), которые затем используются для построения волокнистого скелета атеросклеротической бляшки. Со временем пенные клетки подвергаются апоптозу. В результате липиды входят во внеклеточное пространство, где подвергаются окислению.

Как видно из всего выше сказанного, основополагающей причиной ИБС является атеросклероз. Биохимия атеросклероза предрасполагает бурное развитие окислительно-восстановительных реакций. Однако, об этом подробнее будет освещено в следующей главе.

1.4 Роль окислительного стресса в инициации и развитии ишемической болезни сердца

В середине 1950-х годов, были выдвинуты первые предположения об участии в патофизиологии ряда заболеваний, свободных радикалов. Однако, исследования в этой области продвигались медленно, в силу химической нестабильности свободных радикалов и технической сложности их обнаружения. Только, начиная с 1980-х годов исследование биохимии свободных радикалов позволило выявить их решающую физиологическую роль не только при различных заболеваниях, но и в нормальном клеточном гомеостазе [16].

Эти разнообразные химически активные молекулы, производные молекулярного кислорода, условно называют активными формами кислорода (АФК). АФК могут включать свободные радикалы (супероксид анион O_2^- и гидроксильный радикал OH^\cdot) и другие АФК не радикальной природы (пероксид водорода H_2O_2). Кроме того, активные формы азота, также являются производными молекулярного кислорода, и могут быть отнесены к АФК ионной (пероксинитрит $ONOO^-$) и не ионной природы (оксид азота NO^\cdot) [17]. Свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью из-за наличия неспаренных электронов на внешнем орбитальном уровне, однако их активность различается в зависимости от химического строения их молекул. Другие формы АФК не радикальной природы не имеют свободных электронов, а потому проявляют более слабые свойства окислителя. Так, например, H_2O_2 не имеет свободных валентных электронов, но имеет не поделённые электронные пары в молекуле, между атомами кислорода и водорода, а потому способен проявлять свойства окислителя, хотя и более слабого чем O_2 .

АФК вступают в химические реакции по цепному механизму, когда из одной реакционной молекулы, в геометрической прогрессии, образуются остальные производные АФК. Например, реакции свободных радикалов и жирных кислот (полиненасыщенных жирных кислот, ПНЖК) в цитоплазматической мембране приводят к перекисному радикалу жирной кислоты, который может атаковать соседнюю боковую цепь жирной кислоты и запускать образование других липидных радикалов. Липидные радикалы, образующиеся в этой цепной реакции, собираются в плазматической мембране

и могут оказывать многостороннее влияние на функцию клетки, включая изменение проницаемости клеточной мембраны и дисфункцию мембраносвязанных рецепторов.

Обобщая все выше изложенное, поддержание нормальной концентрации АФК в клетках жизненно важно для правильной физиологической функции многих типов клеток, по всему организму. Избыточное производство или снижение поглощения АФК может быть вовлечено в патогенез различных заболеваний, таких как нейродегенерация, рак, гипертония, атеросклероз и другие воспалительные состояния.

Сердечнососудистые заболевания тесно связаны с окислительным стрессом. Окисление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), эндотелиальная дисфункция, воспалительные процессы являются потенциальными источниками АФК и АФА и, в какой-то степени, обуславливать ход развития болезней систем кровообращения. Кроме того, различные состояния, предрасполагающие к развитию ССЗ, такие как, резистентность к инсулину, метаболический синдром и ожирение, характеризуются перепроизводством АФК и избыточным окислительным стрессом [18] [19].

Наиболее важными АФК и АФА в сердечнососудистой системе выступают O_2^- , H_2O_2 , $OONO^-$ и OH^- [20].

Большинство ССЗ является прямым следствием атеросклероза. Атеросклероз включает захват ЛПНП в стенке артерии и воспалительный ответ на пул интимальных ЛПНП, усиливающийся в местах поврежденного эндотелия. Можно сказать, что атеросклероз, в общих чертах, включает три патогенетических звена: окисление ЛПНП, развивающуюся эндотелиальную дисфункцию и воспаление в интимальном слое сосудистой стенки [21] [22]. Все эти три особенности атеросклероза связаны с АФК в их патофизиологии [23].

Окисление ЛПНП является хорошо изученным явлением при атеросклерозе. Было предложено несколько ферментных систем, способствующих окислению ЛПНП *in vivo*. Наиболее общепризнанной системой является АФК-опосредованное окисление ЛПНП *in vivo*, NADPH-оксидазами и митохондриями. NADPH/NADH-оксидазы (Nox) локализируются на клеточной мембране полиморфноядерных клеток, макрофагов и эндотелиальных клеток и являются главными источниками генерации O_2^- при воспалении. Атеросклеротические коронарные артерии человека содержат повышенное иммунное окрашивание p22phox, НАДФН-оксидазной субъединицы [24]. Этот белок в основном связан с NADPH-оксидазой 2 (Nox2) в пораженных макрофагах, а уровень экспрессии p22phox положительно связан с тяжестью атеросклероза [25]. Исследования на животных с использованием модели АроЕ-нулевого атеросклероза показывают, что у мышей, у которых отсутствует изоформа Nox2, наблюдается снижение поражений на 50%, наряду с заметным снижением продукции АФК в аорте, что позволяет предположить, что ингибирование Nox2 NADPH-оксидазы может ограничивать атеросклероз [26]. У людей, коронарные артерии с атеросклерозом демонстрируют

повышенный уровень экспрессии и активности других изоформ NADPH-оксидазы – Nox1, Nox4 и Nox5. Эти оксидазы могут также вносить вклад в пул АФК кровеносных сосудов, при инициации развития сосудистой дисфункции, атеросклероза, гипертензии и диабета, поскольку регистрируются на ранних стадиях заболеваний [27] [25] [28]. Однако, исследования на мышах, показывают разную динамику функциональной активности изоформ Nox, в разных возрастных группах [29] [26] [30]. Кроме того, если для Nox2, Nox1 и Nox5 четко установлена стимуляция эндотелиальной дисфункции, воспаления и запрограммированной гибели клеток; то, для Nox4, прослеживается защитная функция сосудистой стенки при атеросклерозе, за счет увеличения биодоступности NO и остановки путей гибели клеток [31]. Хотя, при хронической гипертензии, T. Akasaki et al., показали увеличение эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с повышенной экспрессией Nox1 и Nox4 [32]. Постоянная активация NADPH-оксидаз иммунных клеток приводит, впоследствии, к разобщению процессов синтеза эндотелиального eNOS, создавая тем самым дополнительный источник производства O_2^- и приводя к порочному кругу генерации АФК. Активация молекул адгезии (VCAM-1, E-селектин, P-селектин и ICAM-1) [33] в местах с нарушенной структурой интимы сосуда, также являются источниками АФК и дополнительно усиливают синтез цитокинов, таких как интерлейкины, TNF- α , Ang II и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Дополнительная трансмиграция лейкоцитов и их макрофагальная трансформация, способствуют еще большей генерации АФК, и окислению ЛПНП [34] [35].

Существует и так называемый, митохондриальный пул АФК, который вовлечен во многие хронические заболевания, включая и атеросклероз. Новые данные, в настоящее время, связывают митохондриальные АФК с контролем воспаления. Например, митохондриальные АФК важны для передачи сигналов о событиях, критических для врожденного иммунитета [36] и активации мультибелковой инфламасоммы NLRP3 [37], которая, как известно, способствует атеросклерозу как животных, так и человека [38].

Развивающийся оксидативный стресс при атеросклерозе, приводит к эндотелиальной дисфункции, при которой, баланс между продукцией вазодилатирующих и сосудосуживающих веществ нарушен. В последствии, в условиях эндотелиальной дисфункции, эндотелиальные клетки (ЭК) становятся источником генерации АФК. Окисление кофактора eNOS, (6R)5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (BH4), в условиях окислительного стресса, равно как и истощение запасов L-аргинина, за счет трансформации в метиларгинин, приводит к нефункциональности NO^- синтезирующей «машины». Неиспользованные для синтеза NO^- , молекулы O_2^- и являются дополнительным источником генерации окислительного стресса в ЭК [39].

Еще одним фактором, способствующим повреждению сосудистой системы и гиперпродукции АФК, является гипертоническая болезнь. Гипертония является важным фактором риска повреждения сосудов и развития атеросклероза. Она, также, приводит к гипертрофии левого желудочка и

сердечной недостаточности. Клинические исследования показывают, что ингибирование системы ренин-ангиотензин-альдостерон (РААС), имеет первостепенное значение в прогрессии гипертонии у пациентов [40]. Одной из возможных причин ингибирования системы РААС является снижение окислительного стресса и дисфункциональной передачи сигналов АФК. Например, активация системы РААС в модельных системах увеличивают экспрессию некоторых изоформ оксидазы NADPH, таких как Nox1 и Nox2, и субъединиц p22phox, p47phox и p67phox [41] [42] [43]. Генетические мышинные модели анализировали специфические последствия изоформ НАДФН-оксидазы. У животных без белка Nox1 развивается меньшая артериальная гипертония при инфузии ангиотензина II [44], но наблюдается такая же патологическая артериальная медиальная гипертрофия, что и у животных дикого типа [45]. Напротив, Nox2, по-видимому, не влияет на реакцию артериального давления на ангиотензин II, но предотвращает патологические события, такие как вызванная РААС медиальная гипертрофия. РААС также имеет значение для сосудистого воспаления, поскольку инфузия ангиотензина рекрутирует воспалительные клетки, особенно Т-клетки, в сосудистую адвентицию. Адвентициальные Т-клетки и их продуцируемые АФК, связаны с патофизиологией гипертонии, поскольку адоптивный перенос Т-клеток, без функциональной НАДФН-оксидазы, предотвращает индуцированную ангиотензином II гипертонию [46]. Таким образом, в модельных системах, окислительный стресс в виде НАДФН-оксидаз играет критическую роль в патофизиологии гипертонии. Эти данные еще не достигли полной оценки в исследованиях на людях, так как в ранних отчетах исследований на людях, использующих общегеномные стратегии ассоциации, еще не было выявлено каких-либо локусов гена NADPH-оксидазы с артериальной гипертонией.

При гипертонии, источником дополнительного пула АФК, может быть и комплекс митохондриальной дыхательной цепи. Эксперименты по индукции гипертонии, вызванной избыточным потреблением соли, на мышах, показали антигипертензивный эффект ингибиторов митохондриальных комплексов дыхательной цепи I и III, и митохондриальной супероксиддисмутазы (SOD2) [47]. Точно так же было показано, что антиоксидантные препараты, нацеленные на митохондрии, а так же, антиоксиданты, эндогенно экспрессируемые в митохондриях, ослабляют индуцированную ангиотензином II гипертонию [48] [49].

Обращает на себя внимание, выдвинутая концепция о двусторонней связи между NADPH-оксидазой и митохондриями при гипертонии. АФК, генерируемые эндотелиальной НАДФН-оксидазой, участвуют в патогенезе гипертонии, через индукцию митохондриальной дисфункции [50]. Также, представляется возможным и обратный путь, когда митохондрии оказывают влияние на активность системы NADPH-оксидазы. Применение ангиотензина, в модельных системах животных, вызывает повышенное образование митохондриального супероксида, что приводит к активации NADPH-оксидазы. Последующее лечение антиоксидантами, нацеленными на митохондрии, или

избыток митохондриальных АФК, ограничивает клеточную активность NADPH-оксидазы и снижает клинические и биохимические проявления ангиотензин-индуцированной гипертензии [51]. Таким образом, новые данные указывают на то, что и митохондрии, и НАДФН-оксидазы являются важными источниками АФК при гипертензии и могут представлять собой патологический механизм прямой связи. Эти данные подтверждают предположение, что прерывание такого порочного цикла производства АФК, «катализируемого» РААС, может иметь терапевтическую ценность в будущем.

Как видно из вышеизложенного, АФК и АФА играют существенную роль в инициации и прогрессии сердечнососудистых патологий. Но, в то же время, образование их невозможно в силу физических, кинетических и биохимических особенностей существования каталитических путей. Однако, несмотря на это, клеточный окислительно-восстановительный потенциал поддерживается на относительно постоянном уровне посредством мощных систем антиоксидантных белковых комплексов, которые инактивируют и удаляют АФК, прежде чем они направят свою разрушительную активность на клеточные компоненты [52].

1.5 Антиоксидантная защита сердечнососудистой системы

Баланс окислительно-восстановительного потенциала в организме, при нормальных и патологических условиях, обеспечивается работой многокомпонентной системы антиоксидантных ферментов (АОФ) и химических веществ, обладающих антиоксидантными свойствами (АОВ). АОФ принадлежат к, так называемым, дегидрогеназам или оксидоредуктазам. Все представители оксидоредуктаз – белковые молекулы, зачастую, образующие сложные, пространственно-временные надмолекулярные комплексы. Однако, не смотря на сложность организации этих структур, все они выступают в роли катализаторов общей реакции переноса электронов от одной молекулы на другую. При этом, первая молекула отдает электроны (донор) и восстанавливается, а вторая принимает электроны (акцептор) и окисляется. Специфичность действия оксидоредуктаз определяется, в первую очередь, природой донора, которая определяет природу каталитического центра фермента.

К АОВ могут относиться мочевиная кислота [53], кофермент Q, витамин E, витамин C, β -каротин и другие каротиноиды, а также селен. Антиоксидантные свойства данных веществ, связаны с наличием в их химической структуре циклического и/или гетероциклического основания и боковых кетон- или гидроксильных групп. Благодаря системе сопряжения π -электронов в циклической составляющей антиоксидантных веществ, реакционно активные кетон- и гидроксигруппы легко вступают в реакции восстановления, без участия катализаторов, способствуя, таким образом, нейтрализации свободных радикалов, независимо от химической природы. Основные антиоксиданты приведены в Таблице 1.

АОФ и АОВ, формируют целую многокомпонентную пространственно-временную сеть биохимических реакций, участвующих в поддержании постоянного окислительно-восстановительного потенциала в любой точке организма. Конечной целью слаженной работы по «детоксикации» свободных радикалов, осуществляемое всеми антиоксидантами, является их восстановление до реакционно нейтральной воды. При этом, если АОФ не претерпевают каких-либо структурных изменений, то остальные, окисляются до неактивных форм и нуждаются в других ферментах и веществах для их восстановления и повторного использования. По сути, каждая клетка организма обладает одинаковым набором антиоксидантной защиты, однако, логично предположить, что характер активации и функционирования этого «набора» антиоксидантов будет определяться из специфики самой ткани, выполняемыми ею функциями, прилежащего микроокружения, кровоснабжения, биодоступности нутриентов для организма и т.п.

Таблица 1 – Наиболее распространенные АОФ и АОВ в клетке

Антиоксидантные ферменты	Катализируемая реакция	Локализация
Супероксиддисмутаза (СОД, SOD)		
Cu/Zn-SOD (SOD1/SOD3)	$2O_2^- + 2H^+ = 2H_2O_2 + O_2$	Цитоплазма, клеточная поверхность, межклеточное пространство
Mn-SOD (SOD2)		
Каталаза (CAT)	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Пероксисомы, митохондрии
Глутатион пероксидазы (GPx)		
GPx1, GPx4	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$	Цитоплазма Межклеточное пространство, кровь
GPx3		
Вещества с антиоксидантными свойствами	Функция	Локализация
Глутатион (окисленный)	Внутриклеточный восстановитель для GR и GST	Цитоплазма, митохондрии, пероксисомы, хлоропласты, вакуоли

Особенности функционирования антиоксидантной защиты сердечнососудистой системы, определяются ее функцией по циркуляции крови. Кровь, как известно, представляет собой соединительную ткань сложного состава и, потенциально, уже содержит свободные радикалы и другие продукты окисления компонентов клеток. В особенности, повышенный уровень АФК отмечается при многих сердечнососудистых патологиях, сопровождающихся системным воспалением – атеросклероз, гипертония, инфаркт миокарда, сахарный диабет [54]. Циркулирующие с кровью АФК, могут

взаимодействовать с другими клеточными компонентами – эритроцитами, эндотелиальными клетками, а так же с липопротеинами крови (ЛП). Согласно литературным данным, каких-либо специализированных клеточных популяций, синтезирующих антиоксидантные ферменты или вещества, для защиты компонентов крови от АФК, обнаружено не было. Поэтому, логично предположить, что каждый клеточный элемент крови имеет свой специфический набор АОФ и АОВ, активируемый при непосредственном взаимодействии с АФК. Так, например, эритроциты, в норме, имеют повышенный уровень синтеза внутриклеточного глутатиона (GSH), по сравнению с другими тканями (второй уровень после печени). Высокая концентрация глутатиона, способствует стабилизации большого количества, кислород содержащих молекул гемоглобина, от «случайного» окисления [55]. При атеросклерозе, инфаркте миокарда, гипертонии и диабете, отмечен повышенный уровень окисления глутатиона (GSSG) и, соответственно, синтеза GSH в эритроцитах. Поэтому, отношение восстановленного GSH/окисленного GSSG глутатиона в эритроцитах, является обще используемым параметром контроля окислительного стресса при сердечнососудистых заболеваниях, и состояниях предрасполагающих к ним. Кроме того, пул восстановленного GSH, поддерживает в функциональном состоянии и другие антиоксиданты – семейство белков глутатион пероксидаз (GPx).

Исследования *in vitro* показали, что защитная функция эритроцитарного GSH, может распространяться и на эндотелиальные клетки сосудов [56]. Механизм такого действия, связан с активным импортом молекул экзогенного супероксида в цитоплазму эритроцитов, через анионные каналы на мембране [57]. Улавливая свободные радикалы, циркулирующие в кровяном русле, эритроциты помогают снизить общий уровень окислительного потенциала, и тем самым нагрузку на редокс-чувствительный эндотелий. Как было показано выше, эндотелиальные клетки высокочувствительны к изменениям окислительно-восстановительного потенциала внеклеточной среды [58]. Такая чувствительность обусловлена тем, что вазодилатационные функции эндотелия основаны на генерации паракринных факторов, обладающих высокой реакционной активностью – свободнорадикального оксида азота NO⁻, простаглицина PGI₂, брадикинина, натрийуретического пептида С-типа, эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF). Поэтому, эндотелиальные клетки активируют ряд АОФ при разрушении этих веществ, в условиях окислительного стресса. Так, например, функционально важным для клеток эндотелия является активность ферментов супероксид дисмутаза (CuZnSOD, SOD1), цитоплазматической глутатион пероксидазы (GPX1) и каталазы. Эти АОФ активно экспрессируются в сосудистой стенке [59], а их недостаточность связана с развитием эндотелиальной дисфункции и воспаления [60] [61]. Кроме того, эндотелиальные клетки активно используют для нейтрализации окисленных паракринных факторов, экзогенные антиоксидантные вещества – в первую очередь витамин Е, А и β-каротин. Данному вопросу посвящено большое количество исследований, основанных

как на экспериментальных животных моделях [62] [63], так и клинических, с участием человека [64] [65][66]. Однако, данный вопрос, нельзя считать полностью решенным и однозначным. Имеющиеся исследования, хоть и доказывают несомненное участие антиоксидантных веществ в роли «помощников» эндотелиальных клеток для уменьшения окислительного стресса при различных патологиях сердечнососудистой системы и воздействия предрасполагающих факторов (курение, образ жизни, питание), все же, до конца, многие механизмы их воздействия не ясны, а потому, их антиоксидантная результативность и клиническое применение зачастую имеет противоречивые результаты.

Гладкомышечные клетки (ГМК) интимального слоя сосудов, в нормальных условиях, экспрессируют свой «базовый» уровень внеклеточной (EC-SOD, SOD3) и цитоплазматической (MnSOD, SOD2) супероксиддисмутаза, который на порядок выше других клеток. При этом, EC-SOD экспрессируется в межклеточное пространство, по-видимому, защищая все остальные элементы сосудистой стенки от супероксидного радикала, при «физиологическом» транспорте молекул O_2 к близлежащим тканям. «Тесное соседство» молекул O_2 и NO^- , в толще сосудистой стенки, делает этот внеклеточный вариант дисмутаза весьма актуальным для поддержания нормальных дилатационных свойств оксида азота и общего сосудистого гомеостаза [67]. Кatalаза (CAT) и глутатион пероксидаза 1 (GPX1) показывают фоновый уровень экспрессии в ГМК, который, по-видимому, не несет «интересных» моментов в нормальных условиях. Понятно, что в условиях воспаления и усиленной генерации АФК активированными макрофагами, происходит изменение общей экспрессионной картины антиоксидантных ферментов. Так, на начальных стадиях развития атеросклероза, экспрессионная активность EC-SOD усиливается еще больше, однако на более поздних стадиях эта активность заметно падает. Это, с одной стороны, говорит о его принципиальной важности в предупреждении распространения окислительных цепных реакций. С другой стороны, это указывает на ограниченность его защитных «пономочий», на более поздних стадиях, посредством изменения молекулярно-биохимических путей. Однако, детальность данной репрессии изучена не до конца [68]. Внутриклеточная антиоксидантность ферментов CAT и GPX1, так же, при атеросклерозе становится весьма важным компонентом прогрессии, о чем говорят исследования по их не полноценной/отсутствующей экспрессии [69].

Как видно из всего выше сказанного, наибольший вклад в антиоксидантную защиту эндотелия и сосудистой стенки, пораженной атеросклерозом, вносят SOD3 и глутатионовая система. Эти ферменты, а так же их молекулярные механизмы, рассмотрены в следующих главах.

1.6 Супероксиддисмутазная антиоксидантная ферментная система

1.6.1 Внеклеточная Супероксид Дисмутаза SOD3 (EC-SOD)

Окислительный стресс при ИБС увеличивает вероятность химической модификации нативных липидных частиц (ЛПНП, ЛПВП, ЛП) крови, с

образованием гидроперекисей липидов, повреждения чувствительного эндотелия, формирования атеросклеротических изменений интимального слоя сосудистой стенки и повышенной агрегации тромбоцитов. Одним из наиболее ярких проявлений повреждающего действия супероксид аниона в сердечнососудистой системе, является инактивация эндотелиального оксида азота (NO) в интимальном слое сосудов. Инактивация этого важнейшего фактора, уменьшает со временем его биодоступность и, как следствие, нарушение вазодилатационных и гемодинамических свойств сосудистой стенки. В то же время, смещение окислительно-восстановительного потенциала и генерация пероксинитрита (ONOO-) в сосудах, активирует ряд основных антиоксидантных ферментов, среди которых на первое место выступает внеклеточная форма супероксид дисмутазы (SOD3).

1.6.2 Ген *SOD3*, полиморфизм гена и риск развития сердечнососудистых заболеваний

Первичную антиоксидантную защиту в сосудистой стенке осуществляет изоформа внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3 или EC-SOD). Благодаря своему месту локализации и сродству к гепарансульфатному компоненту внеклеточного матрикса (ВКМ), SOD3 является, таким образом, первичным регулятором окислительной инактивации и биодоступности эндотелиального NO. Показана важная роль этого фермента при различных патологиях сердечнососудистой системы (гипертензия, реперфузия миокарда, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз) в условиях окислительного стресса [70] [71].

Ген, кодирующий SOD3, расположен на коротком плече 4 хромосомы и содержит три экзона и два интрона. Основная кодирующая часть гена расположена в пределах третьего экзона. Для гена было идентифицировано несколько однонуклеотидных замен (SNP) в экзонных областях, ведущих к замене аминокислотных остатков в белке SOD3. Так, например, наиболее часто встречаемая транзиция пуриновых оснований G на A в позиции 172 п.н., ведущая к замещению аминокислоты аланина (Ala) на треонин (Thr) – Ala58Thr [72]. Функциональная роль данного полиморфизма в настоящее время остается не до конца изученной, ассоциативные исследования с развитием сердечнососудистых патологий противоречивы и требуют дальнейшего исследования на различных популяциях.

1.7 Глутатионовая антиоксидантная ферментная система

1.7.1 Сера и Глутатион GSH

Сера – химический элемент с символом (S), является широко распространенным в природе и многовалентным неметаллом. Сера является важным элементом для всего биологического царства, за счет его включения в белки и другие биомолекулы [73] [74]. Четыре распространенные серосодержащие аминокислоты – метионин, цистеин, гомоцистеин и таурин. Среди них, только метионин и цистеин входят в число двадцати канонических аминокислот, которые включены в белки. Серосодержащими аминокислотами

более богаты белки животных и зерновых, чем белки бобовых. При этом, соотношение метионина и цистеина в животных белках оказывается выше, чем в растительных источниках [75].

Сера является неотъемлемой частью многих ферментов и антиоксидантных молекул, таких как, глутатион и тиоредоксин. Некоторые серосодержащие соединения могут эффективно образовывать линию защиты от активных форм кислорода и азота [76]. Они хорошо известны при лечении патологических нарушений, вызванных окислительным стрессом [77]. Дисульфидные связи, обычно характерны для белков, которые локализованы во внеклеточной среде или на поверхности клетки. Эти дисульфидные связи возникают из-за окислительных условий во внеклеточной среде. Однако во внутриклеточной среде восстанавливающие условия сохраняются, а дисульфидные связи отсутствуют. Есть ряд белков, которые отвечают за поддержание этой восстановительной среды, и они включают глутатион, тиоредоксин и глутаредоксин [78].

Глутатион (GSH) представляет собой трипептид L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин и имеет молекулярную массу 307 г / моль [79]. Структура глутатиона показана на Рисунке 2. Уникальная пептидная γ-связь защищает трипептид от разрушения аминопептидазами. GSH присутствует в различных формах, включая глутатион дисульфид (GSSG), который образуется в результате окисления, и смешанный тип глутатиона GSSR, которые представляют собой глутатион-цистеинил дисульфиды [79] [80]. Основная часть GSH обнаружена в цитозоле (80-85%) и, с меньшей концентрацией, встречается в митохондриях и эндоплазматической сети эукариотических клеток. Система GSH является одной из основных тиолзависимых антиоксидантных систем в клетках млекопитающих, и в то же время GSH является наиболее распространенным небелковым тиолом в клетках млекопитающих. Как GSH, так и GSSG действуют совместно с другими окислительно-восстановительными соединениями, например, NADPH, чтобы помочь в регуляции и поддержании клеточного окислительно-восстановительного статуса, и предполагаемый окислительно-восстановительный потенциал для пары GSH/GSSG, который в большинстве клеток и тканей находится в диапазоне от -260 мВ до -150 мВ [81].

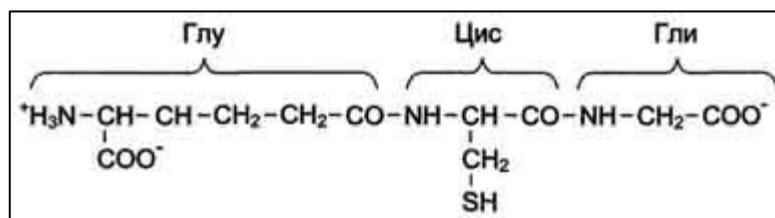


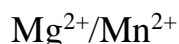
Рисунок 2 – Структура глутатиона

Скорость синтеза глутатиона снижается с возрастом, и пониженный синтез GSH был обнаружен при таких заболеваниях, как диабет, муковисцидоз

и различные заболевания печени. Снижение синтеза GSH происходит в результате снижения экспрессии синтетических ферментов. В некоторых случаях, полиморфизмы различных субъединиц биосинтетических ферментов могут снижать синтез GSH за счет снижения активности синтетических ферментов. Поскольку GSH участвует в удалении активных форм кислорода (ROS) из клеток, снижение выработки GSH приведет к накоплению ROS в клетке. АФК может вызывать повреждение ДНК, белка и мембран, таким образом, снижение экспрессии GSH связано с атеросклерозом, ВИЧ, некоторыми видами рака и ревматоидным артритом [82]. Однако, увеличение производства GSH связано с лекарственной и радиационной устойчивостью в лечении некоторых видов рака и его прогрессию [83] [84]. Важно отметить, что хотя большинство клеток обладают способностью к биосинтезу GSH *de novo*, GSH может транспортироваться из печени в кровь, для использования другими органами организма, и в желчь, для желудочно-кишечной системы. Клеточный гомеостаз GSH регулируется скоростью синтеза, деградаци и экспорта GSH из клетки [85].

1.7.2 Регуляция синтеза глутатиона

GSH-биосинтетическая активность различных клеток млекопитающих осуществляется в цитоплазме. Даже эритроциты, теряющие не только все субклеточные частицы, но и большинство метаболических процессов по мере созревания, не являются исключением. Синтез GSH протекает посредством двух реакций:



- 1) L-глутамат + L-цистеин + АТФ → γ -глутамил-L-цистеин + АДФ + Pi,
- 2) γ -глутамил-L-цистеин + L-глицин + АТФ → GSH + АДФ + Pi.

Первая реакция катализируется ферментом γ -глутамилцистеинсинтетазой (GCL). Этот фермент, в свою очередь, состоит из тяжелой каталитической субъединицы ($M_r \approx 73$ kDa) и легкой регулирующей субъединицы ($M_r \approx 30$ kDa), которые кодируются разными генами, *GCLC* и *GCLM* соответственно [86] [87]. Скорость первой реакции, в основном, определяется *a)* активностью фермента GCL и *б)* биодоступностью внутриклеточного цистеина. Субстратная активность GCL фермента регулируется посредством обратной связи, которая включает конкурентное неаллостерическое взаимодействие GSH с каталитической субъединицей GCL. Активность GCL может, так же, определяться его биодоступностью или скоростью синтеза. GCL – редокс-чувствительный фермент, субъединицы которого активно транскрибируются посредством АФК и транскрипционных факторов стресса, таких как Nrf2 [88], Maf G/F/K, c-Jun [89], c-Myc [90], AP-1/2 [91]. Для промоторной области генов *GCLC* и *GCLM* отмечено влияние генетических вариаций на активность транскрипции двух субъединиц GCL [92][93].

Вторым фактором, определяющим скорость синтеза GSH, является наличие цистеина в клетке. Цистеин, обычно, поступает с пищей, через

гидролиз белков, а в печени - из метионина, через путь транссульфурации. Однако, внутриклеточная концентрация цистеина низкая ($\approx 1-3$ mM), по сравнению с пулом доступного внутриклеточного GSH ($\approx 3-10$ mM). Цистеин в высокой концентрации, токсичен для клеток, а потому клетка не имеет внутриклеточных запасов этой аминокислоты для синтеза глутатиона. Единственным источником внутриклеточного цистеина в режиме «он-лайн», который необходим для синтеза GSH, служит цистеин, находящийся во внеклеточной среде. Внеклеточный цистеин, почти всегда, находится в окисленном состоянии (цистин). Цистин поглощается клетками и быстро восстанавливается в цистеин, либо внутриклеточным GSH через образование смешанного дисульфидного интермедиата, либо тиоредоксинредуктазой 1 (TRR1) [94]. Ключевым фактором, регулирующим биодоступность цистеина в клетках является активный мембраносвязанный транспорт цистеина, цистина и метионина. На данный момент известно три типа различных транспортных систем: система x^-_c [95], система X^-_{AG} [96], система X_{AG} [95]. Каждая из этих систем имеет свои характерные особенности активации, функционирования, скорости и регуляции в зависимости от типа клеток.

Таким образом, регуляция синтеза GSH в клетке сложна и может включать «горячие точки» лимитирующие скорость синтетической реакции на различных уровнях клеточного метаболизма, начиная от генов и, до биохимических реакций «он-лайн».

1.7.3 Гены *GCLC* и *GCLM*, полиморфизм генов и риск развития сердечнососудистых заболеваний

Гены *GCLC* и *GCLM* человека, расположены на разных хромосомах (6p12 и 1 p22.1 у человека для *GCLC* и *GCLM* соответственно). Ген *GCLC* состоит из 16 экзонов и охватывает приблизительно 48 т.п.н. последовательности ДНК, тогда как *GCLM* состоит из 7 экзонов, простирающихся на 22 т.п.н. Кодированные области этих генов высоко консервативны среди эукариот, демонстрируя лишь небольшие различия в аминокислотной последовательности среди видов млекопитающих (например, аминокислотная последовательность гена *GCLC* человека на 97,6% аналогична последовательности гена *GCLC* мыши; а аминокислотная последовательность гена *GCLM* человека составляет 98,2 % аналогичной последовательности гена *GCLM* мыши).

Транс-действующие регуляторные транскрипционные факторы, которые, как известно, взаимодействуют с промоторами этих генов, включают членов семейства транскрипционных факторов Nrf2, а также AP1, AP3, NF κ B, белки семейства Maf, JunD, Fra, CREB и другие.

Было выявлено несколько SNP для промоторов генов *GCLC* и *GCLM*, которые могут быть связаны с развитием сердечно-сосудистых заболеваний в исследованиях случай-контроль. Два полиморфизма, в промоторе гена *GCLM* - 588C / T и промоторе гена *GCLC* -129C / T, были обнаружены в 2002 и 2003 годах Nakamura et al. [10] и Koide et al.

1.7.4 Селен и глутатионпероксидазы GPX (GSH-Px)

Селен (Se) – важный и необходимый микроэлемент для живых организмов. Начиная с 1950 г., селен стал активно использоваться при лечении многих болезней, сопровождающихся дефицитом питательных веществ, и способствуя тем самым, дополнительной защите от неблагоприятных факторов [97]. Биологическая роль Se проявляется через активность белков, где атомы селена, входят в состав их активного центра [98].

На сегодняшний день, у млекопитающих обнаружено не менее 35 селен содержащих белков. Функции многих из них остаются неизвестными [99] [100]. Хотя активность селен-содержащих белков была отмечена в других метаболических процессах, их основной функцией остается оксидоредуктазная [101].

Литературные данные свидетельствуют о том, что экспрессия этих белков и их оксидоредуктазная активность прямо пропорционально зависит от поступающего с пищей селена (Se) [102] [103] [104] [105]. При этом, в организме существует по крайней мере два пути вставки Se в структуру белка: неспецифический, через аминокислоту метионин (селенометионин SeMet) и специфичный, через аминокислоту цистеин (селеноцистеин SeCys). Атом серы (S), в обеих аминокислотах, полностью замещается атомом Se [106].

Аминокислота SeCys является 21 протеиногенной аминокислотой и кодируется терминирующим кодоном UGA. Выбор между терминацией транскрипции и вставкой SeCys на мРНК, осуществляется посредством петлевой последовательности – вставочная последовательность селеноцистеина (SECIS: selenocysteine insertion sequence). Эта последовательность находится на 3'-нетранслируемом конце мРНК селенсодержащего белка. Кроме того, для включения SeCys в кодируемый белок, необходимо наличие в клетке SeCys-специфичной тРНК (тРНК^{Sec}), SeCys-специфичного фактора элонгации и SECIS-белка (SBP2) [107][108] [109].

Одними из представителей АОФ, где свойства селена задействованы в антиоксидантной защите организма, являются глутатионпероксидазы (GSH-Px). GSH-GPx представляют собой семейство филогенетически родственных белков. GSH-Px1-4 обнаружены у всех млекопитающих и содержат селен, связанный с аминокислотой цистеином (Cys) в каталитическом центре. GSH-Px6, характерен только для людей и, также, является Se-содержащим белком. Согласно филогении, семейство GSH-Px состоит из трех эволюционных групп, происходящих от Cys-содержащего предка: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 и GPx4/GPx7/GPx8. Cys-содержащие GPx7 и GPx8 произошли от GPx4-подобного предка. GPx5 и GPx6 оказались результатом тандемного дублирования GPx3. GPx1 и GPx2 являются подклассом тетрамерных GSH-Px, состоящих из GPx1–3 и 5 и 6 [110] [111] [112].

Не все GSH-Px являются Se-содержащими белками [113]. Более того, по-видимому, лишь незначительная часть из известных (экспериментально и на основе гомологичных последовательностей) глутатионпероксидаз, содержит Se

в каталитическом центре. Так, например, Se-содержащими GSH-Px, являются: цитоплазматический или внутриклеточный GPx (GSH-Px1), плазмальный или внеклеточный GPx (GSH-Px3), желудочно-кишечный GPx (GSH-Px2), фосфолипидная пероксидаза (GSH-Px4) и GSH-Px обонятельного эпителия (GSH-Px6) [114]. Оставшиеся из известных GSH-Px не содержат в своем активном центре атомов селена (CysGPx) и о них мало что известно. Было показано, что GSH-Px5 активно экспрессируется в придатках, а GSH-Px7 и GSH-Px8 проявляют пониженную пероксидазную активность. И это, лишь малая часть из 700 CysGPx гомологичных последовательностей, идентифицированных во всех царствах жизни. Общие данные по глутатионпероксидазам суммированы в Таблице 2.

Таблица 2 – Глутатионпероксидазы млекопитающих [115]

Пероксида за GSH-Px	Каталитический сайт	Структура	Молекулярная масса (кДа)	Восстанавливаемый субстрат	Локализация
GSH-Px1	Sec	Тетрамер	22,1 изоформа 1 10,3 изоформа 2	GSH	Цитоплазма, митохондрии
GSH-Px2	Sec	Тетрамер	21,9	GSH	Цитоплазма
GSH-Px3	Sec	Тетрамер	25,5	GSH, тиоредоксин, глутаредоксин	Внеклеточная
GSH-Px4	Sec	Мономер	19,5 цитозольная 22,2 митохондриальная	GSH, цистеин, тиолы белков	Мембраны, цитоплазма, митохондрии, ядро
GSH-Px5	Cys	Тетрамер	25,2 изоформа 1 11,4 изоформа 2	—	Внеклеточная, плазма, мембраны
GSH-Px6	Sec у человека Cys у мыши	Тетрамер	24,9 (у человека)	GSH	Секретируемая
GSH-Px7	Cys	Мономер	21,9	GSH, протеин дисульфид изомераза	Секретируемая
GSH-Px8	Cys	—	23,9	GSH	Цитоплазма

Сокращения: Cys – цистеин; GSH-Px – глутатионпероксидазы; GSH – глутатион; Sec – селеноцистеин.

Изученные представители GSH-Px, катализируют восстановление H_2O_2 или органических гидроперекисей до воды, и/или соответствующих спиртов. В качестве восстановителя, GSH-Px используют активный глутатион (GSH) [116].

Каталитический центр GSH-Px представлен тетрадой аминокислот – цистеин Cys (+Se), глицин Gln, триптофан Trp и аспарагин Asn [117] [118]. Последовательность аминокислот сравнительно консервативна у всех

представителей семейства GSH-Px, за исключением GSH-Px8 у млекопитающих (Gln→Ser) [112] и GSH-Px у растений (Gln→Gly) [119].

GSH-Px1, 2, 3, 5 и 6 состоят из четырех идентичных субъединиц [103]. GPx4, 7 и 8 имеют мономерную структуру, что, вероятно, делает возможным взаимодействие с гидроперекисями липидов, встроенных в мембраны клеток [103] [120]. Хотя это доказано только для GSH-Px4. GSH-Px3 более уникален в этом отношении. Для GSH-Px3 была отмечена как гомотетрамерная структура, так и гетеротетрамерная. В плазме крови была выделена так же и мономерная форма этого фермента [121]. Пространственная конфигурация и механизм взаимодействия глутатионпероксидаз, был хорошо изучен на примере GSH-Px1. Исследованиями в области рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования показано, что активный SeCys сайт бычьего GSH-Px1 как бы окружен четырьмя аргининовыми остатками одной субъединицы и лизином другой субъединицы. Такая пространственная конформация макромолекулы позволяет присоединять глутатион. Все пять аминокислотных остатка присутствуют только у GSH-Px1, тогда как у других представителей семейства, отдельные аминокислоты могут и отсутствовать. Полагают, что это может значительно снижать сродство к GSH [122].

Как было сказано выше, GSH-Px являются глутатион-зависимыми АОФ, так как в реакции с АФК окисляются (Рисунок 3) [123] [124]. При взаимодействии H_2O_2 с ионизированной формой Se (GPx-Se⁻ +H), последний окисляется до селеновой кислоты (-SeOH). АОФ теряет свои окислительные свойства и инактивируется. Для дальнейшей работы фермента необходимы две молекулы восстановленного GSH, при взаимодействии с которыми, GSH-Px восстанавливается до активной формы. GSH представляет собой трипептид (глутамат, цистеин и глицин), связывание с окисленным GSH-Px происходит непосредственно через каталитический сайт. Тиоловая группа (SH) одной молекулы GSH атакует окисленный селен и образует селен-сульфидную связь. Далее, вторая молекула GSH взаимодействует с образовавшимся селен-сульфидным мостиком, отдавая электроны и, таким образом, превращая GSH-Px обратно в активную форму. Окисленный глутатион (GSSG), нуждается в восстановлении своей активности, что решается за счет его взаимодействия с глутатион редуктазами (GR) (Рисунок 3). Глутатион редуктазы, для реакций восстановления, используют электроны от молекул НАДФН, генерируемых в ходе окисления глюкозо-6-фосфата [125].

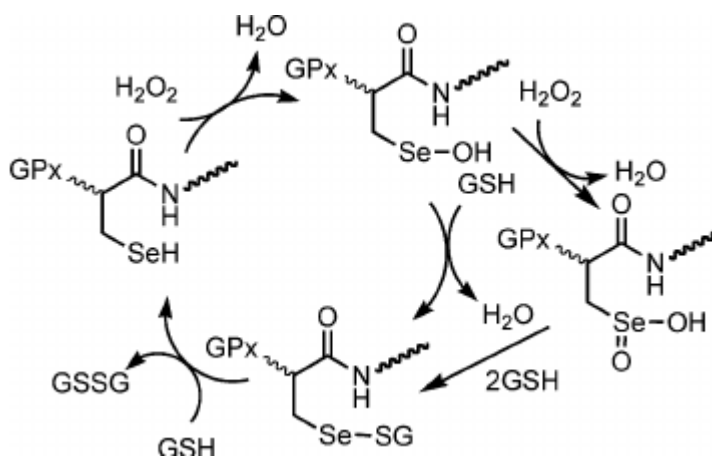


Рисунок 3 – Предполагаемый механизм GPx-катализируемого восстановления H₂O₂ [126]

Биодоступность Se, является важным и лимитирующим фактором синтеза и активности GSH-Px. При этом, для разных изо-форм GSH-Px, была отмечена неодинаковая чувствительность к биодоступности Se в организме. Так, GPX1 и GPX3 незамедлительно снижают свою активность при недостатке Se, и активируются довольно длительное время при возобновлении Se ресурсов [127] [128]. Строгая зависимость этих ферментов от динамического микроэлемента в организме, позволяет предположить их вторичную роль в детоксикации H₂O₂. С другой стороны, GPX2 и GPX4 проявляют значительную резистентность по отношению к недостатку Se и быструю мобилизацию, и активацию при поступлении Se в организм. Что, казалось бы, говорит об их более высоком иерархическом положении в структуре антиоксидантных селен-содержащих белков. Однако нокаутные мыши по генам GPX1 и GPX4 не подтверждают эту гипотезу, так как показывают отсутствие каких-либо патологических эффектов [128].

Благодаря высокой чувствительности GPX1 и GPX3 к Se, измерение их активности широко используется в качестве маркера нутритивного статуса Se в организме [128][129].

1.7.6 Глутатионпероксидаза 1 GPX1 (GSH-Px1)

Фермент глутатионовая оксидоредуктаза перекиси водорода 1 (GSH-Px1, GPX1) впервые был выделен в 1957 году из эритроцитов, и проявлял редуктазную активность по отношению к перекисям водорода, через глутатион. Этот белковый фактор эффективно защищал гемоглобин от окисления. Позднее, было выявлено, что микроэлемент селен, является важным и лимитирующим фактором для активности GPX1. На сегодняшний день, GPX1 является наиболее хорошо изученным представителем семейства. Он имеет гомотетрамernую структуру и, в первую очередь, взаимодействует с H₂O₂, т-бутилгидропероксидами и гидроперекисями кумола. GPX1 также участвует в

реакциях восстановления гидроперекисей липидов и других низкомолекулярных, растворимых гидроперекисей, по мере их высвобождения из мембранных липидов [130]. Некоторыми исследованиями, отмечен задействованным в реакциях с гидроперекисями фосфолипидом моноацилглицерина, например, гидроперекиси 1-линолеоил-лизофосфатидилхолина [131]. Однако, GPX1 не восстанавливает гидроперекиси три- или диацилглицеринов [131]. За их инактивацию, отвечает GPX4, который имеет преимущественную связь с мембранами и, по-видимому, оказывает минимальное влияние на пул клеточной перекиси водорода [132]. Хотя, энзиматически, GPX4 не менее эффективен, чем GPX1 в восстановлении H₂O₂ или гидроперекисей жирных кислот. Следует отметить, что в качестве восстановителя, GPX1, как и многие другие представители семейства, использует глутатион, однако эта связь не абсолютна. В условиях, когда GSH-синтетазы (GSS) нет в наличии, как, например, в митохондриях мозга, которые не экспрессируют GSS, GPX1 может использовать γ -глутамилцистеин в качестве восстановителя для своих субстратов.

GPX1 является наиболее экспрессируемым членом семейства GSH-Px. Экспрессия этого фермента была обнаружена во всех клетках и тканях: в цитозольном, митохондриальном и, в некоторых клетках, в пероксисомальных компартментах. Все вышеуказанные свойства GPX1 позволяют предполагать его важную роль в регуляции окислительного стресса. Однако, мыши, нокаутные по гену (GPX1^{-/-}), развиваются нормально и без видимых патологий. Это может указывать либо на наличие альтернативных и/или компенсаторных путей антиоксидантной защиты, либо на то, что «нормальный» окислительный стресс не причиняет никакого вреда [133]. Но, в условиях сильного окислительного стресса, мыши GPX1^{-/-} погибали, тогда как мыши дикого типа, с добавкой селена выживали [134] [135]. Эти данные ясно показывают, что GPX1 не может быть заменен каким-либо другим Se-содержащим белком для защиты от генерализованного окислительного стресса и, что GPX1 выполняет первичную антиоксидантную функцию *in vivo*.

1.7.7 Ген *GPX1*, регуляция экспрессии и активности

Сравнительный анализ белок-кодирующей последовательности гена *GPX1* у мыши, крысы и человека, указывает на его консервативность в эволюционном аспекте. В особенности, это касается последовательности первого экзона, содержащего Se-Cys кодон. Промоторная область гена *GPX1*, включающая ТАТА и/или ССААТ последовательности, так же, консервативна у этих млекопитающих. Исключение составляет область связывания ядерного фактора 1. Кроме того, у человека, ген *GPX1* «соседствует» с геном *RHOA* (семейство генов, гомологичных протоонкогену *RAS*, подтип А), так как, расстояние между 3' концом гена *RHOA* и точкой инициации транскрипции гена *GPX1* составляет всего 800 пар нуклеотидов.

Транскрипционная активность гена *GPX1*, так или иначе, регулируется параметрами окислительно-восстановительного потенциала клетки. В первую

очередь, так как клетка постоянно имеет дело с кислородом (O_2), активность гена *GPX1* находится в прямой взаимосвязи с парциальным давлением растворенного O_2 . В частности, промотор гена *GPX1* человека имеет две последовательности, для кислород опосредованных регуляций – кислород опосредованные элементы (КОЭ, англ. ORE (oxygen response element)). КОЭ выступают, своего рода, O_2 –барометрическими регуляторами активности транскрипции гена *GPX1*, как в норме, так и при патологических условиях [136]. Для кардиомиоцитов, выращенных в культуре, было показано, что хроническое воздействие пониженного парциального давления O_2 уменьшало связь ядерных транскрипционных факторов с КОЭ [137]. Возможно, что в условиях гипоксии, так же, наблюдается снижение экспрессии гена *GPX1*, посредством этого механизма. Это предположение, вероятно, частично может объяснить реперфузионные повреждения миокарда после инфаркта. Хотя, в условиях гипероксии, полученные данные указывают на существование, по крайней мере нескольких путей регуляции активности гена *GPX1*. И в этом, могут быть задействованы не только КОЭ, но и другие регуляторные элементы промотора гена *GPX1* [138].

GPX1 может транскрипционно активироваться и, как часть клеточного ответа на окислительный стресс. Так, стимулирование активности промотора гена *GPX1* наблюдается при увеличении в клетке супероксидного аниона [134] [139]. При этом, была отмечена стимуляция через р53 опосредованные сигнальные пути, с участием классической последовательности связывания ядерных факторов для р53 [140]. Таким образом, можно сказать, что белок р53 задействован в регуляции экспрессии гена *GPX1*, через характерные для него механизмы.

Промотор гена *GPX1* содержит, так же, сайты связывания для ядерного фактора κB (NF κB) и белка-активатора 1 (AP-1). Активация экспрессии гена *GPX1* может осуществляться посредством этих сайтов при окислительном стрессе. Индукция оксидативного стресса в фибробластах скелетных мышц, опосредует активацию экспрессии гена *GPX1* через NF κB [141]. Было выявлено, что NF κB регулирует экспрессию гена *GPX1* в ответ на воздействие эстрадиола, так как ингибиторы NF κB ослабляли эстрадиол-опосредованную положительную регуляцию экспрессии гена *GPX1* [142]. Это, наталкивает на мысль, что способность эстрадиола усиливать транскрипцию гена *GPX1*, может способствовать увеличению экспрессии гена *GPX1* у женщин по сравнению с мужчинами [143] [144].

Сайт связывания для AP-1, так же может присоединять ядерные факторы c-jun и c-fos. C-jun и c-fos проявляют чувствительность к изменению редокс-потенциала клетки и, будучи окисленными по Cys остаткам, снижают сродство к ДНК [145]. Согласно другим исследованиям, активация транскрипции гена *GPX1* возможна и посредством ядерного фактора Nrf, уровень которого, повышается в ответ на стимуляцию ко-активаторами – пероксисомный коактиватор-1 α рецептора- γ активируемый пролифератором и пероксисомный коактиватор-1 β рецептора- γ активируемый пролифератором (PGC-1 α и PGC-

1β). А, как известно, PGC-1α и PGC-1β и, активируемые ими мишени Nrf1 и Nrf2, повышают экспрессию генов, осуществляющих окислительное фосфорилирование и митохондриальную регуляцию биогенеза [146]. Хотя, регуляция активности экспрессии гена *GPX1* посредством Nrf1 и Nrf2 не показана в экспериментах с применением репортерных генов, имеется немало исследований, подтверждающих эту связь [147] [148] [149].

Таким образом, можно сказать, что регуляция активности экспрессии гена *GPX1* весьма сложна и многогранна. Сигналы, управляющие промоторной областью гена, могут поступать как от окислителя напрямую, так и посредством ядерных факторов транскрипции. Причем, сигналы могут передаваться от различных компартментов клетки, даже от митохондрий.

Продукт гена *GPX1* – мРНК, далее, подвергается различным пост-транскрипционным и трансляционным модификациям, оказывающим регулирующее влияние на уровень экспрессионного объема белка GSH-Px1 в клетке.

Как было описано выше, для селен-содержащих белков GSH-GPx, включение атома Se в состав активного центра, во время трансляции, является лимитирующим моментом. Определяющими в этом процессе будут доступность Se, степень окисления фактора SBP2, а так же другие известные факторы, участвующие в формировании петлевой структуры мРНК, в районе элемента SECIS и, факторы, участвующие во вставке Sec – eEFsec, tRNAsec, рибосомный белок L30, нуклеолин, NSEP1, и eIF4a3 [150] [151] [152] [153]. Биодоступность Se (в том числе и пищевая) оказывает неодинаковое влияние на экспрессию GSH-Px белков и их транскриптов. Белок GSH-Px1 занимает последний уровень в иерархии GSH-Px-Se белков, поскольку его экспрессия значительно подавляется при дефиците селена в системах клеточных культур, а также в исследованиях *in vivo*. В настоящее время этот феномен объясняется тем, что при дефиците Se в организме, его запасы перенаправляются на другие нужды или на синтез более важных Se-белков. В связи с этим, и формируется своеобразная иерархичная градация Se-содержащих белков. Понижение экспрессии Se-содержащих белков в условиях дефицита Se, по-видимому, связано с нонсенс-опосредованным распадом мРНК (НОР (англ. nonsense-mediated decay – NMD)), либо с подавлением трансляции [154] [155]. Остальные факторы так же имеют важное значение для синтеза GSH-Px белков. Так, например, обнаруженные мутации в гене *SBP2*, приводят к редким рецессивным патологиям у человека. Основными фенотипическими проявлениями недостаточности *SBP2* являются, нарушение функции щитовидной железы и задержка роста, часто сопровождающаяся врожденной миопатией и когнитивными нарушениями. Мутации приводят к недостаточности селен-содержащих GSH-Px белков, в том числе и белка *GPX1* [156] [157]. Эти мутации, подчеркивают важность всех факторов, регулирующих и участвующих в процессе трансляции продукта гена *GPX1*.

1.7.7 Полиморфизм гена *GPX1* и риск развития сердечнососудистых заболеваний

На хромосомном уровне, ген *GPX1* попадает в область p21 третьей хромосомы, для которой отмечено явление потери гетерозиготности (ПГ, англ. loss of heterozygosity (LOH)) в соматических клетках. ПГ явление, при котором, происходит делеция целого хромосомного участка в одной из двух аутосом. ПГ приводит к утрате одного аллельного варианта генов, расположенных в делеционном участке у гетерозиготных индивидуумов. Вместе с другими генами, (например, *hOGG1*, *CTDSPL*, *RASSF1A*, гены ДНК репарации) ген *GPX1* может подвергаться делеции. Это событие, довольно часто, встречается при раке и характеризуется снижением активности белка GSH-Px1и накоплением 8-гидроксидезоксигуанозина в клетках. Последний, является активным соединением, повреждающим молекулы ДНК.

В общей сложности, для гена *GPX1* идентифицировано 38 однонуклеотидных замен-полиморфизмов (ОНП, single-nucleotide polymorphisms (SNPs)). Из них наиболее изучаемыми являются только два, так как затрагивают белок-кодирующую область и, для которых отмечено фенотипическое проявление. Один из полиморфизмов представляет собой GCG тандемный повтор, в количестве от 4 до 6, в первом экзоне, транслирующийся в соответствующий аланиновый (Ala) повтор (от 5 до 7 Ala повторов в GSH-Px1 белке), вблизи N-терминального конца. Pro198Leu – другой полиморфизм, проявляющий свое действие на активности GSH-Px1 белка более выражено. Замена цитозина в кодоне CCC на тимин CTC, приводит к замене аминокислоты пролина (Pro) в позиции 198, на аминокислоту лейцин (Leu). Функциональная значимость второго полиморфизма изучена гораздо более подробно, нежели для GCG повтора. Аллельный вариант Leu проявляет меньшую экспрессионную чувствительность к уровню Se в клетке, в сравнении с Pro вариантом. При возникновении условий недостаточности Se, вариант Leu снижает свою экспрессию и общую активность незначительно, по сравнению с резким спадом экспрессии варианта Pro. Таким образом, однонуклеотидные полиморфизмы, в особенности, затрагивающие белок-кодирующие области, являются дополнительными факторами регуляции экспрессии и активности гена *GPX1*. И, могут потенциально влиять на развитие различных патологий, сопровождающихся окислительным стрессом и воспалением. Но, следует подчеркнуть, что влияние полиморфизмов и их генотипов на активность *GPX1* белка *in vivo*, будет зависеть от многих факторов, включая роль других полиморфизмов, как в самом гене *GPX1*, так и в других close-related genes. Уровень микроэлемента селена в современном и в исторически сложившемся рационе человека, так же, может выступать в роли одного из важных факторов регуляции активности белка *GPX1*.

Наряду с экспериментальными данными, с использованием разных модельных объектов, эпидемиологические исследования, также, показывают вовлеченность белка *GPX1* в развитие сердечнососудистых патологий у человека. Одно из проспективных исследований, включающих 636 пациентов с

ИБС, показало, что активность эритроцитарного белка GPX1, обратно пропорциональна развитию сердечнососудистых патологий у этих пациентов в дальнейшем. Так, было показано, что у лиц имеющих самую высокую активность белка GPX1, вероятность возникновения дальнейших сердечнососудистых событий, почти в три раза ниже, чем у лиц с самым низким уровнем активности белка GPX1 [158]. Исследования Schnabel R с соавт., подтверждают эту защитную взаимосвязь, показывая влияние активности белка GPX1 на уровень гомоцистеина в крови [159]. Другие исследования, также, дополняют сведения о протективной роли активности белка GPX1 в развитии сердечнососудистых патологий [160] [161].

Роль основных двух полиморфизмов в гене *GPX1*, также, неоднократно изучалась с позиции генетико-эпидемиологических исследований. Однако, результаты исследований *in vivo* более противоречивы, в сравнении с исследованиями *in vitro*. Это подчеркивает сложность и комплексность процессов *in vivo*, а также, участие различных молекулярно-биохимических путей в развитии конкретной патологии. Lei C. с соавт., показали ассоциацию варианта Leu, полиморфизма Pro198Leu, с уменьшением активности GSH-Px1 белка и риском развития болезни Кешана [162]. Сложность и комплексность процессов *in vivo*, не всегда позволяет проследить такую положительную взаимосвязь активности GSH-Px1 белка с генотипической детерминантой, в клиническом биоматериале. Но, для сердечнососудистых заболеваний такая взаимосвязь прослежена на довольно большом количестве исследований [60] [163] [164] [165] [166].

В противоположность этим исследованиям, Kato K. с соавт., показал, что вариант Leu ассоциируется с протективным эффектом в отношении развития аневризмы грудной аорты (АГА) у 1351 пациента с гипертонической болезнью. А вариант Pro, наоборот увеличивал риск развития АГА. Более того, вариант Leu, согласно исследованию Soerensen M et al, наряду с другими геронтологическими факторами, ассоциируется с увеличением продолжительности жизни [167].

Влияние и роль полиморфизма GCG-тандемного повтора в развитии сердечнососудистых патологий практически не изучена. Однако, имеются исследования показывающие его ассоциацию с развитием других патологических состояний.

1.7.8 Фосфолипидная глутатионпероксидаза 4 GPX4 (GSH-Px4)

Белок GPX4 является уникальным среди всех GSH-Px. Во-первых, он жизненно необходим. Мыши нокаутные по гену, погибают на 8 эмбриональные сутки [168]. Однако, у человека, возможно протекание эмбиогенеза, вплоть до раннего постнатального развития, при наличии «нулевого» варианта гена *GPX4*. При этом, плод имеет структурные и биохимические аномалии функционирования, не совместимые с жизнью [169]. Во-вторых, это природа восстанавливаемого им субстрата. Первоначально белку GPX4 приписывалась роль ингибитора перекисного окисления липидов (PIP) [170]. И это было не

случайно, так как, белок активно восстанавливал не только H_2O_2 и небольшие молекулы гидроперекисей, но и гидроперекиси сложных липидов (гидроперекиси фосфолипидов, холестерина) в составе мембран клеток или липопротеинов [171]. GPX4, так же, активно восстанавливает 7β -гидроксипероксихолестерол – основной цитотоксин в окисленных липопротеинах [172]. Напрямую, снижая уровень мембранных гидроперекисей липидов *in situ*, GPX4 способствует защите мембран клеток от повреждения. Известно, что гидроперекиси липидов вовлечены во множество патофизиологических процессов, включая воспаление, атерогенез, нейродегенерацию и старение. Помимо того, что белок GPX4 является единственным антиоксидантным ферментом, способным восстанавливать гидроперекиси липидов, он также «по совместительству» участвует в регуляции биосинтеза эйкозаноидов [173] [174] [175] и цитокиновой передачи сигналов [176]. В последние годы, белок GPX4 активно изучается в качестве центрального регулятора ферроптоза – железозависимой неапоптотической формы гибели клеток. Открытие новой формы гибели клеток в организме, как и участие белка GPX4 в этом процессе, в качестве главного регулятора, было весьма неожиданным событием [177] [178] [179].

Белок GPX4 имеет мономерную структуру и, в отличие от белка GPX1, имеет несколько иную аминокислотную последовательность [180]. В аминокислотной последовательности белка GPX4 отсутствуют консервативные GSH-связывающие аминокислоты, но не смотря на это, GPX4 взаимодействует с активным глутатионом [181]. Отсутствие консервативных GSH-связывающих аминокислот, по-видимому, имеет эволюционное преимущество, в условиях недостаточности активного GSH. Было показано, что внутриклеточные тиолы белков (хроматиновые тиолы, тиолы цистеин богатых белков митохондрий спермы), способны замещать роль GSH для белка GPX4. Поэтому, в зависимости от биодоступности GSH в клетке, белок GPX4 может выступать либо в роли GSH пероксидазы, либо в роли тиоловой пероксидазы [182] [183] [184]. Еще одной структурной особенностью белка GPX4 является отсутствие внутренней последовательности из 20 аминокислот, которые образуют поверхностно-открытую петлю, регулирующая субстратную специфичность в других ферментах семейства GPX [185]. Возможно, этой особенностью, частично объясняется более разнообразная субстратная специфичность белка.

Не смотря, на вышеперечисленные особенности структурной организации белка GPX4, кинетика его ферментативных реакций аналогична таковым GPX1 и 3. Цикл реакций, так же, включает три этапа по механизму «пинг-понга», где бимолекулярные реакции между ферментом и субстратом последовательно включают каталитические циклы. Важным моментом здесь является тот факт, что механизм реакции включает окисление Se гидроперекисями в отсутствие комплекса фермент-субстрат. Поэтому, *in vivo* фермент никогда полностью не восстанавливается и общая скорость реакции будет зависеть от концентрации белка GPX4 и гидроперекисей, а не от концентрации окисленного GSH [118]. Следует отметить, что изоформа белка GPX4 закрепленная непосредственно на

мембране, особенно чувствительна к избыточному окислению в селеновую кислоту, что химически способствует возможности передачи сигнала белком GPX4 по типу «затвора» [186].

Ферментативная активность белка GPX4 была обнаружена во всех исследованных тканях крысы [187], а также в некоторых исследованных тканях человека, в том числе и опухолевых [188]. Самые высокие уровни активности отмечены в семенниках крыс, мышей и человека, где экспрессия белка GPX4 регулируется гонадотропинами в созревающих сперматогенных клетках. Белок GPX4 был обнаружен в цитоплазме, митохондриях, плазме и ядерных мембранах, при этом установлено, что GPX4 разной субклеточной локализации имеет неодинаковую структурную основу [189] [190]. К настоящему моменту, обнаружено четыре изоформы белка GPX4: цитозольная (цGPX4), митохондриальная (мGPX4), ядерная (яGPX4) и GPX4-I, недавно обнаруженный в иммортализованных мышечных клетках гиппокампа мыши [191]. Все четыре изоформы транскрибируются с одного гена *GPX4*. Однако, экспрессия четырех изоформ осуществляется альтернативной транскрипцией, а потому продукт транскрипции отличается у всех четырех изоформ [189] [192].

1.7.9 Ген *GPX4*, регуляция экспрессии гена и активности белка

Ген *GPX4* локализован на 19 хромосоме. Размер гена составляет 4 килобазы и включает 7 экзонов и 6 интронов (Рисунок 4). Такая геномная организация гена *GPX4* сравнительно консервативна у всех представителей млекопитающих. Ген *GPX4* человека, также, не имеет псевдо последовательностей в геноме, в отличие, например, от мыши [185].

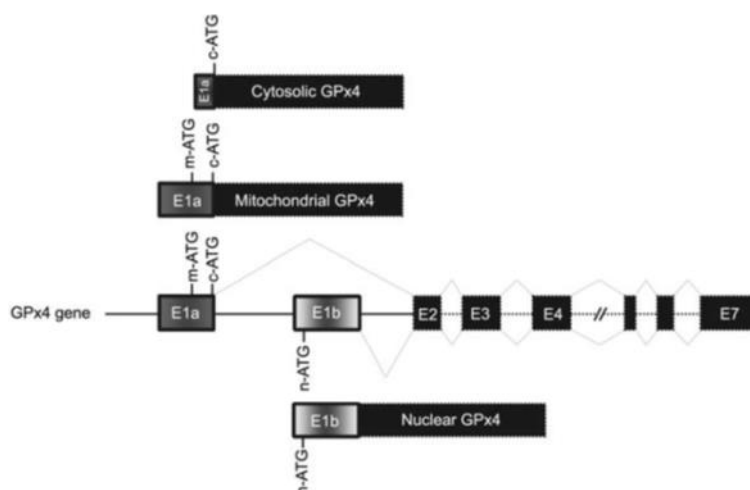


Рисунок 4 – Схематическое изображение строения гена *GPX4* и кодируемых на его основе изоформ [193]

Каким образом, с одного гена *GPX4* в клетках синтезируются разные изоформы GPX4 белка, отличающиеся как по массе, так и по структуре, не совсем понятно. Предполагается два механизма регуляции: на уровне транскрипции и на уровне трансляции. Первый механизм имеет место, исходя из наличия нескольких точек начала транскрипции гена *GPX4* для трех

изоформ. Так, стартовая точка транскрипции для мРНК цитозольной изоформы *ц-gpx4* – второй кодон 5'ATG в первом экзоне. Тогда как, для мРНК митохондриальной изоформы *м-gpx4* – первый кодон 5'ATG в первом экзоне (Рисунок 4). Кроме того, *м-gpx4* подвергается дальнейшему процессингу участка в 192 нуклеотида в митохондриях, являющийся «знаковой» для транспорта в митохондрии [194]. Однако, механизм этого избирательного транспорта в митохондрии неизвестен. Второй механизм предполагает наличие трансляции с *м-gpx4* цитозольной изоформы цGSH-Px4 белка, в условиях, когда первый 5'ATG кодон функционально подавлен. Экспериментальных доказательств этого явления пока не обнаружено, но исключать наличие регуляции на уровне трансляции мы не можем.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе изоформ-специфической экспрессии *GPX4* в разных тканях, до конца не изучены, но в последние годы, достигнут значительный прогресс в этой области. Схематическое картирование сайтов инициации транскрипции для *м-gpx4* и *ц-gpx4* в экзоне 1а предполагает, по меньшей мере, частично перекрывающиеся промоторные области и высокую степень взаимодействия между регуляторными элементами. В пределах этой области, были определены сайты связывания для ядерного фактора Y (NF-Y) [195], белка стимуляции 1 (Sp1) [196] и цАМФ-зависимого элемента – модулятора-тау (modulator-tau) [197]. Попытки определить минимальные промоторные области для *м-gpx4* и *ц-gpx4*, выявили сложную сеть функциональных взаимодействий между цис- и транс-регуляторными элементами [196] [168]. Но, конкретный механизм такой избирательной регуляции транскрипции отдельно для *м-gpx4* и *ц-gpx4* до сих пор неизвестен.

Влияние дальнейших, пост-транскрипционных процессов мРНК *gpx4*, так же были изучены. Все эти исследования, в основном, направлены на изучение ко-трансляционной регуляции вставки Se в активный каталитический сайт. Как и в случае с белком GPX1, вставка Se в молекулу белка GPX4, может являться лимитирующим фактором активности синтеза. Хотя для белка GPX4 эта связь выражена гораздо слабее, что и позволяет, отнести белок GPX4 на низкую степень Se-зависимой иерархии [198].

1.7.10 Полиморфизм гена *GPX4* и риск развития сердечнососудистых заболеваний

В гене *GPX4* идентифицировано уже более 1000 нуклеотидных вариаций. Из них, в литературе отмечено две мутации, ведущие к синтезу усеченной и неактивной формы белка GPX4. «Нулевые» варианты гена были обнаружены у двух семей, с наличием неонатально-летального типа спондилометафизарной дисплазии (Седагатский тип спондилометафизарной дисплазии) [169]. И один полиморфизм, для которого экспериментально установлено фенотипическое проявление на молекулярном уровне [199]. Полиморфная замена цитозина на тимин T→C в позиции 718 (rs713041) соответствует 3' не кодирующей области (3'UTR) гена *GPX4*. Эта область гена критически необходима для вставки атома Se в активный центр транслируемого белка GPX4 [199]. Накопленные

экспериментальные исследования показывают возможную функциональную связь этого полиморфизма с активностью арахидонат-липооксигеназного метаболического пути. Кроме того, эпидемиологические исследования свидетельствуют о важной роли C718T полиморфизма в развитии различных патологий. Так, например, гомозиготные носители варианта T более чувствительны к оксидативному стрессу и имеют повышенный уровень адгезивных моноцитов в крови, что способствует большей предрасположенности к сосудистым воспалительным поражениям [199]. Однако, многие аспекты влияния C718T полиморфизма на развитие различных патологий, в том числе и ИБС, остаются не совсем понятными и требуют дальнейшего детального изучения на различных популяциях, при учете различных факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Кролики и экспериментальная модель атеросклероза

В работе, были исследованы кролики породы Chinchilla. Всего, в опытах было использовано 10 кроликов (контрольная и экспериментальная группы). Кролики содержались в хорошо проветриваемых помещениях и постоянной температуре около 22°C.

Все экспериментальные процедуры на животных были одобрены этической комиссией института кардиологии и внутренних болезней (Протокол № 10 от 12 марта 2009 г.).

Когорты людей для генетико-эпидемиологического исследования методом “случай-контроль”

Генетический статус человека может оказывать влияние на ход течения сердечнососудистой патологии, совместно с влиянием условий окружающей среды. Поэтому к выбору пациентов для исследования генетического статуса однонуклеотидных замен по кандидатным генам и их ассоциацию с развитием ИБС, мы отнеслись тщательно. Заболевания классифицированы согласно Канадской классификации кардиологов и Ассоциации Кардиологов Казахстана [200]. Для исследования отобраны пациенты со стабильными формами стенокардии (стенокардия I – IV классов), хронической сердечной недостаточностью II-III классов [201] и постинфарктным кардиосклерозом. Диагноз ИБС был основан на критериях ВОЗ. Все пациенты прошли диагностические стресс-тесты и/или коронарографию, оценку наличия болевого синдрома в груди, подтвержденную данными ЭКГ и кардиоспецифическими ферментами (тропонин, миоглобин, креатинкиназа). Критерии исключения включали наличие сопутствующей патологии в виде диабета, воспалительных заболеваний, местных воспалительных процессов, аллергических реакций, признаков почечной недостаточности, недостаточности кровообращения III стадии, болезни Альцгеймера, наличия гипертермии и инсоляции в течение предыдущих 2-3 недель. Все вышеперечисленные данные, а так же данные по возрасту, полу, национальности, вредным привычкам, заносили в анкеты, разработанные в лаборатории молекулярной генетики, Института Общей Генетики и Цитологии (Приложение Г).

Параллельно, проводился подбор группы условно здоровых людей, без клинических проявлений ИБС, семейного анамнеза атеросклероза и ишемических событий на ЭКГ, онкологии, аутоиммунных заболеваний, любых наследственных заболеваний и острых / хронических воспалительных заболеваний. Все необходимые данные по каждому участнику фиксировали в соответствующей анкете (Приложение Г). Обе когорты людей (опыт- 360 человек, контроль – 341 человек) максимально соответствуют друг к другу с учетом основных анкетных данных (пол, возраст, этническая принадлежность).

В качестве материала для генетического исследования, у всех участников, использовали кровь из локтевой вены в количестве 5 мл, собранную в условиях поликлиники с использованием системы для забора крови в ЭДТА-обработанные пробирки. Пробирки транспортировали в Институт Общей Генетики и Цитологии, с помощью переносного контейнера-холодильника, не позднее одного часа после забора. Образцы крови маркировали соответствующим внутренним кодом и замораживались при -20°C для дальнейшего выделения геномной ДНК.

Участие в исследовании, а так же забор биологического материала проводили только с согласия потенциальных участников, и только после подписания добровольного информированного согласия. Все клинические обследования, включая верификацию диагноза, а так же, забор биологического материала проводились опытными врачами-кардиологами и соответствующими специалистами, на базе кардиологического отделения ГККП «Городской клинической больницы №1» г. Алматы. Исследование было одобрено этической комиссией при НУО «Казахстанско-Российского медицинского университета» г. Алматы (протокол заседания №36 от 5 января 2016г).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Молекулярно-генетические методы

2.2.1.1 Выделение геномной ДНК из периферической крови человека

Геномную ДНК выделяли с использованием готового коммерческого набора «Genomic DNA Purification Kit» и «Gene Jet DNA Purification Kit» (*ThermoFisher, США*). Перед процедурой выделения ДНК, пробирки с образцами крови, хранившиеся при -20°C , размораживали при комнатной температуре и тщательно перемешивали встряхиванием. Для улучшения качественных характеристик выделяемой ДНК, непосредственно после отбора 200 μl крови в чистую и стерильную пробирку, добавляли 400 μl дважды дистиллированной воды (ddH_2O). Полученную взвесь перемешивали без резких движений и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. После лизиса эритроцитов, содержимое пробирки центрифугировали 3 минуты при 5000 оборотах, для отделения лейкоцитарной фракции. Получившийся осадок разводили в 200 μl ТЕ-буфера (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Дальнейшее выделение проводили согласно прилагаемому протоколу, без изменений.

Количественные и качественные характеристики выделенных образцов ДНК оценивали на спектрофотометре *Biorhotometer Plus (Eppendorf, Германия)*. Спектрофотометрические измерения проводились с учетом трех длин волн: 260 нм, 280 нм и 320 нм. В качестве референсного образца использовали ТЕ-буфер. Для чистой ДНК коэффициент чистоты составляет $K=1,7 - 1,8$; при наличии РНК $K=2,0$; белка $K=1,6 - <$.

Размер выделенных образцов ДНК определяли с помощью 0,7% агарозного ТАЕ гель-электрофореза при постоянном напряжении 90V, 60 минут, с последующей UV-визуализацией.

2.2.1.2 Полимеразная цепная реакция с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ПЦР-ПДРФ

Метод ПЦР-ПДРФ применялся для генотипирования полиморфных участков генов SOD3 Ala58Thr (172 G>A, rs2536512), GPX4 Leu220= (660 T>C, rs713041), GCLC –129 T>C (rs17883901) и GCLM –588 T>C (rs41303970).

Для постановки ПЦР-ПДРФ, предварительно, был выполнен дизайн праймеров, специфичных для исследуемой области генов SOD3 и GPX4. Дизайн проводили с использованием онлайн приложения «Basic Local Alignment Search Tool (primer-BLAST)», разработанного Национальным Центром Информационной Биотехнологии (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). При конструировании, за основу брали полногеномные последовательности RefSeq, включающие гены SOD3 и GPX4 (Homo sapiens), полученные из нуклеотидной базы данных Национального Центра Информационной Биотехнологии (NCBI RefSeq nucleotide database) (Таблица 3).

Таблица 3 – Последовательность праймеров для амплификации фрагментов генов SOD3, GPX4 и графическое изображение амплифицируемого фрагмента

Ген	Прямой праймер (5' → 3') Обратный праймер (5' → 3')	Графическое изображение положения праймеров в гене	Размер ампликона, п.н.
SOD3	GGGGGTTGGTTCTGCGATA A	5' – TGGGGACTGGGGGGTTGGTTCTGCGATAATGGGGT CCCTGAGATTCTATGTTTTCACGTGACTAAGCCTCA CTCTGCCCCACCTCCGCGGGGGCGTCCCGCAGGT GCCCCACTCCAGCCATGCTGGCGCTACTGTGTTCC TGCCTGCTCCTGGCAGCCGGTGCCTCGGACGCCTG GACGGGCGAGGACTCGGCGGAGCCCAACTCTGACT CGGCGGAGTGGATCCGAGACATGTACGCCAAGGTC ACGGAGATCTGGCAGGAGGTCATGCAGCGGCGGGA CGACGACGGC [G/A] CGCTCCACGCCCTGCCAG GTGCAGCCGTCCGCCACGCTGGACGCCGCGCAGCC CCGGGTGACCGGCGTCTCTCTTCCGGCAGCTTG CGCCCCGCGCCAAGCTCGACGCCTTCTTCG–3'	401
	GAAGAAGGCGTCGAGCTT GG		
GPX4	GAGAAGGACCTGCCCCAC TA	5' – ACAGGTGATAGAGAAGGACCTGCCCCACTATTCT AGCTCCACAAGTGTGTGGCCCCGCCCAGCCCTG CCCACGCCCT [T/C] GGAGCCTTCCACCGGCACTC ATGACGGCCTGCCTGCAAACCTGCTGGTGGGGCAG ACCCG–3'	96
	GTCATGAGTGCCGGTGGA AG		

Для генов GCLC и GCLM использовали готовую последовательность праймеров разработанную: *Shun-ichi Koide et al.* [92] для GCLC гена (F: 5'TCGTCCCAAGTCTCACAGTC 3'; R: 5'CGCCCTCCCCGCTGCTCCTC 3') и

Shin-ichi Nakamura et al. [93] для GCLM гена (F: 5'CTCAAGGGCAAAGACTCA 3'; R: 5'CCGCCTGGTGAGGTAGACAC 3').

Синтез праймеров осуществляли на синтезаторе ASM-800 (ООО Биоссет, Россия). После отчистки и лиофилизации, полученные праймеры, разводили в 200 µl ddH₂O и замораживали при -20С° для дальнейшего использования.

Компоненты для ПЦР реакции размораживали при комнатной температуре и тщательно перемешивали при помощи вортекса. Смесь для амплификации, объемом 20 мкл, включала 50 нг геномной ДНК, 10 мкл ×2 ПЦР буфера (×2 PCR Master Mix: 0.05 U/µL Taq ДНК полимеразы, реакционный буфер, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM каждого dNTP (Thermo Scientific, США)) и 10 пмоль каждого праймера (прямого и обратного).

Условия ПЦР реакции были оптимально подобраны для каждой пары праймеров с учетом их базовой температуры плавления, концентрации в реакционной смеси и используемой ДНК полимеразы (Таблица 2).

Генотипирование проводили в трех повторностях, во избежание ошибок генотипирования.

Таблица 4 – Условия трехступенчатой ПЦР-реакции для амплификации фрагментов генов *SOD3*, *GPX4*, *GCLC* и *GCLM*

Стадии ПЦР	Температура, С°		Время
Начальная денатурация	95		3 мин
Денатурация	95	35 циклов	30 сек
Отжиг	60 (<i>SOD3</i>)		30 сек
	61 (<i>GPX4</i> , <i>GCLC</i>)		
	58 (<i>GCLM</i>)		
Элонгация	72		45 сек
Финальная элонгация	72		5 мин

Дальнейшая идентификация, изучаемых однонуклеотидных замен, проводилась путем гидролиза полиморфного сайта, в составе амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

Наличие в генах *SOD3* и *GPX4* сайта рестрикции для полиморфного участка и подбор, потенциальных рестрикционных эндонуклеаз, осуществляли при помощи онлайн приложения WatCut (разработано Michael Palmer, Университет Ватерлоо). Для генов *GCLC* и *GCLM* использовали рестриктазы согласно *Shun-ichi Koide et al* [92] и *Shin-ichi Nakamura et al* [202]. Эндонуклеазы рестрикции и их специфические сайты гидролиза, использованные при генотипировании, приведены в Таблице 3.

Таблица 5 – Эндонуклеазы рестрикции для проведения ПЦР-ПДРФ

Ген	Эндонуклеаза	Сайт рестрикции	Графическое изображение сайта рестрикции в амплификате
SOD3	BssHII	G [^] CGCGC	..CGGGACGACGACGGC G ↓CGCTCCACGCCGCCT..
GPX4	StyI	C [^] CWWGG	..CCCTGCCCCACGC C ↓CTTGAGCCTTCCACCGG..
GCLC	Tsp45I	[^] GTSAC	..TGCTCCCCTCAACT↓G T GACCCAATCACCCCTT..
GCLM	MspI	C [^] CGG	..CCGCGACCTGAACGC↓ C GGGAGACCTCACCCAG..

Реакция рестрикции проводилась в соответствии с прилагаемым протоколом и рекомендациями. Объем общей смеси на одну реакцию составлял 15 мкл и содержал 5 мкл ПЦР-продукта, 8,5 мкл ddH₂O, 1 мкл 10× Буфера, прилагаемого для каждой рестриктазы, и 0,5 мкл эндонуклеазы. Готовую смесь аккуратно перемешивали и инкубировали при 37°C на ночь.

2.2.1.3 Полимеразная цепная реакция с последующим анализом температуры плавления амплифицированных фрагментов в режиме реального времени

Метод ПЦР в реальном времени с последующим высокоразрешающим анализом температуры плавления фрагментов ДНК (англ. HRM), был применен для генотипирования трехнуклеотидного tandemного повтора GCG в гене *GPX1*.

Определение генотипов образцов, используемых в качестве стандартных контролей для постановки HRM. Генотипирование было проведено методом обычной ПЦР амплификации фрагмента гена *GPX1*, содержащего исследуемый GCG повтор. Амплификация проводилась в 20 мкл ПЦР смеси, включающей 50 нг геномной ДНК, 10 мкл 2× ПЦР Мастер Микса (0.05 U/μL Taq DNA полимеразы, реакционный буфер, 3.5 mM MgCl₂, 0.4 mM каждого dNTP (Thermo Scientific)) и 10 пикомоль каждого праймера (*GPX1_F*: 5'–GAA ACT GCC TGT GCC ACG TGA CC–3'; *GPX1_R*: 5'–CGA GAA GGC ATA CAC CGA CTG GGC–3'). Оптимизированные условия реакции: начальная денатурация 3 мин при 95°C, 35 циклов включающие денатурацию 30 сек при 95°C, отжиг 30 сек при 60°C, элонгация 1 мин при 72°C. Размер полученных фрагментов ПЦР выявляли методом полиакриламидного гель электрофореза.

Реакцию амплификации в реальном времени проводили с использованием готового коммерческого набора «DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit» (Thermo Scientific, США). Для минимизации влияния солей (1M NaCl), используемых при выделении геномной ДНК, ДНК образцов предварительно разводилась до конечной концентрации 5 нг/мкл в ТЕ буфере (10 mM Трис, 1 mM EDTA). Реакционная смесь, общим объемом 10 мкл, включала 5 мкл 2× ПЦР Мастер Микса (0.05 U/μL Tbr DNA полимеразы, SYBR Green I, оптимизированный ПЦР буфер, 5 mM MgCl₂, 0.4 mM каждого dNTP), 3 пикомоль прямого (F)/ обратного (R) праймеров и 25 нг геномной ДНК.

Программа ПЦР для амплификации в реальном времени включала стадию начальной денатурации и активации TbrDNA полимеразы, длительностью 7 мин при 95°C; 40 циклов денатурации при 95°C – 15 сек, отжига при 60°C – 20 сек, элонгации при 72°C – 1 мин. Для облегчения формирования гетеродуплексных фрагментов, реакционная смесь после циклов ПЦР, нагревалась до 95°C в течение 30 сек и медленно охлаждалась до 40°C (1 мин). Регистрацию точек плавления, амплифицированных фрагментов ДНК, проводили в диапазоне температур от 60°C до 98°C, через каждые 0.2°C/сек.

ПЦР амплификация, последующая детекция и анализ генотипов был осуществлен на базе Piko Real Time Thermal Cycler (Thermo Scientific, США), с использованием прилагаемого программного обеспечения Thermo Scientific PikoReal Software 2.2. Полученные цифровые данные по флуоресценции (F) и температуре (T) отображались через графики функций. При анализе так же учитывали данные после нормализации, сдвига температур и графиков разности.

Генотипирование проводили в трех повторностях, во избежание ошибок генотипирования.

2.2.1.3 Электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле

Электрофорез в 2% агарозном геле использовали для оценки размеров выделенной геномной ДНК, для визуализации фрагментов ДНК после ПЦР амплификации и определения их размеров. В качестве стандартного маркера, для определения длины выделенной ДНК, использовали готовый коммерческий набор «Lambda DNA/HindIII Marker» (Thermo Scientific, США); для определения фрагментов ПЦР продуктов и рестрикции применяли «GeneRuler 100bp DNA Ladder» (Thermo Scientific, США).

Электрофорез в 5% полиакриламидном геле (ПААГ) проводили для установления наличия фрагментов ПЦР продуктов гена GPX4, после обработки эндонуклеазой рестрикции. Матрицей для геля служил раствор акриламид/бисакриламида (Sigma-Aldrich, США) со значением C = 3,3% (акриламид: бисакриламид 29:1), имеющий оптимальный размер пор, для разделения фрагментов от 20 п.н. до 150 п.н. В колбе, последовательно, смешивали 4.5мл ddH₂O, 1,5мл 40% раствора акриламид/бисакриламида, 120мкл 50×Трис-ацетатного буфера (ТАЕ), 5мкл тетраметилэтилендиамина (TEMED) и 100мкл свежеприготовленного аммония персульфата (10% w/v). Для определения размеров фрагментов после рестрикции ПЦР продуктов, использовали маркер «GeneRuler 50bp DNA Ladder» (Thermo Scientific, США). Электрофорез проводили при напряжении 90В, 45 мин, с последующим окрашиванием в «10×Sybr Safe DNA gel stain dye» (Invitrogen, Life Sciences, США) и визуализацией в проходящем УФ свете

Разделение ПЦР фрагментов гена GPX1, имеющих трехнуклеотидную разницу в длине (165 п.н., 168 п.н., 171 п.н.) проводили в 25% полиакриламидном геле со значением C=5% (30 % акриламид: бисакриламид, 19:1) (Sigma-Aldrich, США). Электрофорез проводили в трис-боратной (ТВЕ)

буферной системе, для улучшения разделяющих свойств геля, при постоянном напряжении 60В, в течение 9 часов. Окрашивание проводилось в «10×Sybr Safe DNA gel stain dye» (Invitrogen, Life Sciences, США) и визуализацией в проходящем УФ свете.

2.2.2 Экспериментальные методы

Для исследования экспрессии генов *GPX1* и *SOD3* в атеросклеротических поражениях аорты, на уровне их белков, была создана экспериментальная модель атеросклероза у кроликов. В работе были использованы 10 кроликов породы Шиншилла. Для эксперимента были отобраны только здоровые кролики-самцы, без видимых патологий развития, с начальной массой тела 3500 ± 110 г и возрастом 6 месяцев. Равномерное распределение десяти кроликов в группу контроля и опытную, было проведено случайным образом. Все кролики содержались в стандартных, хорошо вентилируемых условиях, при температуре 22 ± 2 °С и с рационом питания, удовлетворяющим возвратные энергетические потребности растущих особей. Сбалансированный по составу корм для кроликов готовили еженедельно и хранили при 4°С в холодильной камере. Корм и вода были доступны животным *ad libitum*. Индукция атеросклероза проводилась у 5 кроликов диетой, обогащенной 2% холестерина, на основе корма «Purina rabbit chow» (Dyets Inc., США) [203]. Длительность диеты составила 6 месяцев. Контрольная группа кроликов из 5 самцов, в течение 6 месяцев оставалась на обычной диете «Purina rabbit chow». По истечении 6 месяцев, была проведена цервикальная дислокация всех животных под общей анестезией. При вскрытии исследовалась аорта и производилась фиксация ткани аорты (5×7 мм) в 10% забуференном растворе формалина [204] [205].

2.2.3 Иммуно-гистохимические методы

2.2.3.1 Приготовление гистологических срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки

Срезы тканей аорты кроликов, контрольной и опытной групп, использовались для визуализации экспрессионной активности белков *SOD3* и *GPX1* в норме и при патологических условиях атеросклероза. Ткани аорты, размером 5×7 мм фиксировали в 10% забуференном формалине (pH 7,0 –7,4), при +4°С на 48 ч. После фиксации образцы промывались в проточной воде 24 ч, с последующей дегидратацией в спиртах, возрастающей крепости (60%, 80%, 90%, 95%, и 100%) при +4°С. После пропитки 100% ксилолом, образцы тканей заливали в парафин для дальнейшего приготовления срезов.

Парафиновые срезы, толщиной 5 μ m переносили на предметные стекла, обработанные 3-аминопропил-триэтоксисиланом и высушивали при комнатной температуре на ночь. Для иммуногистохимического окрашивания, полученные срезы подвергали депарафинизации. Депарафинизация производилась путем погружения срезов в раствор ксилола, с предварительным кратковременным

нагревом. Далее, образцы срезов помещали в абсолютные и градуированные гидратирующие растворы спиртов (100%, 95%, 90%, 80%, 60%), до конечной гидратации в бидистиллированной воде.

Гистологический анализ полученных срезов проводился на основании состава и структуры бляшек, и степени повреждения интимы. Атеросклеротические повреждения определяли по стадиям развития согласно классификации, предложенной Stary с соавторами, и одобренной Американской Кардиологической Ассоциацией (Таблица 6) [206] [207].

Таблица 6 – Стадии развития атеросклеротических повреждений согласно классификации Stary с соавт. [206]

Тип поражения	Описание
I (липидные пятна)	Начальное воспаление с пенистыми клетками, без повреждения тканей
II (липидные полосы)	Изменения I типа + увеличение пенистых клеток, без повреждения тканей
III (преатерома)	Изменения II типа + отложение внеклеточных липидов с повреждением тканей
IV (атерома)	Изменения III типа + массивные отложения внеклеточных липидов со значительным поражением ткани интимы
V (фиброатерома)	Изменения IV типа + инфильтрация внеклеточного липидного ядра коллагеновыми волокнами и ГМК
VI (бляшка)	Изменения V типа + тромбоз и/или кровоизлияние и/или эрозии с нарушением целостности стенки бляшки
VII (атерокальциноз бляшки)	Изменения VI типа + кальцинирование бляшки с существенной деформацией бляшки
VIII (фиброзная бляшка с изъязвлениями)	Изменения VII типа + замещение липидного ядра коллагеновыми волокнами

2.2.3.2 Иммуногистохимическое окрашивание срезов тканей

Иммуногистохимическое окрашивание срезов тканей проводили по методике описанной Ramos-Vara JA [208] и Igor B. Buchwalow [204]. Депарафинизированные и гидратированные срезы тканей обрабатывали в растворе 3% H₂O₂ и метанола при комнатной температуре, в течение 10 мин, для блокирования экзогенной пероксидазной активности в образцах. Блокированные срезы промывали в 300мл натрий-фосфатного буфера (1× PBS) дважды по 5 минут. После промывки, образцы срезов тканей помещали в кипящий (95-100°C) цитрантый буфер (10mM, pH=6,0) на 20 мин, с последующим медленным остыванием при комнатной температуре. После

остывания, образцы дважды промывали в $1 \times$ PBS при медленном качании. Для предотвращения неспецифического связывания антитела с тканью, срезы обрабатывались 100–400 мкл блокирующего раствора (0,1%казеин, $0,2 \times$ PBS, 0.1% Tween-20) в течение 1 часа при комнатной температуре во влажной камере. Полученные срезы обрабатывали первичными антителами (мышинные моноклональные антитела против GSH-Px1 (ab108429, Abcam, США) и EC-SOD3 (ab171738, Abcam, США) кролика в блокирующем буфере, 1 час, $+4^\circ\text{C}$. Для антител против GSH-Px1 использовали рабочую концентрацию 1:250, для SOD3 1:100. Срезы аккуратно промывали $1 \times$ фосфатным буферным раствором PBST (3,2 mM Na_2HPO_4 , 0,5mM KH_2PO_4 , 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7,4) и обрабатывали раствором вторичных поликлональных антител класса IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (sc-2380, Santa Cruz Biotechnology, США). Инкубацию проводили в разведении 1:400, 1 час при $+4^\circ\text{C}$ и постоянном помешивании на шейкере. Обработанные срезы тканей аккуратно промывали в проточной воде 30 минут и обезвоживали в спиртах возрастающей крепости (95%, 95%, 100% и 100%) по 5 минут в каждой. После дальнейшей очистки срезов тканей в ксилоле (3-кратная очистка), проводилась фиксация покровных стёкол на поверхности препарата в течение 20 минут. В качестве среды для фиксации использовали поли бутилметакрилат-ко-метилметакрилат (Eukitt® Quick-hardening mounting medium, Sigma-Aldrich, США).

2.2.3.3 Выделение общего белка из срезов тканей, заключённых в парафиновые блоки

Экстракцию общего белка, из тканей аорты кроликов, проводили по методике, описанной *Kimimasa Ikeda et al* [209], с некоторыми модификациями. Срезы тканей аорты кроликов, толщиной 50 мкм, помещали на готовые предметные стекла. Далее проводили последовательную депарафинизацию в ксилоле, регидратацию в этаноле (понижающейся крепостью) и дистиллированной воде, с последующим высушиванием в термостате. Высушенные срезы ткани, дополнительно измельчали и помещали в чистые пробирки объемом 1,5 мл. К полученному гомогенату тканей добавляли по 200 мкл упрощенного RIPA буфера, pH=7,6 (1 М дигидрофосфат натрия, 10 mM динатрийгидрофосфат, 154 mM хлорид натрия, 1% Тритон X-100, 12 mM дезоксихолат натрия, 2% додецилсульфат натрия (SDS) и ингибиторы протеаз (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Applied Science, Германия)). Инкубацию проводили в течение 2 часов при 60°C , с периодическим перемешиванием суспензии. После инкубации, образцы гомогенатов центрифугировали при 4°C , 15 000 об/мин, в течение 20 минут. Полученный супернатант отбирали в чистые пробирки и замораживали для дальнейшего использования при -80°C .

2.2.3.4 Количественное определение общего белка в образцах по методу М. М. Бредфорда

Метод основан на сдвиге спектра поглощения раствора трифенилметанового красителя кумасси G-250 (кумасси бриллиантовый синий, англ. Coomassie Brilliant Blue-G250) при связывании с белками [210].

Определение концентрации общего белка в растворе проводили с использованием готового коммерческого реагента Бредфорда (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, США). Пробоподготовку и измерения проводили согласно прилагаемому протоколу для стандартного анализа образцов, с некоторыми модификациями. Данный протокол позволяет использовать 0,05 мл исследуемого раствора белка и 1,5 мл готового реагента Бредфорда. Перед проведением процедуры, реагент Бредфорда (+4°C) аккуратно встряхивали и доводили до комнатной температуры. После смешивания 0,05 мл исследуемого образца белка и 1,5 мл раствора Бредфорда в чистой и стерильной пробирке, полученную смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем, смесь переносили в чистую одноразовую кювету и проводили измерения поглощения при длине волны 595 нм. Определение концентрации белка в изучаемых образцах проводили путем сравнения с калибровочной кривой, полученной с использованием белка известной концентрации. Построение калибровочного графика проводили на основе серийных разведений раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА, 10 мг/мл) (Таблица 7).

Таблица 7 – Подготовка разведений для диапазона концентраций 2,5-50 мкг/мл

№	Объем добавляемого разводителя, мл	Объем и концентрация добавляемого раствора БСА, мл	Конечная концентрация БСА, мкг/мл
1	1,8 мл	0,2 мл, р-р БСА 10мг/мл	1000 мкг/мл
2	1,8 мл	0,2 мл, р-р БСА 1 мг/мл из 1 пробирки	500 мкг/мл
3	1,9 мл	0,1 мл, р-р БСА 1 мг/мл из 1 пробирки	250 мкг/мл
4	1,95 мл	0,05 мл, р-р БСА 1 мг/мл из 1 пробирки	100 мкг/мл
5	1,8 мл	0,2 мл, р-р БСА 100 мкг/мл из 2 пробирки	50 мкг/мл
6	1,9 мл	0,1 мл, р-р БСА 100 мкг/мл из 2 пробирки	25 мкг/мл
7	1,95 мл	0,05 мл, р-р БСА 100 мкг/мл из 2 пробирки	2,5 мкг/мл

Все измерения проводили на спектрофотометре Biophotometer Plus (Eppendorf, Германия).

2.2.3.5 Денатурирующий электрофорез белков методом Вестерн-блоттинга

Таргетное определение изучаемых белков в образцах, проводили методом Вестерн-блота. Фракционирование белковых молекул проводили в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) электрофорезе в денатурирующих условиях. Денатурацию проводили в 1× буферном растворе (LB), содержащего 50 mM Tris (pH 6,8), 100 mM 2-меркаптоэтанола, 10% глицерола и 1% додецилсульфата натрия (ДСН, англ. SDS), в качестве денатурирующего агента. 50 нг общего белка смешивали с 4× буферным раствором LB в соотношении 1:3 и инкубировали 5 мин при 100°C. Электрофорез проводили в трис-глициновой буферной системе при постоянном напряжении 160В, в течение 3ч и температуре +4°C. Разделенные белки, затем, переносили на поливинилиденфторидную мембрану (PVDF) (материал Иммобилон, Millipore; Bedford, MA) в присутствии трансфер-буфера (192 mM Глицин, 25 mM Tris, 20% v/v метанол и 0.02% SDS), при +4°C и силе тока 30mA, на ночь. После мембрану обрабатывали блокирующим буфером (0,1% казеин, 0,2×PBS, 0.1% Tween-20) 1 час при +4°C и постоянном помешивании. Мышиные моноклональные антитела против GSH-Px1 (ab171738, Abcam, США) и EC-SOD (ab108429, Abcam, США) кролика, разводили до рабочей концентрации 1:3000 в блокирующем буфере и инкубировали с мембраной 1 час при +4°C и постоянном, умеренном помешивании на шейкере. Отмывку мембраны от несвязавшихся первичных антител проводили в TBST-буфере (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), 1 час при +4°C. Далее, мембрану инкубировали со вторичными бычьими поликлональными антителами класса IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (sc-2380, Santa Cruz Biotechnology, США). Хемилюминесцентную визуализацию комплексов белок-антитело, проводили обработкой мембраны в растворе перекиси водорода, кумаровой кислоты и люминола (1,25 mM люминола, 0,68 mM кумаровой кислоты и 0,01% H₂O₂), с последующей проявкой на пленке для автордиографии (Blue Basic Autorad Film 8×10 (ISC Bio Express)).

В качестве референса использовали первичные антитела против β-актина (ab8226).

2.2.2 Методы статистической обработки полученных данных

Минимально достоверные объемы выборок для каждой группы и/или когорты определяли с применением Power анализа.

Для оценки средних значений ± SD, использовали методы статистической обработки данных в пакете программы Excel2010. Распределение переменных по двум группам кроликов сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Тест Стьюдента, также, был использован для сравнения степени различий между исследуемыми группами пациентов с ИБС (случай) и условно здоровых людей (контроль). Полученные значения t-критерия Стьюдента (t_{st}) и критерия хи-

квадрата (χ^2) использовали для определения уровня статистической значимости (P). Значение $p < 0,05$ (5% ошибки) считалось статистически значимым.

Частотное распределение аллелей в исследуемых группах рассчитывали в соответствии с уравнением Харди-Вайнберга (1):

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (1),$$

где p – частота 1-го аллеля и q – частота 2-го аллеля.

Расчет относительного риска развития ИБС проводили по методу расчета отношения шансов (OR – odd ratio). Расчет OR проводили в двух вариантах: с учетом доминантной (гетерозиготы носители и гомозиготы по редкому аллелю объединены в одну группу) и рецессивной моделей (гетерозиготы носители и гомозиготы по частому аллелю объединены в одну группу).

Показателем относительного риска (OR), выявляющие подверженность генов мутационным изменениям в результате действия радиации рассчитывали по стандартной формуле (2):

$$OR = a/b \times d/c \quad (2),$$

где:

a – количество людей в опытной группе (ИБС), имеющих мутантный генотип;

b – количество людей в опытной группе ИБС (ИБС), имеющих нормальный генотип;

c – количество людей в контрольной группе, имеющих мутантный генотип;

d – количество людей в контрольной группе, имеющих нормальный генотип.

Значения OR близкие к 1, указывают на отсутствие влияния исследуемого генотипа на развитие ИБС; значения OR меньше 1 указывают на отсутствие рисков свойств генотипа на развитие ИБС; значения OR больше 1 указывают на влияние изучаемого генотипа в развитие ИБС.

Достоверный доверительный интервал (CI 95%) вычисляли по формулам (3, 4):

$$CI_{\min} = \exp(\ln Or - 1,96\sqrt{(1/a+1/b+1/c+1/d)}) \quad (3)$$

$$CI_{\max} = \exp(\ln Or + 1,96\sqrt{(1/a+1/b+1/c+1/d)}) \quad (4)$$

95% доверительный интервал показывает предельные значения полученной статистической величины, которая с вероятностью в 95% будет находиться в этом интервале предельных значений. CI, также, указывает на точность полученной статистической величины при применении

соответствующих методик. Так, узкий диапазон значений CI указывает на более точную оценку полученного значения OR, широкий диапазон значений CI указывает на менее точную оценку полученного значения OR.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.2 Моделирование экспериментального атеросклероза у кроликов для изучения экспрессии антиоксидантных белков

3.2.1 Атеросклероз у кроликов

Уровень липопротеинов в крови (ЛП, ЛПВП, ЛПНП, ТГ), их качественное и количественное соотношение имеет принципиальную важность при развитии патологических состояний (гиперлипидемия и/или гиперхолестеролемия), приводящих к атеросклерозу – основной причине ИБС. Дисрегуляция липидного метаболизма, на фоне общего метаболического синдрома, приводит к избыточной инфильтрации липопротеинами стенки сосудов сердца и увеличению общей оксидативной нагрузки в крови и тканях организма. В силу невозможности изучения многих важных аспектов дисрегуляции липидного метаболизма и сопутствующего атеросклероза на человеке, учеными, уже на протяжении длительного времени, используются экспериментальные модельные объекты – мыши [211] [212], кролики [213], морские свинки [214] [215], лабораторные опоссумы и нечеловекообразные обезьяны [216] [217]. Так как, кролики очень чувствительны к еде, богатой холестерином, и легко накапливают атерогенные липопротеиды в крови, с последующим развитием множественного атеросклероза сосудов, их использование в качестве модельного объекта в нашем исследовании наиболее обоснованно. Во-первых, липопротеидный спектр крови у кроликов более приближен к таковому у человека, по сравнению с другими модельными объектами. Например, отсутствие у мышей и крыс белка, переносящего сложные эфиры холестерина (англ. cholesteryl ester transfer protein – CETP), обуславливает повышение уровня неатерогенных ЛПВП, и понижение уровня атерогенных ЛПНП в крови в ответ на атерогенную диету [218]. Поэтому, нативные мыши устойчивы к развитию гиперхолестеролемии и атеросклероза. Во-вторых, избыточное накопление липидов в крови и тканях кроликов, в особенности ЛПНП, провоцирует развитие воспалительного процесса в тканях сосудов, и увеличение локального и генерализованного оксидативного стресса [219]. В-третьих, у этих животных, на холестерол богатой диете, развиваются атеросклеротические бляшки, по строению, аналогичные таковым у человека. В-четвертых, развитие экспериментального атеросклероза у кроликов возможно и без применения генно-инженерных манипуляций модельного объекта. Хотя, методы генной инженерии позволяют изменить липопротеидный спектр крови у мышей (как правило, нокаутные по генам липопротеидного спектра), приближая патофизиологию гиперхолестеролемии к человеческому [220], такой подход, по мнению автора, больше соответствует изучению состояния при отсутствии признака, кодируемого тем или иным геном липидного метаболизма.

Исходя из всего выше сказанного, в нашем исследовании, нами была выбрана модель атеросклероза на кроликах породы Шиншилла, на основе модели, проведенной Али Ахсаном с соавт [205]. Модель кроликов породы

Шиншилла, примечательна тем, что животные, хорошо реагируют на атерогенные диеты, с выраженной гиперхолестеролемией и не требует комплексных затрат на содержание. Кролики индуцируют гиперхолестеролемию даже при малых концентрациях холестерина, а стандартная диета может включать добавление 2% холестерина на вес животного, в течение 6-10 месяцев [221]. В нашем исследовании, продолжительность атерогенной диеты составила 6 месяцев. В отличие от, наиболее распространенной модели кроликов породы Новозеландских Белых (New Zealand white rabbits), кролики породы Шиншилла более устойчивы к развитию атеросклероза, даже при ранней гиперхолестеролемии. Поэтому, продолжительность атерогенной диеты для кроликов породы Шиншилла составляет от 6 месяцев и более. В нашем исследовании, для изучения активности экспрессии таргетных антиоксидантных белков, развитие фиброзных бляшек на 2 стадии атерогенеза (липосклероз) являлось оптимальным. Цервикальная дислокация кроликов под анестезией, через 6 месяцев, позволяет уловить развитие стадии липосклероза, без осложненного атеросклероза коронарной и аортальной артерий. Более того, известно, что длительность 2%-ой холестерол-богатой диеты, более 6 месяцев, может негативно сказаться на общем здоровье кроликов, с развитием жировых поражений печени и других органов [222]. В ходе эксперимента, все кролики, до процедуры цервикальной дислокации, сохранили жизнеспособность и физическую подвижность.

Еще одна особенность, требующая внимания при создании модели для изучения гиперхолестеролемии и атеросклероза у кроликов, это вариабельность уровня плазменного холестерина. Данная особенность, относится не только к кроликам породы Шиншилла, но и для кроликов в общем [223]. Так, показано, что у самок уровень вариабельности холестерина в плазме выше (в основном, эстроген-зависимый) чем у самцов, поэтому, для эксперимента мы использовали только кроликов-самцов, одного возраста.

Атеросклеротические изменения стенки сосудов у экспериментальных кроликов, в нашем исследовании, согласовывались с таковыми исследований, проведенных Али Ахсаном с соавт.

Процесс активации окислительного стресса в сосудах, пораженных атеросклерозом не вызывает сомнений. Измерение оксидативного стресса возможно либо посредством прямого определения концентрации АФК, либо косвенно, через определение активности антиоксидантных белков. В ответ на окислительный стресс, в качестве адаптивного ответа у животных, происходит активация внутренней антиоксидантной защиты. Как уже было изложено в литературном обзоре, активация антиоксидантной защиты представляет собой сложную сеть биохимических путей, порой, включающую более 40 ферментных молекул. И если при первом методе определения мы получаем общую неспецифическую картину уровня оксидативного стресса, то посредством второго метода, нам открывается более частная и специфическая картина окислительного стресса. Поскольку, известно, что реакции каждой

молекулы антиоксидантного белка, направлены на конкретный спектр восстановительной биохимической активности. А потому, по активации конкретного антиоксидантного белка, косвенно, можно судить о характере окислительных реакций, происходящих в тканях. В нашем исследовании мы применили второй подход, взяв за основу уровень экспрессии двух антиоксидантных белков. Результаты этих исследований и их обсуждение изложено в следующих двух подразделах.

3.2.2 Изучение экспрессии антиоксидантного белка SOD3 при развитии атеросклероза у кроликов

Ген *SOD3*, кодирующий внеклеточный антиоксидантный фермент SOD3, не является геном домашнего хозяйства, его экспрессия строго индуцируется в определенных физиологических условиях. Профиль экспрессии антиоксидантного белка SOD3, позволяет заключить, что стенка артерий является одним из основных мест его постоянной экспрессии. В связи с тем, что белок SOD3 экспрессируется во внеклеточное пространство и участвует в регуляции биодоступности NO в стенке артерий, данный белок является одним из важнейших показателей функционального состояния сосудов. Анализ литературных данных показывает, что характер экспрессии этого белка в ткани сосудов варьируется, в зависимости от применяемой экспериментальной модели, стадий атеросклероза и других факторов.

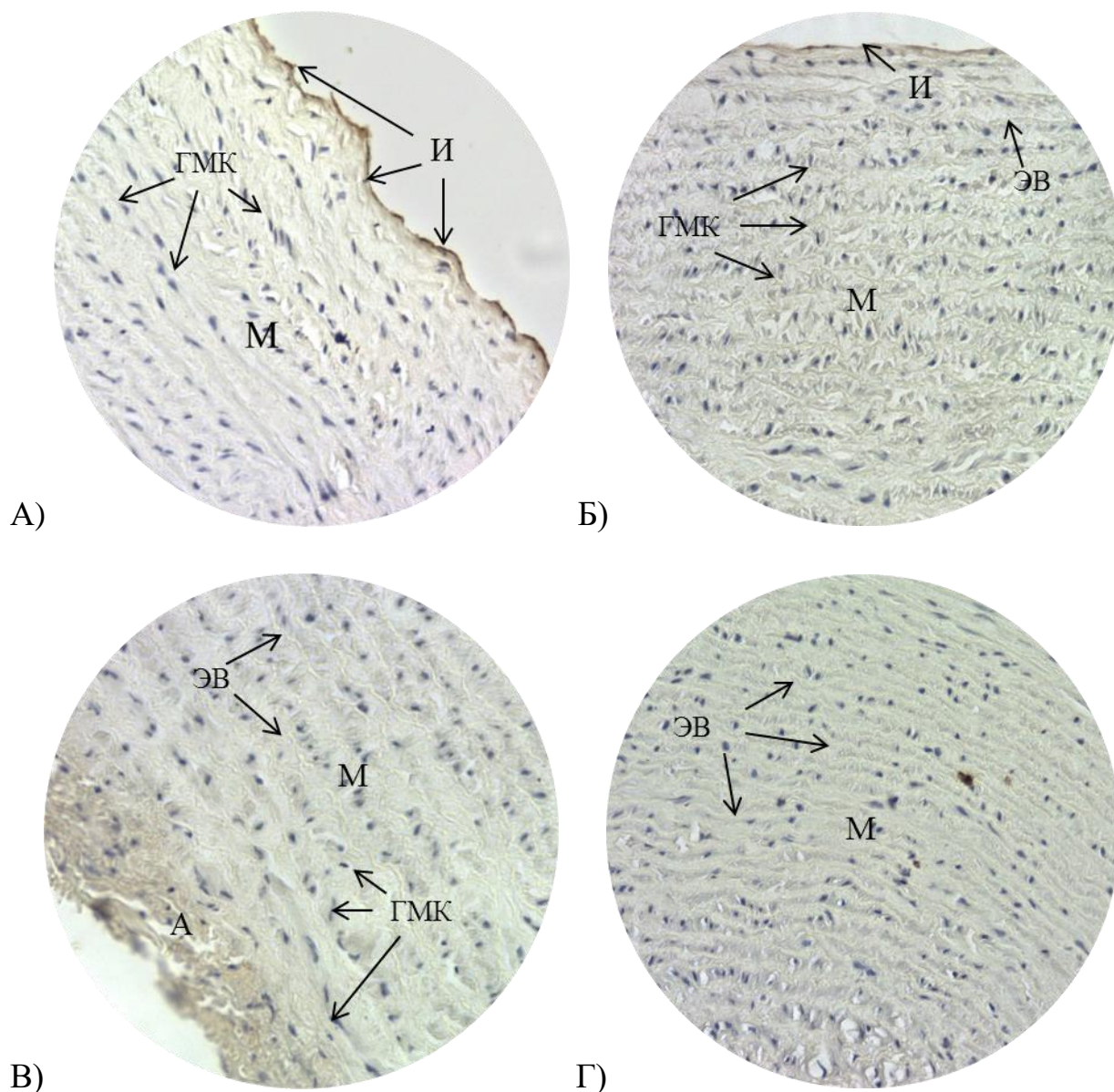
В данной работе была проведена иммуногистохимическая идентификация локализации экспрессии белка SOD3 в стенке артерий кроликов в норме и при развитии атеросклероза.

Иммуногистохимическое окрашивание белка SOD3 изучалось на 20 образцах серийных срезов тканей аорты, полученных от 10 кроликов. 10 срезов тканей аорты были получены от 5 кроликов из контрольной группы и 10 срезов тканей аорты от 5 кроликов из опытной группы, с индуцированным атеросклерозом. Таким образом, от одного кролика было получено по два образца серийных срезов различных участков тканей аорты. Серийные срезы включали различные стадии развития атерогенного воспаления стенки аорты (жировые полосы, стадии промежуточного воспаления, атеромы). Иммуногистохимический сигнал был получен на срезах тканей аорты как контрольной, так и опытной группы, но с различной интенсивностью. В работе представлены показательные микрофотографии, полученные на серийных срезах тканей аорты, отражающих экспрессионную картину белка SOD3 у кроликов в норме и при атеросклерозе.

Для образцов срезов тканей аорты, полученных от контрольной группы кроликов, характерно слабое или вообще отсутствующее иммуноокрашивание различных слоев сосуда (Рисунок 5). Позитивный иммуносигнал, слабой интенсивности наблюдался непосредственно в интимальном слое аорты (Рисунок 5, А) у всех животных. Однако, у одного контрольного животного, были отмечены липидные отложения в интимальном слое, в виде жировых полосок. Такие отложения могут выявляться в нормальных тканях аорты, в том

числе и человека [224]. Липидные полосы отмечаются и у детей, даже грудных, но не имеют патологической основы под собой [225]. Более того, считается, что нормальная интима, физиологически, является местом депонирования ЛПНП, что неоднократно было продемонстрировано с помощью электронной микроскопии [226]. У детей уровень депонированных липопротеидов может обратимо варьироваться, например, уровнем липопротеидов в крови [227]. Не смотря на это, иммуноокрашивание против белка SOD3, в местах жировых полосок усиливалось. Повышение иммунореактивности ткани аорты наблюдалось не только в местах образовавшихся липидных полосок, но и в субэндотелиальных слоях, лежащих следом за интимальным слоем. При этом, видимых клеточно-тканевых изменений выявлено не было. Усиление экспрессии белка EC-SOD в области жировых полосок, видимо, говорит о ранней активации внеклеточных свободно-радикальных реакций, в субэндотелиальном слое аорты. Несмотря на то, что отложения липидных полосок считаются обратимой и функционально не патологической особенностью липидного метаболизма сосудов, их образование уже сопряжено с клеточно-молекулярной реорганизацией ткани аорты.

Расположенный далее гладкомышечный медиальный слой не проявлял какой-либо видимой иммунореактивности к белку SOD3, у всех животных. На Рисунке 5, Б) и Г) показан иммуноинтактный медиальный слой от двух разных животных. Волокнисто-соединительный слой адвентиция по ходу аорты, у всех животных, имел участки со слабовыраженной иммунореактивностью против SOD3 и участки с визуальной отсутствующей иммунореактивностью (Рисунок 5, В) и Г)). Возможно, такая реактивность связана с повреждением адвентициального слоя сосуда во время забора и пробоподготовки тканей аорты, после эвтаназии животных. Известно, что при механическом повреждении тканей с разрывом клеточных элементов, происходит активация окислительного стресса в близлежащих тканях [228] [229]. Отчасти, в пользу этого предположения, говорит тот факт, что местом преимущественной локализации иммуноокрашивания, являются участки с нарушением целостности нижних слоев сосуда. При этом, окрашивание имеет более диффузную картину распространения, захватывая близлежащие неповрежденные слои ткани. С другой стороны, имеющиеся исследования показывают, во-первых, отсутствие редокс-чувствительной экспрессии SOD3 при окислительном стрессе [230] и, во-вторых, наличие экспрессии различных антиоксидантных белков, на тканях аорты не имеющих значимых повреждений адвентиция [231] [232].



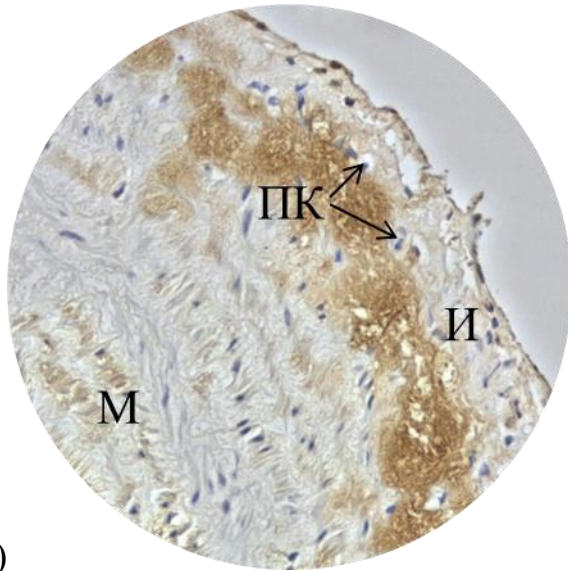
На микрофотографиях срезов тканей аорты, полученных от трех разных кроликов, представлена слабая или отсутствующая иммунореактивность к белку SOD3. А) локальная иммунореактивность в интимальном слое ($\times 40$); Б) отсутствующая иммунореактивность в медиальном слое ($\times 40$); В) отдельные участки адвентициального слоя имеют слабую и диффузную иммунореактивность ($\times 40$); Г) отсутствие иммунореактивности в толще медиального и части адвентициального слоев ($\times 40$). И- интимальный слой, М-медиальный слой, А-адвентициальный слой, ГМК – гладкомышечные клетки, ЭВ – эластические волокна.

Рисунок 5 – Иммуногистохимическая детекция и локализация эпитопов sod3-антитела против белка SOD3 в аорте кролика в норме

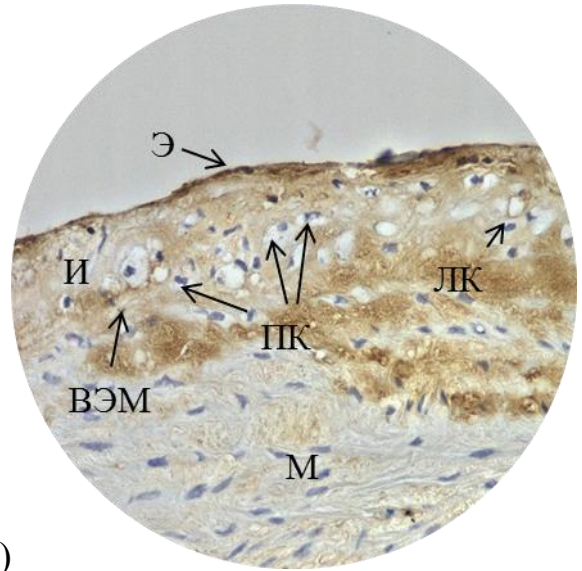
Известно, что адвентиций представляет собой довольно сложный по строению и составу слой сосудистой стенки. Он представляет собой не просто соединительно-тканый слой с коллагеновыми волокнами, в качестве основного каркасного (строма) элемента. Слагающие адвентиций популяции фибробластов, гладкомышечных, нервных и иммунных клеток, клеток-

предшественников различных типов клеток, перемежающиеся с лимфатическими и кровеносными сосудами, делают этот слой не менее важным в регуляции гомеостаза сосудов, чем интимальный и медиальный слой. Более того, объем экспериментальных данных показывает, что адвентиций служит центром генерации, хранения и высвобождения основных ключевых регуляторных молекул гомеостаза сосуда, по принципу «стресс-чувствительного» элемента. В ответ на гормональные, воспалительные и окружающие факторы, такие как, гипоксия/ишемия или растяжение сосудов, резидентные адвентициальные клетки (фибробласты, иммунные и клетки-предшественники), часто являются одними из первых активируемых клеточных популяций сосуда. Увеличение/усиление уровня пролиферации клеток, регуляции экспрессии белков внеклеточного матрикса и белков адгезии, а также, секреция хемокинов, цитокинов, ростовых и ангиогенных факторов, может непосредственно влиять на фенотип остальных клеток сосудистой стенки, и регулировать тонус *vasa vasorum* [233]. Возможно, в нашем исследовании, иммуногистохимический сигнал, полученный в области адвентиция, является результатом не только механического нарушения целостности этого слоя, но и определенных адаптационных процессов происходящих в нормальной стенке сосуда (например, гемодинамические флуктуации крови). Тем более, что в последнее время, понимание основ функционирования сосудистой стенки, пересматривается в сторону новой парадигмы «outside-in». Согласно этой парадигме, первичный ответ на воздействующий фактор, осуществляет именно адвентициальный слой, с последующим распространением сигналов от адвентиция, через медиальный слой к интима и эндотелию [234]. Таким образом, можно заключить, что даже в нормальной стенке аорты кролика, экспрессия антиоксидантного внеклеточного белка SOD3 индуцируется в ответ на различные стимулы.

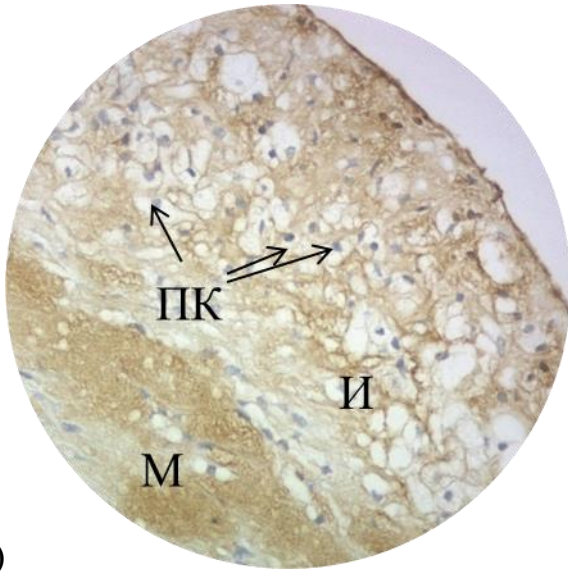
Для образцов срезов тканей аорты, полученных от группы с индуцированным атеросклерозом, было характерно усиленное иммуноокрашивание, интенсивность которого варьировалась в зависимости от стадии атеросклеротического поражения. Повышенный иммуносигнал был отмечен для всех слоев сосудистой стенки (Рисунок 6).



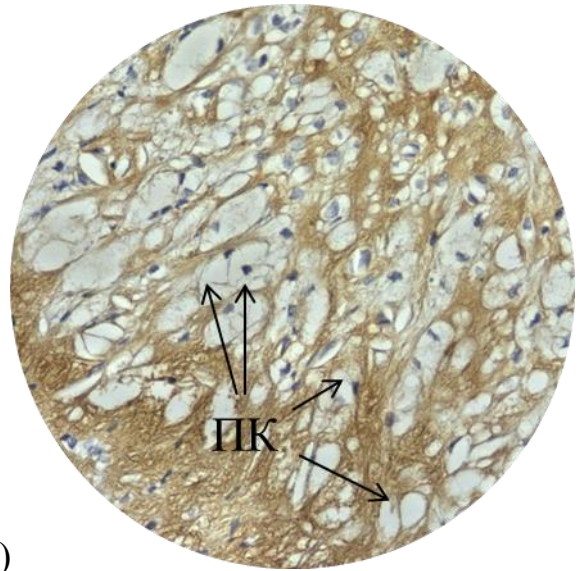
А)



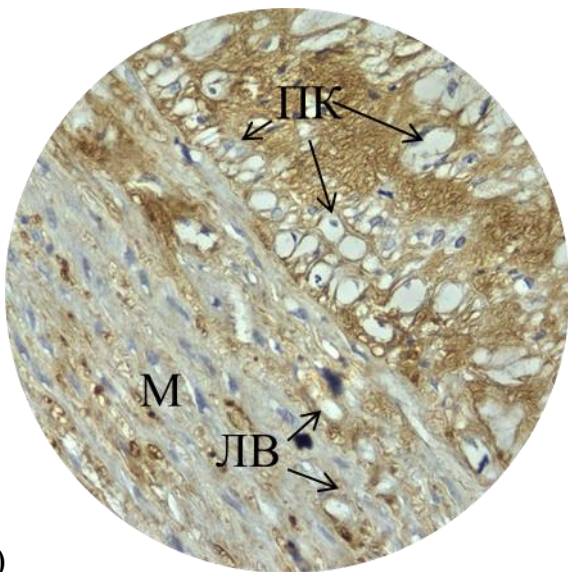
Б)



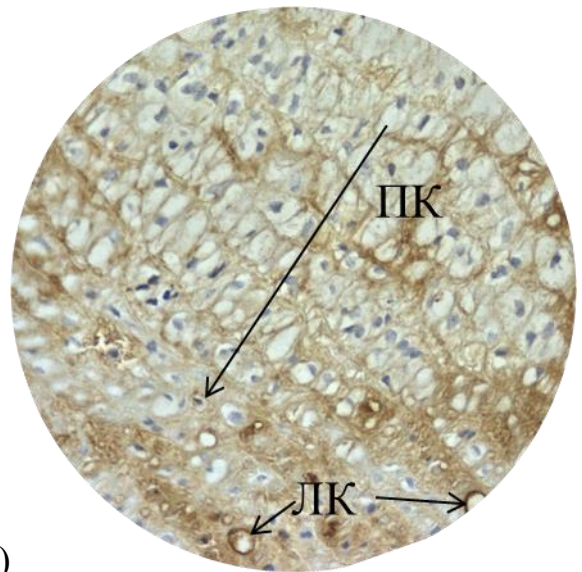
В)



Г)



Д)



Е)

А) стадия начального липоидоза с незначительным отложением липидных пятен (тип I). Выявляются единичные пенные клетки. Усиление иммуносигнала в субинтимальном

слое ($\times 40$); Б) иммуноокрашивание белка SOD3 в участке ткани аорты с начальным липоидозом, переходящим в липосклероз (тип II), с увеличением количества пенистых клеток ($\times 40$); В) иммуноокрашивание белка SOD3 при липосклерозе, с многочисленными субэндотелиальными пенистыми клетками. Экспрессия белка EC-SOD более выражена в субинтимальном слое, по сравнению с интимальным ($\times 40$); Г) иммуноокрашивание белка SOD3 при прогрессирующей стадии атероматоза (тип III), с инфильтрацией интимального слоя пенистыми клетками больших размеров ($\times 40$); д) сравнительная экспрессионная картина белка SOD3 в интимальном и медиальном слоях, на стадии липосклероза ($\times 40$); Е) иммуноокрашивание белка SOD3 в медиальном слое, при прогрессирующей стадии атероматоза. Отмечается инфильтрация медики пенистыми клетками и липидными каплями ($\times 40$). Э – эндотелий, И – интима, М – медиальный слой, ПК – пенистые клетки, ЛК – липидные капли, ВЭМ – внутренняя эластическая мембрана.

Рисунок 6 – Иммуногистохимическая детекция и локализация эпитопов sod3-антитела, против белка SOD3, в аорте кроликов при индуцированном атеросклерозе

Интимальный интимальный слой, представляет собой очень тонкий и еле заметный слой соединительной ткани с единичными гладкомышечными клетками, лежащий непосредственно под эндотелием. Основные компоненты этого слоя – коллаген, эластин и протеогликаны, вырабатываемые гладкомышечными клетками. Несмотря, на такой малокомпонентный состав и строение, этот слой является наиболее активным при различных стимулах, требующих адаптивных реакций. Развитие атеросклероза является таким стимулом, при котором, основные адаптивные события происходят именно в интима артерий. И окислительный стресс при этом – неотъемлемый спутник в ходе атерогенеза, потому как макрофагальные реакции респираторного взрыва являются основным инструментом нормализации гомеостаза. На Рисунке 6 А) и Б) показаны начальные стадии атеросклероза, полученные в нашем исследовании и характеризующиеся типичным утолщением интимального слоя. При этом, происходит значительное увеличение иммунореактивности интимы против белка SOD3. Микрофотография А) на Рисунке 6, иллюстрирует иммуноактивность против белка SOD3 в интима, при ранней инфильтрации единичными мелкими пенистыми клетками. На данной стадии, утолщенный интимальный слой имел слабое иммуноокрашивание, что соответствует слабой активации экспрессии SOD3. Усиление иммуносигнала против белка SOD3 наблюдалось непосредственно под видоизменяющимся интимальным слоем, т.е. в медики. Далее, на стадии дальнейшего увеличения макрофагальных пенистых клеток и жировых отложений в интима, наблюдалось усиление сигнала иммуноокрашивания не только в медиальном слое, непосредственно под внутренней эластической мембраной, но и самого интимального слоя (Рисунок 6, Б)). Учитывая, что экспрессия белка SOD3 у человека индуцируется в ответ на увеличение цитокиновых медиаторов воспаления [235] и на снижение синтеза и/или биодоступности вазоактивного фактора NO [236], это дает основание полагать, что биологическое действие этого белка при атеросклерозе начинается в интактном медиальном слое, подстилающим

непосредственно интимальный слой. Объяснений наблюдаемому нами субинтимальному иммуноокрашиванию против SOD3, на ранних стадиях атеросклероза, в литературе не отмечено. Классическое понимание оксидоредуктазной активности белка SOD3, направленной на защиту от O_2^- , не дает исчерпывающего объяснения данному наблюдению. Однако, в литературе давно имеются исследования, подчеркивающие не защитную, а регуляторную роль антиоксидантного белка SOD3, в том числе и при развитии атеросклероза [68] [237] [238]. Показано, что его регуляторная роль опосредована активацией сигнальных путей MAPK (таких, как Ras-Erk1/2 и MEK1/2, ERK1/2, Akt) в клетках. Результатом активации данных путей передачи сигналов является повышение выживаемости, пролиферации и подвижности клеток. Стимулирующее влияние сигнальных путей ERK, активированных посредством белка SOD3, также, задействовано в активации нормального процесса роста сосудов – неоангиогенезе [239]. Исследования демонстрируют, что SOD3 косвенно способствует активации рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR) на мембране клеток, через усиление способности лиганда VEGF фосфорилировать VEGF-R. Активация внутриклеточных сигнальных путей, таким образом, осуществляется внеклеточным SOD3, основная дисмутационная функция которого происходит в межклеточном матриксе. Авторы показывают, что действие фермента SOD3 все-таки ограничивается локальной активностью, и, O_2^- и H_2O_2 выступают здесь в качестве вторичных мессенджеров в передаче клеточных сигналов. H_2O_2 является довольно реактивной молекулой, и антиоксидантная дисмутационная активность SOD3 не кажется логичным завершением его протективного действия в норме и при патологии. К тому же, во внеклеточном матриксе нет специализированных внеклеточных антиоксидантных глутатионпероксидаз, способствующих деактивации молекул H_2O_2 . В 2015 году, исследования Mikko O. Laukkanen с соавторами, также, показали, что SOD3-опосредованная дисмутация O_2^- , может затрагивать сигнальные пути пролиферации/деления/миграции клеток, через мембранные рецепторы тирозиновых киназ и малых ГТФаз. Ученые предполагают, что активация этих путей осуществляется именно посредством генерации вторичного мессенджера H_2O_2 , выступающего в качестве лиганда для мембранных ГТФаз. А потому, биологически не целесообразно полностью лимитировать O_2^- антиоксидантным действием SOD3. Тем более, что для генерации полноценного сигнала требуется определенное количество соответствующего субстрата. Поэтому, вероятно, первичная активация SOD3 в медиальном слое направлена на регуляцию именно этих процессов в нормальных гладкомышечных клетках, при развитии воспаления в интимае. Исследования показали, также, что стимуляция пролиферативных сигнальных путей является дозозависимой, и при нормальной физиологической экспрессии SOD3, индукция роста и деления клеток положительная. Но, при индуцированной экспрессии SOD3, активация деления и пролиферации тормозится, вплоть до полной остановки [240]. Исходя из выше сказанного, развивающееся

воспаление в интиме с генерацией супероксидного радикала O_2^- макрофагами и уменьшение биодоступности NO^- , могут инициировать, посредством цитокинов, экспрессию SOD3 у гладкомышечных клеток и макрофагов медиального слоя, для регуляции (подавления) именно ростовых и пролиферативных свойств близлежащих клеток - ГМК. Данное предположение подтверждается еще и тем, что усиление экспрессии SOD3 подавляет развитие неоинтимы в сосудах сердца – главного спутника атеросклероза [238] [241].

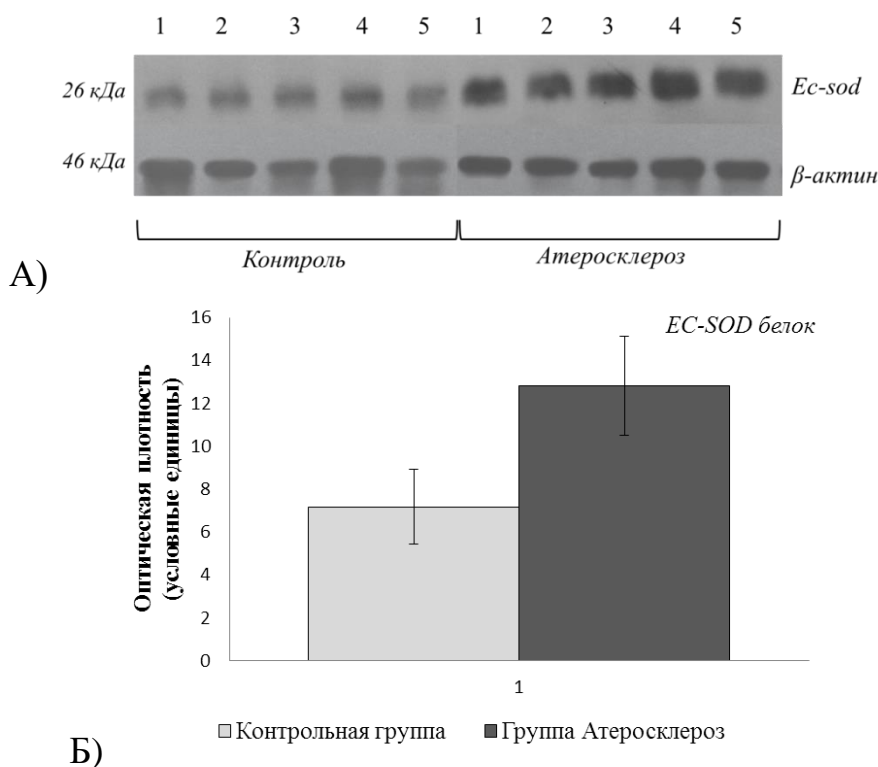
С прогрессированием атеросклеротических изменений, иммунореактивность против белка SOD3, как правило, возрастала в интимальном слое (Рисунок 6, в) и г)). На Рисунке 6, г), показана прогрессивная стадия атероматоза со значительной инфильтрацией интимального слоя пенистыми клетками. Местами истонченный внеклеточный матрикс, между пенистыми клетками, иммуноокрашен против SOD3. Интенсивность сигнала несколько усиливается по мере приближения к внутренней эластической мембране. На еще более поздних стадиях атеросклероза, с образованием очагов некротического поражения липидной бляшки и увеличением размеров пенистых клеток, интенсивность иммуносигнала в интиме либо оставалась на прежнем уровне, либо снижалась. Такая экспрессионная картина белка SOD3 в интиме артерий вполне соответствует имеющимся литературным данным, полученным на мышах/кроликах и человеке. Так, при длительном течении атеросклероза, экспрессия внеклеточного SOD3 постепенно снижается, тем самым, способствуя дальнейшей манифестации и ухудшению заболевания [242]. На стадиях некротического разрушения и кальцификации атероматозной бляшки экспрессия SOD3 может практически полностью подавляться с течением времени [243] [243] [244]. Данные наблюдения проведены у мышей, белых кроликов и человека. Согласно нашим данным, полного подавления иммуноокрашивания против белка SOD3 не наблюдалось. Уменьшение иммуносигнала против SOD3, наблюдаемое в единичных бляшках, связано больше с истончением внеклеточного матрикса, из-за чрезмерной инфильтрации пенистыми клетками, чем с подавлением экспрессии SOD3. Так как, близлежащие участки тканей интимы, где внеклеточный матрикс все еще занимает определенное пространство между пенистыми клетками, дают интенсивный иммуносигнал против SOD3. И, как показывают исследования Jukka S. Luoma с соавт., основным источником экспрессии SOD3 здесь служат активированные макрофаги, и в меньшей степени гладкомышечные клетки [243].

На некоторых прогрессивных атеромах хорошо прослеживается постепенное перерождение нормальных гладкомышечных клеток (ГМК) в пенистые (Рисунок 6, Д) и Е)). На Рисунке 6, Д) представлена микрофотография иллюстрирующая сравнительное иммуноокрашивание против SOD3 в видоизмененном интимальном и медиальном слоях. Процесс атерогенеза находится на стадии, когда интима утолщена и заполнена пенистыми клетками, при незначительном перерождении ГМК медиального слоя. На этой стадии, иммуноокрашивание медики имеет интенсивный, но не

сплошной сигнал. В основном, интенсивно окрашиваются участки с мелкими единичными пенистыми клетками. При дальнейшем перерождении ГМК, процесс захватывает все больше нормальных гладкомышечных клеток медиального слоя, с постепенным видоизменением глубже лежащих слоев меди (Рисунок 6, Е)). Черной линией показано направление перерождения ГМК от интимального слоя к глубже лежащим слоям медиального. Внеклеточный матрикс положительно окрашивается против белка SOD3 по всей меди, но меньшей интенсивности, по сравнению с аналогичным видоизменением интимы. Известно, что ГМК артерий среднего и крупного размеров являются их основным составляющим компонентом, которые при прогрессировании атеросклероза активно взаимодействуют с клетками иммунной системы, макрофагами. При этом, как показывают исследования, некоторые из этих взаимодействий способствуют дальнейшему росту бляшек, тогда как другие, наоборот, уменьшают размер и клеточный состав атеросклеротических бляшек [245] [246]. ГМК проявляют высокой степени фенотипическую пластичность, в ответ на повреждение сосудов, посредством изменения экспрессии многих генов. В результате, популяции этих клеток трансформируются от сократительного фенотипа к синтетическому, и начинают активно участвовать в процессах воспаления, делясь и мигрируя в интиму [247]. В интиме, активированные ГМК выделяют различного рода провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6) и фактор некроза опухоли α (TNF- α), трансформируясь при этом в макрофагальные клетки [248]. Вместе с инфильтрированными макрофагами ретикулоэндотелиального происхождения (моноциты крови), они могут активно фагоцитировать модифицированные и окисленные ЛПНП, гиалуронан и версикан [249]. Активный захват ЛПНП макрофагами, порождает фенотип пенистых клеток интимы, который и наблюдается на микрофототорграфиях в различных исследованиях, в том числе и наших. Располагаясь в интиме довольно хаотично, пенистые клетки, имеют более менее перпендикулярную ориентацию (продольная ориентация) (Рисунок 6, Б), В), Г)). В отличие от интимальных пенистых клеток, пенистые клетки меди, имеют довольно упорядоченное расположение, занимая перпендикулярную ориентацию в пределах каждого слоя эластических волокон меди (Рисунок 6, Е)). Складывается картина постепенного перехода процесса пенистификации от интимального слоя на медиальный. Пенистые клетки, наблюдаемые в медиальном слое, довольно редкое явление и может быть ассоциировано с процессом ремоделирования артерий [250]. Как показывают авторы исследования, процесс истончения и инфильтрации медиального слоя пенистыми клетками связан с т.н. инвазией интимальной атероматозной бляшки. При этом, процесс характеризуется определенными структурными изменениями медиального слоя: миграцией интимальных макрофагов, с активированной экспрессией матриксных металлопротеиназ, под воздействием последних происходит деградация эластических и коллагеновых волокон меди и частичная деградация внутренней эластической мембраны, пролиферацией ГМК меди и прилегающего адвентиция. Полученные данные в нашем

исследовании, не показывают какой-либо существенной деградации внеклеточного матрикса и коллагеновых волокон между пенстыми клетками меди. В противоположность, отчетливо наблюдаются продольные коллагеновые волокна меди, придающие пенстым клеткам определенную структурированность в пространственном расположении. Интенсивное иммуноокрашивание SOD3, также, показывает наличие внеклеточного матрикса, между пенстыми клетками. Наблюдения в нашем исследовании, по-видимому, показывают стадии инвазии интимального воспаления в медиальный слой до разрушения коллагеновых волокон и внеклеточного матрикса. Так же, не отмечено значительного уменьшения количества пенстых клеток в меди, как показано исследованиями M. Shiomi с соавт. [250].

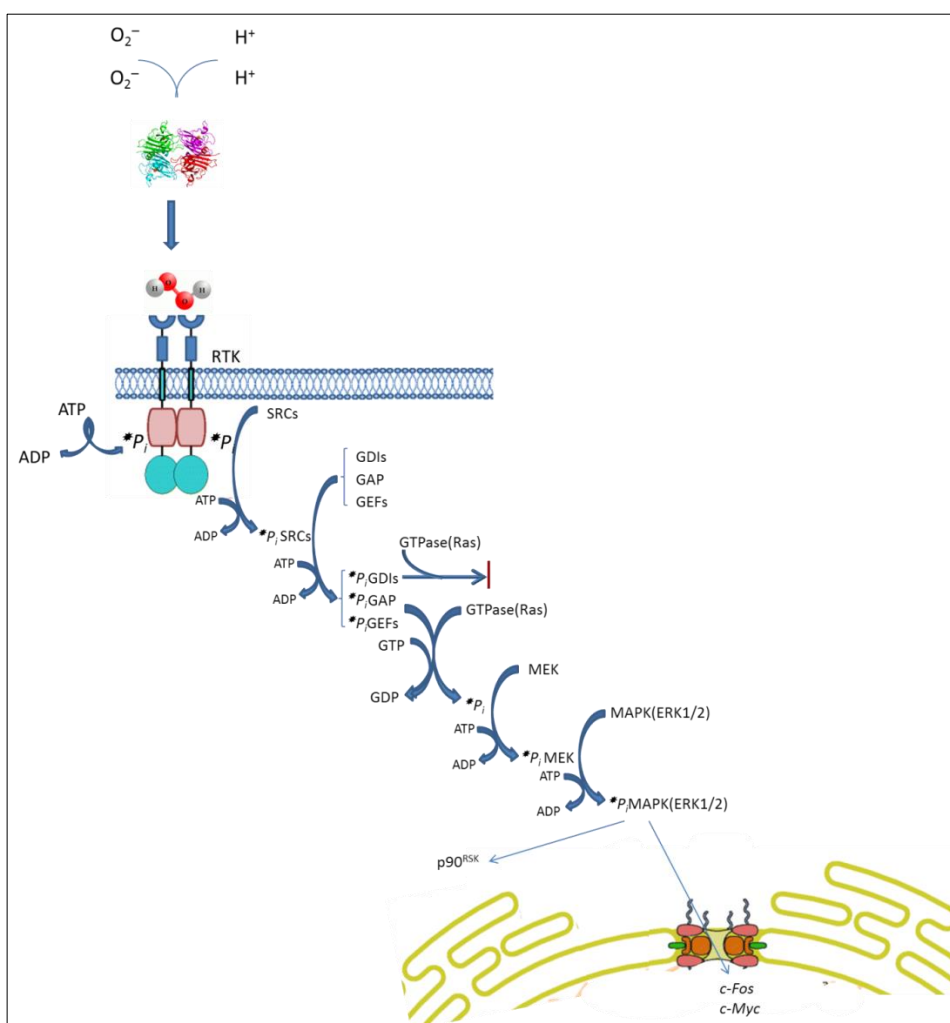
Сравнение уровня экспрессии белка SOD3 в нормальных и пораженных атеросклерозом артерий было также исследовано методом Вестерн-блоттинга. Полученные данные показали наличие фрагментов белка SOD3 в районе ожидаемого молекулярного веса, согласно используемому маркеру (Рисунок 7, А)). Денситометрический анализ показал достоверное увеличение экспрессии белка SOD3 в группе атеросклероза, по сравнению с контрольной группой (Рисунок 7, Б)).



А) – авторадииограммы экспрессии белка SOD3 полученные от контрольной группы кроликов и от группы с атеросклерозом. Б) – денситометрический анализ результатов авторадииограмм по белку SOD3, $p=0.000$.

Рисунок 7 – Изучение экспрессии белка SOD3 методом Вестерн-блоттинга, в нормальных и пораженных атеросклерозом артериях

Таким образом, видно, что на ранних стадиях атеросклероза, активация экспрессии внеклеточного белка SOD3, происходит в медиальном слое. Экспрессия имеет довольно ограниченную область распространения, прилегающую непосредственно к интиме (внутренней эластической мембране), и, по-видимому, связана с активацией сигнальных путей, участвующих в регуляции пролиферативных и синтетических свойств ГМК/эндотелиоцитов (Рисунок 8). H_2O_2 , образующийся в ходе дисмутации O_2^- , осуществляемой SOD3, может выступать в качестве внеклеточного лиганда для мембранных рецепторов ГМК/эндотелиоцитов. При дальнейшей прогрессии атеросклероза, экспрессия SOD3 активируется во всем интимальном слое и сохраняется, по-видимому, пока есть внеклеточный матрикс. При его деградации, происходит снижение экспрессионной активности белка SOD3.



Генерация H_2O_2 -опосредованного сигнала происходит за счет рецепторных тирозинных киназ (RTK), активация которых осуществляется за счет белково-рецепторной реорганизации липидных рафт/кальвеол в клетках-мишенях в условиях воспаления.

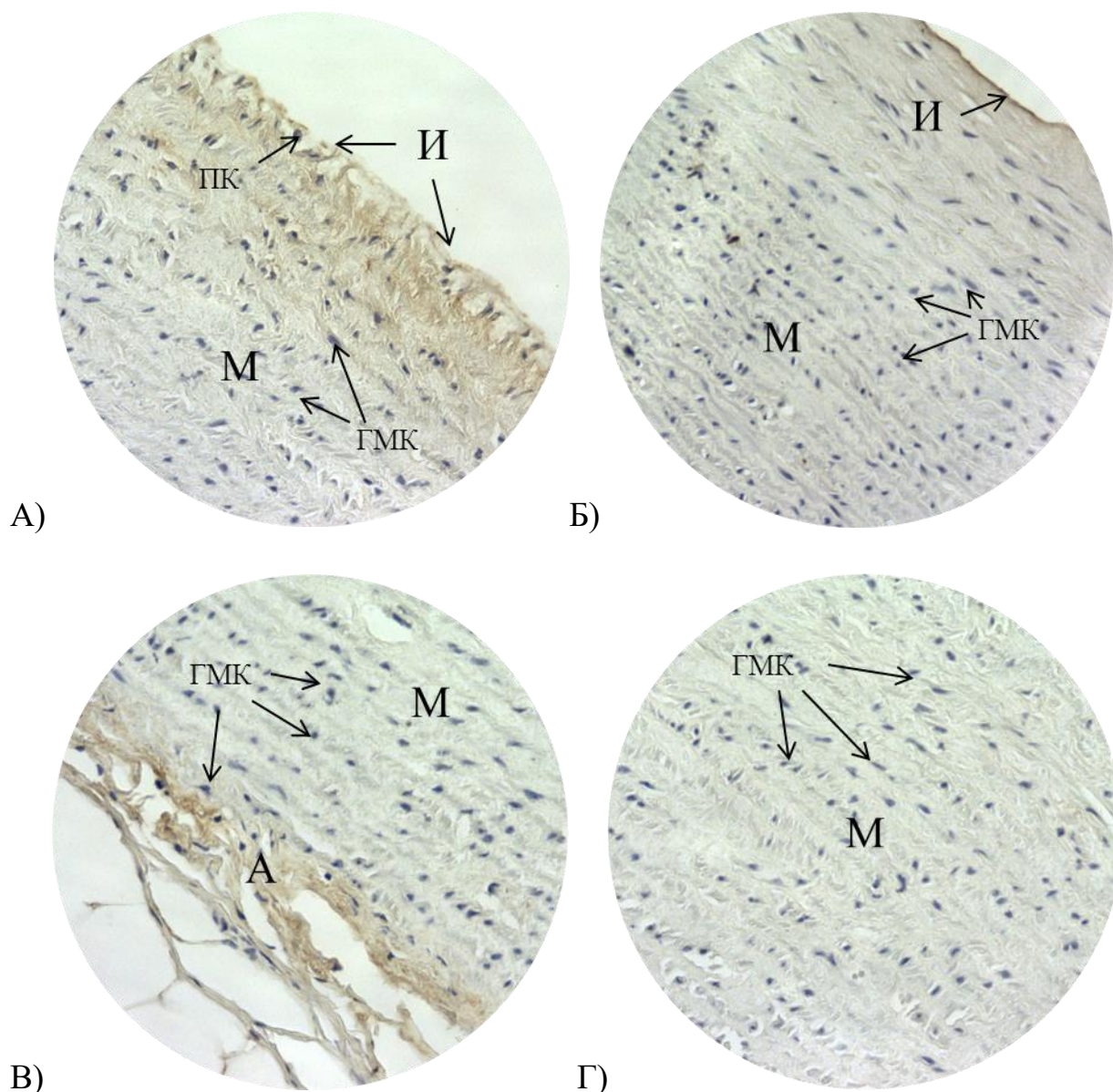
Рисунок 8 – Схема сигнального пути, активируемого посредством H_2O_2 в клетках-мишенях сосуда

3.2.3 Изучение экспрессии антиоксидантного белка GPX1 (GSH-Px1) при развитии атеросклероза у кроликов

GPX1 является универсальным внутриклеточным глутатион-зависимым антиоксидантом для многих клеток организма. Уменьшение его экспрессии и активности ассоциировано с повышенным риском развития ССЗ и ИМ [251], а также, атерогенезом сонных артерий [252]. В данной работе была проведена иммуногистохимическая идентификация локализации экспрессии белка GPX1 в стенке артерий кроликов в норме и при развитии атеросклероза. Анализ был выполнен на разных стадиях развития атеросклеротической бляшки, с целью проследить динамику экспрессии GPX1 белка, по мере усиления липопротеидной инфильтрации интимального слоя пенными клетками.

Имуногистохимическое окрашивание белка GPX1 было изучено на 20 образцах серийных срезов тканей аорты, полученных от 10 кроликов. 10 срезов тканей аорты были получены от 5 кроликов из контрольной группы и 10 срезов тканей аорты от 5 кроликов из опытной группы, с индуцированным атеросклерозом. Таким образом, от одного кролика исследовались по два образца серийных срезов различных участков тканей аорты. Серийные срезы включали различные стадии развития атерогенного воспаления стенки аорты (жировые полосы, стадии промежуточного воспаления, атеромы). Иммуногистохимический сигнал был получен на срезах тканей аорты как контрольной, так и опытной группы, но с различной интенсивностью. На Рисунках 8 и 9, представлены микрофотографии, полученные на серийных срезах тканей аорты, отражающих экспрессионную картину белка GPX1 у кроликов в норме и при атеросклерозе.

Для образцов срезов тканей аорты, полученных от контрольной группы кроликов, характерно слабое или вообще отсутствующее иммуноокрашивание различных слоев сосуда (Рисунок 9).



На микрофотографиях срезов тканей аорты, полученных от разных кроликов, представлена слабая или отсутствующая иммунореактивность к белку GPX1. А) иммунореактивность субэндотелиального слоя аорты при наличии незначительных жировых полосок, у контрольного животного ($\times 40$); Б) отсутствующая иммунореактивность медиального и слабая интимального слоев ($\times 40$); В) слабая иммунореактивность адвентициального слоя аорты ($\times 40$); Г) отсутствие иммунореактивности в толще медиального слоя ($\times 40$). И – интимальный слой, М – медиальный слой, А – адвентициальный слой, ПК – пенистые клетки, ГМК – гладкомышечные клетки.

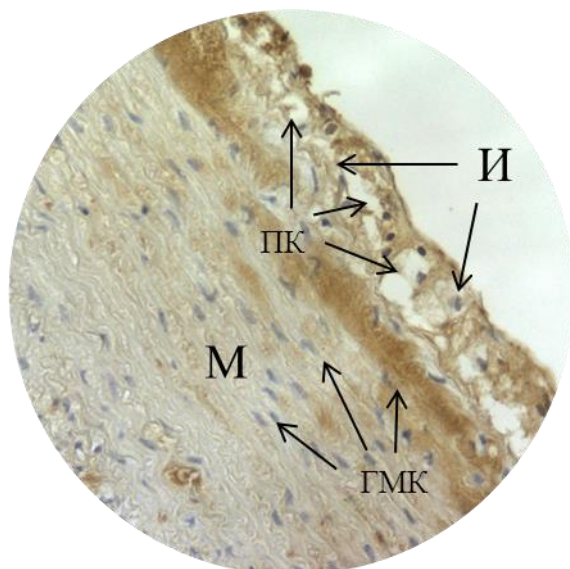
Рисунок 9 – Иммуногистохимическая детекция и локализация эпитопов grx1-антител против белка GPX1 в аорте кроликов в норме

Иммунореактивность слабой интенсивности наблюдалась у одного контрольного животного с незначительными жировыми полосками в аорте. На срезах, иммунореактивность была отмечена не только в интимальном слое, но и в субинтимальном слое диффузного характера (Рисунок 9, А).

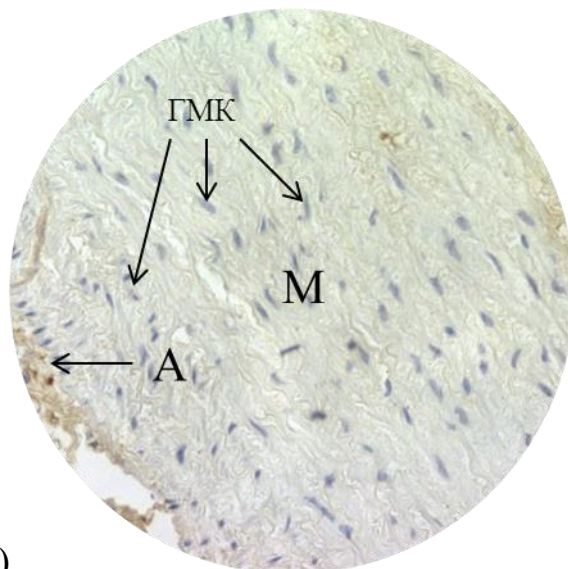
Медиальный слой артерий оставался интактным у всех контрольных животных, визуально не проявляя иммунореактивности против белка GPX1 (Рисунок 9, Б, Г).

Адвентициальный слой, как и в случае с EC-SOD, местами имел слабый позитивный иммуносигнал против GPX1 (Рисунок 9, В). Так как, внутриклеточный белок GPX1 является стресс-чувствительным, его экспрессия в адвентициальном слое может быть вызвана реакциями механического окислительного стресса. Но, как показывают исследования, при механическом повреждении тканей, ремоделирование внеклеточного матрикса приводит к подавлению прохождения сигналов от транскрипционных факторов Nrf2/ARE, опосредуя таким образом супрессию белка GPX1. Patrick J. Pagano с соавт., обнаружили наличие постоянной экспрессии супероксидного радикала O_2^- адвентициальными фибробластами в нормальной аорте кроликов. Адвентициальный O_2^- синтезируется конститутивными НАДФН-оксидазами и выступает в роли своеобразного барьера для NO [253]. Кроме того, эта группа ученых обнаружила, что ангиотензин II может усиливать активность синтеза супероксидного радикала [254]. Наличие слабой иммунореактивности адвентиция в нашем исследовании, возможно, связано именно с конститутивным синтезом O_2^- при нормальных физиологических условиях, происходящих в аорте кроликов. Синтез O_2^- во внеклеточное пространство, сопряжен с его потенциальным повреждающим действием на клетки и их мембраны, даже после его дисмутации до H_2O_2 . H_2O_2 в силу своих физико-химических свойств может легко диффундировать сквозь мембраны адвентициальных клеток, повреждая их, и вызывать перекисное окисление липидов с последующей активацией внутриклеточного GPX1. Механико-окислительный стресс также может быть потенциально вовлечен в этот процесс, однако степень его вовлеченности, по-видимому, разная.

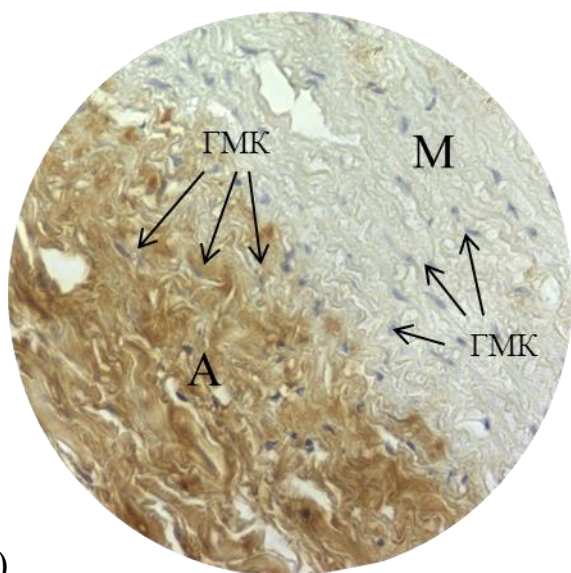
Для образцов срезов тканей аорты, полученных от группы кроликов с индуцированным атеросклерозом, было характерно усиленное иммуноокрашивание, интенсивность которого варьировалась в зависимости от стадии атеросклеротического поражения. Повышенный иммуносигнал против GPX1 был отмечен для всех слоев сосудистой стенки (Рисунок 10).



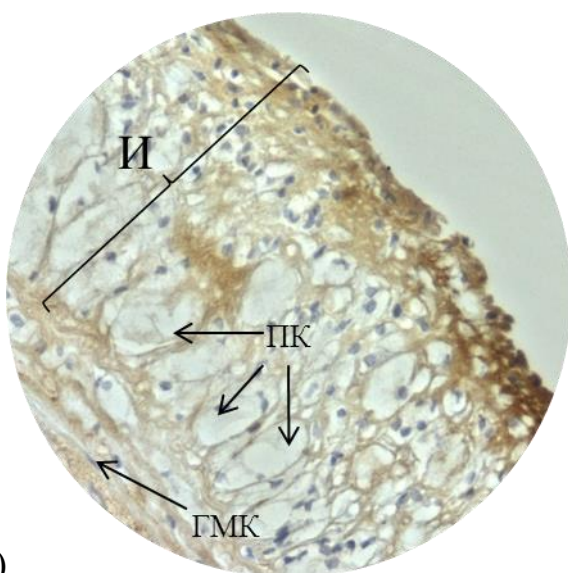
А)



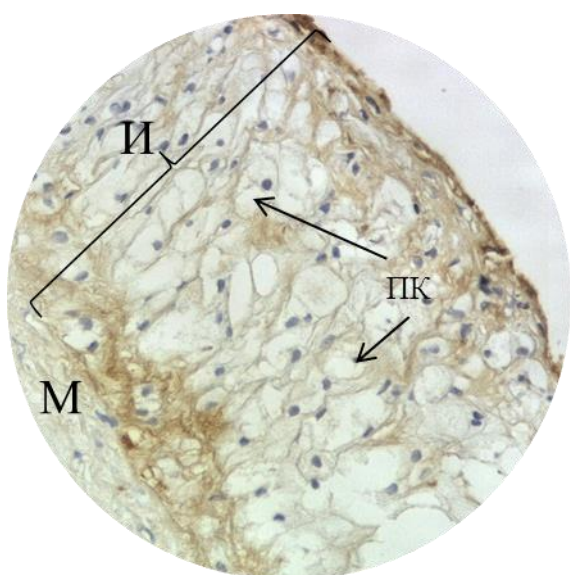
Б)



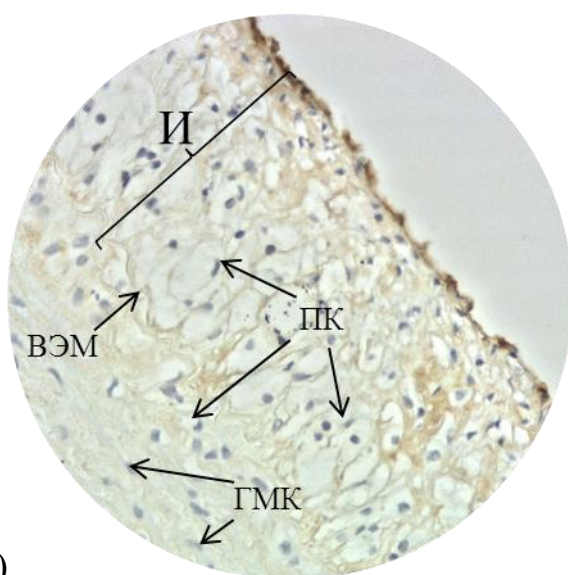
В)



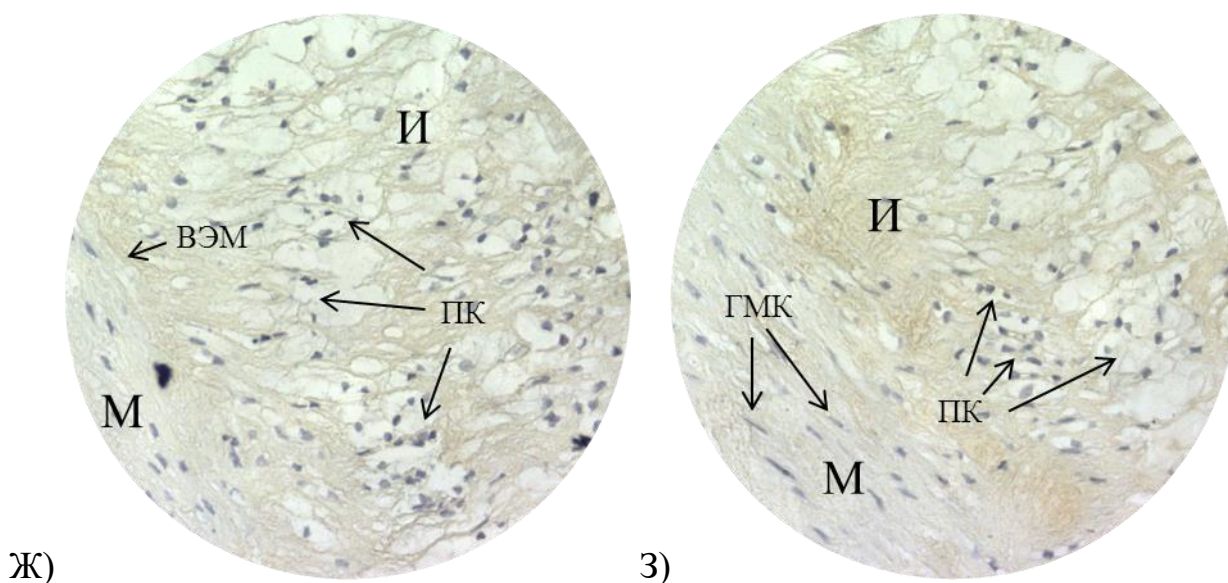
Г)



Д)



Е)



Ж) Стадия начального липоидоза с незначительным отложением липидных пятен и полосок. Выявляются единичные пенистые клетки. Усиление иммуносигнала в субинтимальном слое ($\times 40$); Б) иммуноокрашивание белка GPX1 в толще медиального слоя ткани аорты; В) иммуноокрашивание белка GPX1 в адвентициальном слое ткани аорты; Г) иммуноокрашивание белка GPX1 в участке ткани аорты с начальным липоидозом, переходящим в липосклероз, с увеличением количества пенистых клеток ($\times 40$); Д) иммуноокрашивание белка GPX1 при липосклерозе, с многочисленными субэндотелиальными пенистыми клетками. Экспрессия белка GPX1 более выражена в субинтимальном слое, по сравнению с интимальным ($\times 40$); Е) угасание иммуноокрашивания белка GPX1 при прогрессирующей стадии атероматоза, с инфильтрацией интимального слоя пенистыми клетками больших размеров ($\times 40$); Ж) сравнительная экспрессионная картина белка GPX1 в интимальном и медиальном слоях, на стадии липосклероза ($\times 40$); З) угасание иммунореактивности против белка GPX1 в интимальном слое, при прогрессирующей стадии атероматоза. Отмечается инфильтрация медики пенистыми клетками ($\times 40$). И – интима, М – медиальный слой, А – адвентициальный слой, ВЭМ – внутренняя эластическая мембрана, ПК – пенистые клетки, ГМК – гладкомышечные клетки.

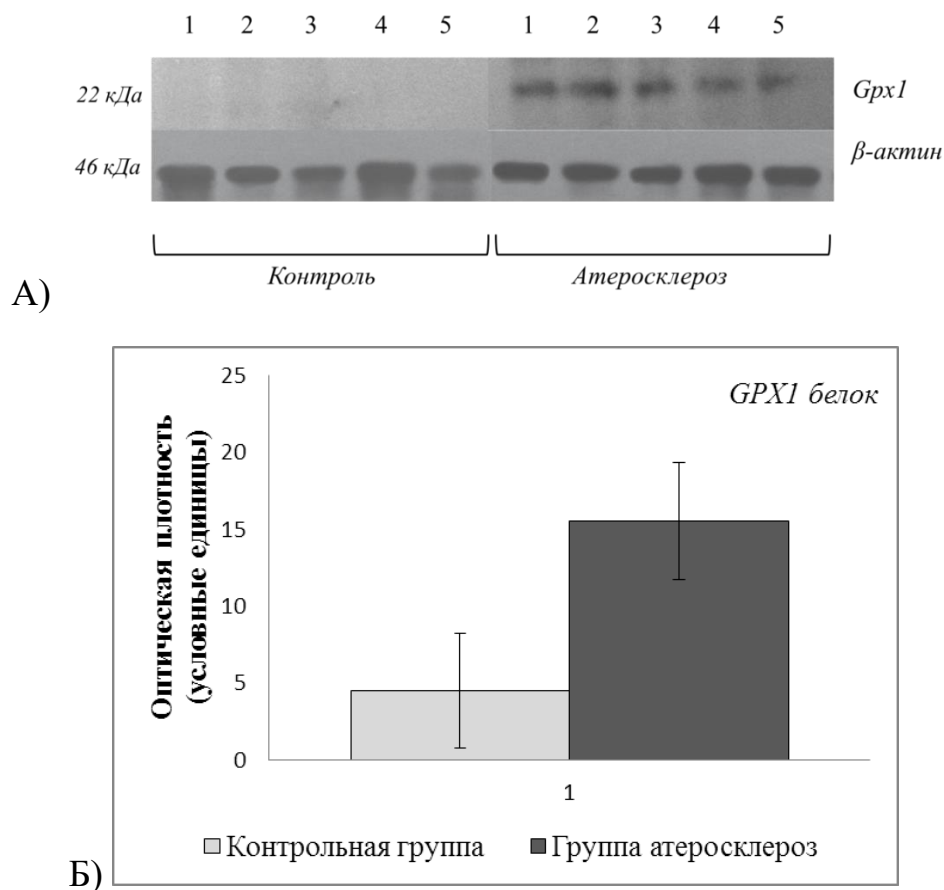
Рисунок 10 – Иммуногистохимическая детекция и локализация эпитопов gpх1-антител, против белка GPX1, в аорте кроликов при индуцированном атеросклерозе

На ранних атеросклеротических повреждениях, при заметной инфильтрации интимы пенистыми клетками и утолщении субэндотелиального слоя, значительно возрастает иммунореактивность против белка GPX1 на гистологических срезах. При этом, интенсивный иммуносигнал локализуется как в самой интиме, так и в медиальном слое, подстилающим внутреннюю эластическую мембрану и, соответственно, интиму. Иммуносигнал в медиальном слое ослабевает по мере удаления от интимы, но полного подавления иммунореактивности против GPX1 не происходит в толще медиального слоя (Рисунок 10, А, Б).

Адвентициальный слой уже на стадии липидных пятен дает интенсивный иммуносигнал против белка GPX1 (Рисунок 10, В). Сигнал наблюдается по ходу всего адвентициального слоя, не зависимо от механической поврежденности ткани. Возможно, такая активация экспрессии GPX1 связана с повышенной генерацией O_2^- в адвентициальном слое, посредством мембранных НАДФН-оксидаз. Известно, что в условиях атеросклероза, адвентициальные клетки увеличивают экспрессию генов семейства *NOX* (1, 2, 4), а также гена *P22-PHOX* [255], которые ответственны за синтез различных НАДФН-оксидаз и их субъединиц. Супероксидная активация ведет к увеличению экспрессии молекул адгезии и соответствующему хемотаксису лейкоцитов в пораженную атеросклерозом ткань. В частности, преобладание ренин-ангиотензиновых компонентов (ангиотензин II) над NO в сосудистой стенке при атеросклерозе, активирует экспрессию генов *NOX2* и *4* в адвентициальных фибробластах человека [256]. Образующийся при этом O_2^- может активно дисмутироваться внеклеточным белком SOD3 до H_2O_2 , принимая участие либо в паракринной регуляции вазорелаксации, либо в усилении сигнальных путей окислительного стресса. Активация окислительного стресса может осуществляться либо через рецепторы описанные в разделе 3.2.2, либо через пассивную диффузию H_2O_2 сквозь клеточные мембраны (повреждая их), вызывая активацию белка GPX1 и глутатион-опосредованных путей. Возможно, наблюдаемая в нашем исследовании, иммунореактивность адвентициального слоя против GPX1 опосредована активацией глутатион-опосредованных путей, в ответ на повреждения клеточных мембран H_2O_2 .

Стадии атером характеризуются уменьшением иммунореактивности тканей интимы, меди и адвентиция против белка GPX1, что говорит о снижении его экспрессии при значительной инфильтрации пенстыми клетками (Рисунок 9, Г, Д, Е, Ж, З). Полученные данные согласуются и дополняют имеющиеся в литературе не многочисленные исследования [252]. На данный момент, предполагаемый механизм и сигнальные пути репрессии белка GPX1, на поздних стадиях атеросклероза, не совсем понятны. Учитывая его исключительно важную и неоднократно экспериментально проверенную положительную взаимосвязь с противоатеросклеротическим действием [257] [258], данное явление вызывает неподдельный интерес.

Сравнение уровня экспрессии белка GPX1 в нормальных и пораженных атеросклерозом артерий было также исследовано методом Вестерн-блоттинга. Полученные данные показали наличие фрагментов белка GPX1 в районе ожидаемого молекулярного веса, согласно используемому маркеру (Рисунок 11, А)). Денситометрический анализ показал достоверное увеличение экспрессии белка GPX1 в группе атеросклероза, по сравнению с контрольной группой (Рисунок 11, Б)).



А) – Авторадиограммы экспрессии белка GPX1, полученные от контрольной группы кроликов и от группы с атеросклерозом. Б) – Денситометрический анализ результатов авторадиограмм по белку GPX1, $p=0.000$.

Рисунок 11 – Изучение экспрессии белка GPX1 методом Вестерн-блоттинга, в нормальных и пораженных атеросклерозом артериях

Таким образом, при атеросклерозе экспрессия GPX1 увеличивается в основном только на ранних стадиях. При прогрессировании атеросклероза, экспрессия падает, что соответствует имеющимся литературным данным, на сонных артериях человека. Кроме того, адвентициальный слой также имел ярковыраженную иммунореактивность против белка GPX1 на ранних стадиях атеросклероза. что может указывать на важную роль антиоксидантную и/или регуляторную функцию белка GPX1 в адвентициальном слое сосуда.

По теме раздела опубликована статья: L.A. Skvortsova, A. Ahsan, Z.A. Berkimbayeva, E.M. Khussainova, B.O. Bekmanov, A.T. Mansharipova, L.B. Djansugurova. Immunohistochemistry of extracellular SOD and GPX1 enzymes in rabbit atherosclerotic lesions // Вестник КазНМУ. №3. 2018. С. 203 – 207 [259]

3.1 Генетико-эпидемиологические исследования методом «случай-контроль»

3.1.1 Анализ клинического материала и анкетных данных для исследования

За время проведения исследования, для когорты пациентов с ИБС (опытная группа) было собрано 360 образцов крови, в вакуумных пробирках с антикоагулянтом ЭДТА. Для когорты условно здоровых людей (контрольная группа) был собран 341 образец крови, в вакуумных пробирках с антикоагулянтом ЭДТА. Все пробирки с кровью проверялись на целостность и отсутствие сгустков при поступлении в лабораторию молекулярной генетики, и нумеровались согласно внутреннему коду. Кодовые данные, одновременно, заносились в соответствующие анкеты и электронную базу в формате Microsoft Excel 2010. В электронную базу данных, так же, включали сведения об основном диагнозе и сопутствующих заболеваниях, этнической принадлежности, важных для ИБС физиологических параметрах (возраст, давление, общий холестерин), вредных привычках (алкоголь, курение) и образе жизни (Приложение А). Вся индивидуальная информация по каждому участнику, занесенная в электронную базу данных, основывалась на предоставленных анкетных данных.

В эпидемиологических исследованиях методом «случай-контроль», отбор и анализ когорт имеет решающее значение для всех дальнейших результатов. Эти группы должны быть сопоставлены друг с другом по многим параметрам, чтобы обеспечить более надежную связь с развитием заболевания и избежать нежелательных воздействий других влияющих факторов. Поэтому, для данного исследования, сбор биоматериала осуществлялся 1) в одной географической зоне г. Алматы и 2) при постоянном мониторинге индивидуальных данных уже собранного биоматериала. Второй пункт необходим был для изначального равновесного отбора участников в обе группы по этнической принадлежности, возрасту, полу, курению и отсутствию сопутствующих воспалительных заболеваний.

В случае с клиническими параметрами, важными для развития ИБС, нам были доступны данные только по уровню общего холестерина в крови и артериальному давлению (Таблица 8). Уровень общего холестерина 5,02 mmol/L был взят в качестве порогового между нормальным и патологическим уровнем. Поэтому, при сборе биоматериала, в группу ИБС, изначально, отбирались только участники с уровнем общего холестерина выше 5,02 mmol/L, а в группу контроля только с уровнем ниже порогового. Последующий анализ этих данных показал статистически значимое различие среднего уровня общего холестерина между обеими группами. Несомненно, учет данных по развернутому липидному спектру крови (ЛПНП, ЛПВП, триглицериды) повышает точность анализа ассоциативных связей. Однако, такие, более подробные сведения о пациентах и здоровых участниках, нам не были доступны, поскольку данные не были предоставлены врачами.

Общепринятая норма для артериального давления (АД) составляет 120/60 мм.рт.ст. При отборе биоматериала, в группу с ИБС включали участников,

имеющих в анамнезе стойкое периодическое повышение АД выше нормы, тогда как в контрольную группу, людей не имеющих каких-либо проблем с АД.

Для минимизации влияния этнической принадлежности, еще на начальном этапе сбора материала, в группе ИБС и контрольной группе были выделены три основные этнические группы: казахская, русская и представители других национальностей, объединенных в этногруппу азиаты (корейцы, татары, уйгуры, киргизы). За счет постоянного мониторинга сбора и целенаправленного отбора потенциальных участников, по окончании сбора биоматериала, соотношение этнических групп в обеих когортах было практически одинаковым: 63,88% казахов, 26,94% русских, 8,21% других азиатов в когорте ИБС и 69,5% казахов, 19,94% русских, 9,68% других азиатов в контрольной когорте (Таблица 8). Так же, не было выявлено и статистически значимых различий по возрасту, полу и статусу курения между контрольной и ИБС группами ($p > 0,05$ для всех характеристик).

Таблица 8 – Сравнение группы ИБС и контрольной группы по основным критериям

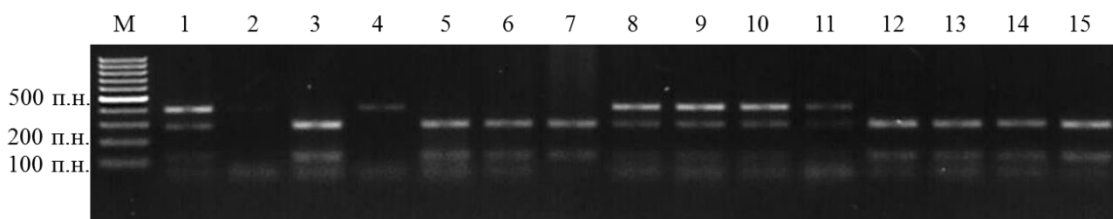
Характеристики		Группа ИБС	Контрольная группа	t_{st}	p value
n		360	341		
Возраст (лет)		1923 – 1970 (60 ± 12.04)	1921 – 1970 (52 ± 13.23)	0.51	0.699
Пол, n (%)	Мужской	91 (25.27)	109 (31.96)	1.628	0.350
	Женский	269(74.72)	232 (68.03)	1.042	0.486
Национальность, n (%)	Казахи	230 (63.88)	237 (69.5)	0.908	0.530
	Азиаты	28 (8.21)	33 (9.68)	0.840	0.555
	Русские	102 (28.32)	71 (20.82)	1.925	0.305
Курение, n (%)	Курящие	41(11.39)	57 (16.71)	1.796	0.323
	Не курящие	319 (88.61)	284 (83.28)	0.758	0.587
Общий холестерин, mmol/L		>5.02 (5.47±0,09)	<5.02 (4.01±0,06)	13.498	0.047
Кровяное давление, мм.рт.ст		>140/90	120/60		

Таким образом, полученные и проанализированные группы пациентов с ИБС и, условно здоровых людей можно считать подходящими для данного молекулярно-эпидемиологического исследования, основанного на методе «случай-контроль».

3.1.2 Генотипирование и логистический регрессионный анализ

3.1.2.1 Изучение полиморфизма Ala58Thr (172 G>A, rs2536512) гена SOD3 и его ассоциация с риском развития ИБС

Важность внеклеточной изоформы супероксид дисмутазы SOD3 для поддержания биодоступности NO в сосудистой стенке и, соответственно, сосудистого гомеостаза, не вызывает сомнений. Антиоксидантная активность этого фермента может регулироваться на различных уровнях, многие из которых остаются мало изученными, в том числе и на генетическом уровне. Учитывая, имеющиеся сведения о важности генетического кода на активность и функционирование фермента SOD3 в сосудистой стенке, нами было изучено влияние полиморфизма SOD3 Ala58Thr, на предрасположенность к развитию ИБС. По литературным данным, однонуклеотидная замена G на A в позиции 172 п.н., гена SOD3, меняющая аминокислоту аланин (GCG⇒Ala) на треонин (ACG⇒Thr), представляет немаловажный интерес для патофизиологии заболеваний ССЗ, после Arg213Gly (rs8192291). Противоречивые данные по функциональной роли данного полиморфизма в развитии различного рода заболеваний, в том числе и ИБС, требуют проведения дополнительных исследований на различных популяциях. В связи с выше сказанным, было проведено генотипирование полиморфизма Ala58Thr, методом ПЦР-ПДРФ и проведен соответствующий ассоциативный анализ с риском развития ИБС. Результаты генотипирования по всем образцам сохранены и архивированы в виде электрофореграмм (Рисунок 11).



М – маркер (GeneRuller 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific, USA);

Дорожка 3, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15 – образцы с генотипом GG (280 и 120 п.н.); дорожка 1, 8, 9, 10, 11 – образцы с генотипом GA (400, 280 и 120 п.н.); дорожка 4 – образец с генотипом AA (400п.н).

Рисунок 11 – Электрофореграмма генотип-специфичных фрагментов рестрикции по полиморфизму Ala58Thr гена SOD3

Согласно проведенному генотипированию, частотное соотношение трех генотипов (GG(Ala/Ala), GA(Ala/Thr) и AA(Thr/Thr)), в исследуемых когортах, согласуются с законом Харди-Вайнберга. Статистическая значимость практически равнозначна, как для контрольной группы ($\chi^2=0,241$, $p=0,886$, $df=2$), так и для опытной группы ($\chi^2=0,499$, $p=0,892$, $df=2$). Распределение генотипов представлено в виде диаграммы на Рисунке 12, а). Сравнение

частотных данных, между контрольной и опытной группами, показывают небольшие различия по распределению генотипов GG(Ala/Ala) и AA(Thr/Thr): так, в контрольной группе, превалирует гомозиготный генотип GG, тогда как в опытной группе гомозиготный генотип AA. Однако, эти различия не превышают пределов статистической достоверности. На Рисунке 12, б), в сравнительном аспекте, представлено распределение частот встречаемости аллелей в группе пациентов с ИБС, контрольной группе и общемировой популяции на основе данных базы NCBI [260].

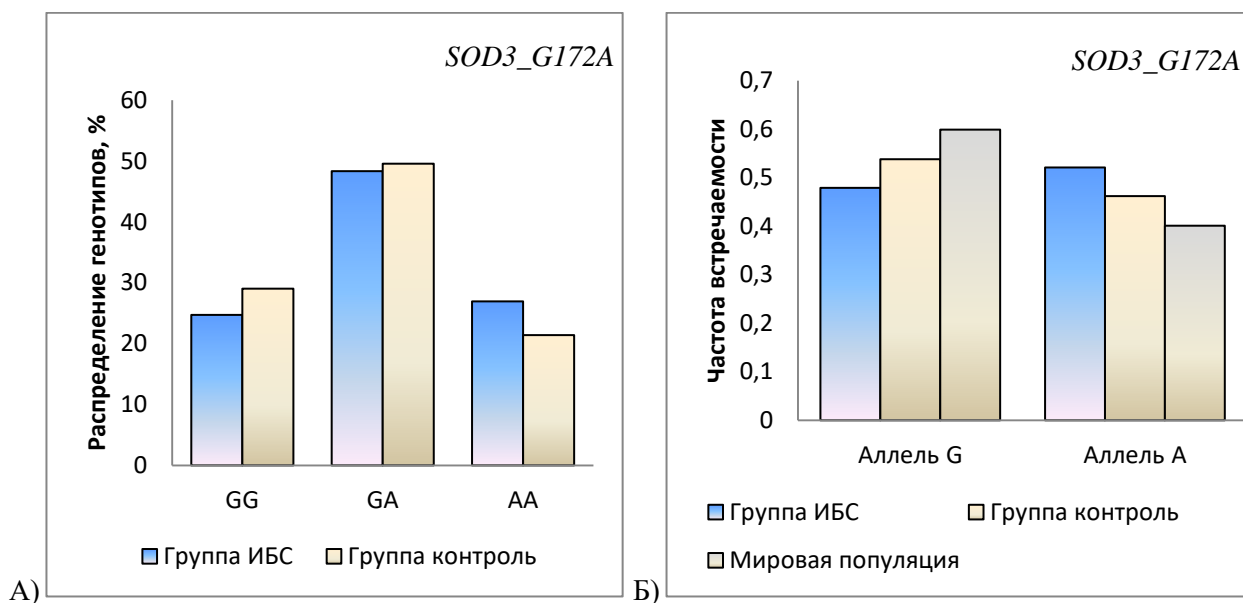


Рисунок 12 – Распределение частот А) генотипов и Б) аллелей по полиморфизму Ala58Thr (с. 172 G/A) гена *SOD3*, в когортах здоровых людей и пациентов с ИБС (контроль $\chi^2=0,241$, $p=0,886$; опыт $\chi^2=0,499$, $p=0,892$). На диаграмме Б) отражены данные частот по аллелям G172A, гена *SOD3*, исследуемой группы ИБС, контрольной группы в сравнении с данными в мировой базе данных NCBI [260]

Для проверки гипотезы роли однонуклеотидной замены в гене *SOD3* с риском развития ИБС был выполнен ассоциативный анализ данных с использованием мультипликативной, общей, доминантной и рецессивной моделей наследования. Принимая во внимание этническую гетерогенность изучаемых групп, статистический анализ ассоциации полиморфизма с развитием ИБС был подсчитан отдельно, как для общей группы, так и для групп по трем основным национальностям.

В Таблице 9 представлены данные относительного риска (OR) влияния полиморфизма Ala58Thr, гена *SOD3*, на развитие ИБС по общей группе.

Таблица 9 – Ассоциации полиморфизма Ala58Thr гена *SOD3* с риском развития ИБС по общей популяции

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
SOD3 Ala58Thr	GG	101	86	0,75 (0,53–1,04)	0,09
	GA	165	173	0,99 (0,73–1,33)	
	AA	75	101	1,38 (0,98–1,95)	
Доминантная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG+GA	266	259	0,72 (0,51–1,02)	0,06
	AA	75	101	1,38 (0,98–1,95)	
Рецессивная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG	101	86	0,75 (0,53–1,04)	0,09
	GA+AA	240	274	1,34 (0,96–1,88)	

Согласно мультипликативной модели наследования, для общей выборки, относительный риск выражен для отдельных аллелей гена *SOD3*: для аллеля 172G (58Ala) – OR=0,79 (CI95%= 0,64 – 0,97, $\chi^2=4,871$, $p=0,02$); для аллеля 172A (58Thr) – OR=1,27 (CI95%= 1,03 – 1,56, $\chi^2=4,871$, $p=0,02$).

Анализ ассоциации отдельных генотипов по общей модели наследования определил повышенный относительный риск влияния гомозигот SOD3 172A/A (OR=1,34; 95%CI=0,95–1,88; $\chi^2=4,447$; $p=0,108$) на развитие ИБС в общей популяции. Однако, полученные данные не являются достоверно значимыми ($p>0,05$) и доминантная/рецессивная модели наследования не увеличивают риск.

Соответствующий анализ с учетом этнической принадлежности выявил ассоциации генотипа SOD3 172G/A с предрасположенностью к ИБС. Так, у казахов (Приложение А, Таблица№ А.1), достоверно повышенный риск, наблюдается согласно рецессивной модели наследования 172G/A+A/A (OR=1,49; 95%CI=1,00–2,21; $\chi^2=3,912$; $p=0,048$), а присутствие аллеля 172G в гомозиготном состоянии 172G/G проявляет протективный эффект (OR=0,67; 95%CI=0,45–1,00; $\chi^2=3,912$; $p=0,048$). Риск для генотипа 172A/A также недостоверно определяется у русской этнической группы (OR=1,71; 95%CI=0,91–3,22; $\chi^2=2,818$; $p=0,244$) (Приложение А, Таблица№ А.2). В противоположность, у азиатов (Приложение А, Таблица№ А.3) риск влияния значительно повышен для 172G/G генотипа (OR=3,11; 95%CI=0,91–10,60; $\chi^2=3,674$; $p=0,1$), отчетливо подтверждающиеся по рецессивной модели наследования (OR=3,11; 95%CI=0,91–10,60; $\chi^2=3,454$; $p=0,06$). Тогда как для G/A+A/A генотипов – протективный эффект (OR=0,32; 95%CI=0,09–1,10; $\chi^2=3,454$; $p=0,06$).

Анализ, с учетом половой принадлежности, показал, что по сравнению с мужчинами, у женщин влияние полиморфизма 172 G/A более выражено и риск достоверно определяется по доминантной модели наследования для генотипа 172A/A (OR=1,59; 95%CI=1,04–2,43; $\chi^2=4,468$; $p=0,031$). Для сочетания генотипов G/G+G/A – протективный эффект (OR=0,63; 95%CI=0,41–0,96; $\chi^2=4,468$; $p=0,031$). У мужчин влияние отдельных генотипов не выражено, и ни одна модель не показала достоверной ассоциации.

Литературные данные о связи Ala58Thr полиморфизма в гене *SOD3* с развитием каких-либо заболеваний, в частности сердечнососудистых, не многочисленны. Показано, что вариация в гене является причиной предрасположенности к раку молочной железы [261], хронической обструктивной болезни легких у взрослых и детей [262], преэклампсии [263], инсулинорезистентности и диабету 2 типа [264], артериальной гипертензии [13, 14, 15]. Однако, функциональная значимость данного полиморфизма до сих пор не выяснена до конца. Полагают, что однонуклеотидная замена 172G>A, ведущая к замене аминокислот Ala58Thr и локализованная в N-терминальной части белка, влияет на тетрамеризацию его гомосубъединиц в нативный гликопротеин и его активность. Так, недавно было показано, что носители гомозиготного генотипа Ala/Ala имеют пониженный уровень активности фермента SOD3 в сравнении с носительством аллеля Thr [265]. Однако, подобной ассоциации не наблюдается в японской популяции, согласно исследованию Iida et al. [266]. Возможно, это связано с этническими особенностями популяционных выборок; возможно, от наличия в тетрамерной структуре фермента активной (aSOD3) и не активной (iSOD3) субъединиц, варьирующих общую активность ферментного комплекса SOD3, как показали исследования Petersen с соавт.[267], и, соответственно, влиять на характер ассоциативных данных. Имеющиеся исследования на конкретных этнических группах, все же, показывают, что в подавляющем большинстве, именно аллель 58Thr ассоциирован с риском развития патологии, например, артериальной гипертензии [268].

Согласно нашему исследованию «случай-контроль» полиморфизм 172G/A (Ala58Thr) ведет себя по разному в зависимости от этнической принадлежности групп, что, может быть, связано как с этнографическими и эволюционными особенностями, так и с образом жизни. Для генотипа 172A/A (Thr58Thr) относительный риск по общей популяции (включая все национальности) несколько повышен, однако данные по моделям наследования не являются достоверно значимыми (OR=1,38; 95%CI=0,98–1,95; $\chi^2=4,722$; $p=0,09$). Более детальный анализ с учетом основных этнических групп, показал тенденцию генотипа 172A/A (Thr58Thr) к увеличению риска ИБС у казахов и достоверно значимые ассоциации получены при рецессивной модели наследования OR=1,54; 95%CI=1,04–2,29; $\chi^2=4,694$; $p=0,03$. В русской этнической группе также генотип 172A/A (Thr58Thr) проявляет повышенные рисковые свойства к ИБС (A/A, OR=1.71, в особенности A/A против G/G+G/A (доминантная модель)), но не достоверно, возможно в связи с числовой

ограниченностью выборки, что требует дальнейшего анализа на большем количестве людей данной национальности. Совершенно противоположные результаты анализа получены для смешанной группы азиатов. Так генотип 172G/G (Ala58Ala) имеет повышенный риск к ИБС (OR=3,11, достоверность повышается при сочетании генотипов G/G против G/A+A/A), тогда как присутствие аллеля 172A (58Thr) увеличивает протективные свойства генотипа (OR=0,52, при G/G против G/A+A/A—OR=0,32). Однако, поскольку данная этническая группа представлена наименьшим числом людей из всех (контроль n=33, опыт n=28), необходимо дальнейшее исследование влияния полиморфизма 172 G/A гена *SOD3* на большей выборке, в пределах этой группы, для получения объективных и статистически значимых данных.

Учитывая полученные данные по азиатской группе, был, дополнительно, проведен ассоциативный анализ общей популяции включающей только две группы: казахи и русские. Мультипликативный анализ показал с высокой достоверностью повышенный риск к ИБС для аллеля 172A (OR=1,37; 95%CI=1,10–1,71; $\chi^2=7,919$, p=0,005). Согласно общей модели наследования присутствие аллеля 172A снижает протекторные свойства генотипа и, для генотипа 172A/A относительный риск составляет OR=1,48 (p=0,023), рецессивная модель (GG против GA+AA) увеличивает риск и достоверность анализируемых данных (OR=1,53; 95%CI=1,07–2,17; $\chi^2=5,570$, p=0,01).

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что однонуклеотидный полиморфизм Ala58Thr (172G/A) гена *SOD3* имеет тенденцию ассоциации к ИБС. Кроме того, анализ показал этническую гетерогенность ассоциации и необходимость проведения дополнительных исследований на больших числовых выборках по каждой из этнических групп в отдельности.

По теме раздела опубликована статья: Л.А. Скворцова, Д.Т. Байжигитова, Э.М. Хусаинова, Л.Б. Джансугурова, Б.О. Бекманов, А.Т. Маншарипова. Роль полиморфизма Ala58Thr внеклеточной супероксид дисмутазы *SOD3* с развитием ишемической болезни сердца в казахстанской популяции.// Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. №4 (316). – 2016. – С. 79 – 85 [269].

Изучение полиморфизма Leu220Leu (718C/T, rs713041) гена *GPX4* и его ассоциация с риском развития ИБС

Серьезный и длительный дефицит микроэлемента селена в организме может стать причиной дисфункции миокарда и ИБС. Механизм этого негативного влияния, на клеточном уровне, остается не выясненным. При этом, семейство ферментов глутатионпероксидаз GSH-Px занимает важнейшее место в биохимии селена в организме. Фермент глутатионпероксидаза GSH-Px4 (GPX4), благодаря уникальным свойствам восстанавливать гидроперекиси липидов, выступает на первое место защиты при повреждениях сердечнососудистой системы, в особенности, при атеросклерозе и ИБС.

Методами молекулярной биологии и биохимии было открыто множество факторов регуляции и биодоступности GSH-Px4 на клеточно-молекулярно-генетическом уровне. На генетическом уровне, такая регуляция может быть опосредована изменением нуклеотидной последовательности в гене. Так, однонуклеотидная синонимическая замена цитозина на тимин T→C в позиции 718 в гене *GPX4*, уже охарактеризована как функциональная. Хотя, накапливающиеся сведения и укрепляют позиции этой замены, как негативно-функциональные, многие аспекты этого влияния пока остаются не до конца открытыми и ясными. В связи с выше сказанным, нами была предпринята попытка проследить эту взаимосвязь с развитием ИБС у жителей Казахстана, методом «случай-контроль».

Анализ метода ПЦР-ПДРФ при генотипировании однонуклеотидного полиморфизма 718C/T в гене GPX4

Генотипирование кандидатного полиморфизма 718C/T, проводили методом ПЦР-ПДРФ, с последующей статистической обработкой полученных данных. Результаты генотипирования сохранялись в цифровом формате изображений, пронумерованы и идентифицированы по генотип-специфичным фрагментам. Фотографии, по каждой партии образцов, архивировались в соответствующих документах.

Аmplификация таргетной последовательности гена *GPX4* сопровождалась одновременным синтезом неспецифических фрагментов, при стандартной температуре плавления праймеров T_m , вычисленной с помощью интернет-приложения T_m Calculator (ThermoFisher Scientific). Несмотря на то, что приложение оптимально вычисляет температуру плавления праймеров, с учетом используемого для реакции готового набора «PCR Master Mix (2X)», одноименной марки ThermoFisher Scientific, избежать появления в ходе реакции ПЦР неспецифических фрагментов не удалось. Возможно, это связано с наличием в геноме человека псевдопоследовательностей, аналогичных последовательности полноценно функционирующего гена *GPX4*. Экспериментальным путем, в ходе постановки ПЦР, были подобраны условия, при которых амплификация неспецифических продуктов либо сводилась к минимуму, либо полностью элиминировалась. T_m праймеров была повышена на 3°C и составила 58°C, время отжига было уменьшено до 15 сек. Кроме того, ДНК образцов предварительно разводилась ddH₂O, до конечной концентрации в 5 нг/мкл.

Анализ результатов генотипирования однонуклеотидного полиморфизма 718C/T в гене GPX4

Согласно результатам генотипирования полиморфизма 718C/T, гена *GPX4*, распределение частот аллелей и генотипов соответствует равновесию Харди-Вайнберга, как в контрольной ($\chi^2=0,000$; $p=1,000$ (df=2)), так и в опытной ($\chi^2=0,031$; $p=0,924$ (df=2)) группах (Рисунок 13, А). Сравнение частот аллелей изучаемых групп с мировыми данными базы NCBI [260], приведены на Рисунке 13, Б). Как видно из представленной диаграммы, распределение частот

обоих аллелей равнозначно как в изучаемой контрольной группе, так и в мировой популяции, приведенной с учетом погрешностей.

Ассоциативный анализ полученных данных был выполнен с применением мультипликативной, общей, доминантной и рецессивной моделей. Принимая во внимание этническую гетерогенность изучаемой популяции, анализ был выполнен как для общей группы в целом, так и для основных этнических групп (Казахи, Русские, другие Азиаты) в отдельности.

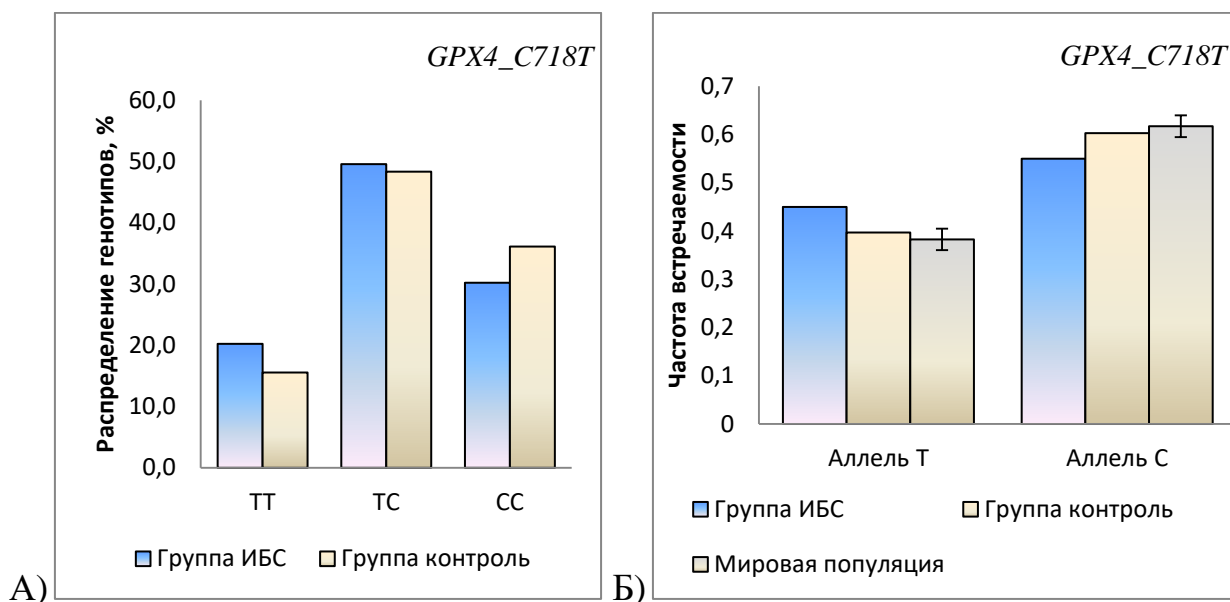


Рисунок 13 – Распределение частот А) генотипов и Б) аллелей по полиморфизму 718С/Т, гена *GPX4*, в когортах здоровых людей и пациентов с ИБС (контроль $\chi^2=0,000$, $p=1,000$; опыт $\chi^2=0,031$, $p=0,924$). На диаграмме Б) отражены данные частот по аллелям 718С/Т, гена *GPX4* в изучаемых группах, в сравнении с мировой базой данных NCBI [260]

В общей популяции мультипликативная модель наследования показывает незначительное повышение относительного риска ИБС для аллеля 718С (OR=1.24, CI95%= 1,00–1,54, $\chi^2=4,02$, $p=0,04$); тогда как аллель 718Т проявляет слабые протективные свойства OR=0.8 (CI95%= 0.65–1.00, $\chi^2=4,02$, $p=0,04$).

Анализ ассоциаций по влиянию отдельных генотипов и их сочетаний на риск развития ИБС в общей популяции показал повышенный риск для генотипа 718СС (Таблица 10). Однако, полученные данные не являются статистически достоверно значимыми ($p>0,05$) по всем моделям наследования.

Соответствующий анализ, с учетом основных этнических групп, пола и курения, так же не выявил достоверно значимых ассоциаций (Приложение В, таблица В.1, таблица В.2). Анализ, с учетом возраста (Приложение В, таблица В.3), показал незначительное повышение относительного риска ИБС для аллеля 718С, в группе старше 45 лет (OR=1.28, CI95%= 1,02–1,62, $\chi^2=4,47$, $p=0,03$), повышающийся по рецессивной модели наследования (СС vs СТ+ТТ: OR=1.43, CI95%= 1,00–2,03, $\chi^2=3,93$, $p=0,04$).

Таблица 10 – Ассоциация полиморфизма 718С/Т гена *GPX4* с риском развития ИБС по общей популяции

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
GPX4 718Т/С	ТТ	69	56	0,73 (0,49–1,07)	0,1
	ТС	169	174	0,95 (0,71–1,28)	
	СС	103	130	1,31 (0,95–1,79)	
Доминантная модель (df=1)					
GPX4 718Т/С	ТТ+ТС	238	230	0,77 (0,56–1,05)	0,08
	СС	103	130	1,31 (0,95–1,79)	
Рецессивная модель (df=1)					
GPX4 718Т/С	ТТ	69	56	0,73 (0,49–1,07)	0,1
	ТС+СС	272	304	1,38 (0,93–2,03)	

Согласно данным различных литературных источников, синонимичная однонуклеотидная замена цитозина на тимин С>Т в позиции 718, гена *GPX4*, демонстрирует определенные функциональные особенности на этапе трансляции мРНК – рРНК – белок. Позиция этого полиморфизма соответствует принципиально важной селен (Se) опосредованной последовательности SECIS (от Selenocysteine Insertion Sequence) в 3'UTR области (белок не кодирующая область на 3'конце мРНК) GPX4мРНК. Для включения в состав *gpx4* Se в виде аминокислоты селеноцистеина (Sec), на этапе синтеза белка, крайне необходимо формирование структуры штоковой петли (stem-loop) как раз таки в районе SECIS. Взаимодействие этой петлевой структуры с транс-активными белками важно для формирования необходимых и достаточных условий для вставки Se в активный центр [270], [271].

Первые попытки раскрытия роли этого полиморфизма были сделаны при оценке активности биосинтеза лейкотриена (LT), через измерение метаболитов 5– липооксигеназы (5-LOX) в лейкоцитах с разными генотипами 718С/Т. Согласно этим данным, лейкоциты с генотипом 718СС имеют повышенный уровень LT, по сравнению с 718ТТ и 718СТ [271]. Позднее, аналогичные результаты были получены для линии раковых клеток эпидермоидной карциномы [272]. Это указывает на возможную роль С718Т замены GPX4мРНК в регуляции метаболизма арахидоновой жирной кислоты (арахидонатный путь), необходимой для синтеза LT и развития последующих стадий воспалительного характера, включая и регуляцию вазодилатации сосудов, что имеет неоспоримо важное значение при повреждении эпителия сосудов атеросклерозом.

Включение Se в состав GPX4мРНК может также определяться и биодоступностью самого Se в клетках. Примечательно, но и в этом случае, 718С/Т показал свое возможное влияние на экспрессию *gpx4* в экспериментах с селен-содержащими веществами на разных типах клеточных линий. Так,

клеточные линии лимфоцитов гомозиготных по 718С аллелю имели стабильные концентрации белка *grx4* после прекращения Se-богатой диеты, по сравнению с гомозиготными носителями 718Т аллеля. В то же время, носители 718Т аллеля демонстрировали меньшую чувствительность к изменениям концентрации Se во время диеты [273]. Однако, аналогичные опыты на линиях эпителиальных клеток показали совершенно противоположные результаты, что возможно связано с различным уровнем вовлеченности фермента *grx4* в реакциях в различных клетках организма [274].

Немногочисленные эпидемиологические ассоциативные работы, проведенные методом «случай-контроль» показывают связь 718С/Т полиморфизма с риском развития некоторых заболеваний. Так, показан повышенный риск аллеля 718С для рака пищевода [275], церебрального инсульта, гипертонической болезни [276] и смертности от рака груди [277], [278]. Исследование, с применением анализа GWAS, учитывающего многочисленные полиморфизмы, не показало какой-либо вовлеченности гена в развитие болезней щитовидной железы [279]. Данные приводят к очевидным противоречиям вышеуказанных экспериментальных данных с ассоциативными: активный и позитивно регулирующий LOX-5 метаболизм, аллельный вариант 718С, гена *GPX4*, демонстрирует повышенный риск к перечисленным заболеваниям. Проведенное нами ассоциативное исследование, также, подтверждает это противоречие. Аллель 718С в общей популяции проявляет рисковые свойства ($OR=1.24$, $CI_{95\%}=1.00-1.54$, $\chi^2=4.02$, $p=0.04$), тогда как аллель 718Т проявляет слабые протективные свойства $OR=0.8$ ($CI_{95\%}=0.65-1.00$, $\chi^2=4.02$, $p=0.04$). Кроме того, данная ассоциация отмечена в группе старше 45 лет ($OR=1.28$, $CI_{95\%}=1.02-1.62$, $\chi^2=4.47$, $p=0.03$).

Конкретного объяснения таким противоречивым данным нет, возможно, что роль данного фермента не до конца еще понятна и его значение в целом организме более сложное и многостороннее.

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что однонуклеотидный полиморфизм 718С/Т, гена *GPX4* не проявляет явных ассоциативных связей с риском развития ИБС в казахстанской популяции. Мультипликативная модель по аллелям, показывает необходимость проведения генотипирования на большей выборке, для получения статистически значимых ассоциаций.

По теме подраздела опубликована статья: Skvortsova L., Baizhigitova D., Khussainova E., Djansugurova L., Bekmanov B., Mansharipova A. Polymorphisms in Antioxidant Genes GCLM and GPX-4 and Ischemic Heart Disease Development in Kazakhstan Population // Clin Res 1(1): doi: <http://dx.doi.org/10.16966/clroa.104> [280]

Изучение полиморфизма GCG тандемного повтора гена *GPX1* и его ассоциация с риском развития ИБС

Анализ метода HRM при генотипировании тандемного повтора GCG в гене *GPX1*

Для генотипирования повтора GCG в гене *GPX1* (5-7 повторов аланиновых остатков в белке GPX1, Таблица 11), нами был выбран метод HRM, основанный на ПЦР в реальном времени, как подходящий под цели и задачи, быстрый и недорогой метод для выявления коротких тандемных повторов [9], [10]. Другим критерием выбора этого метода, была его высокая точность для скрининга различных мутаций и генотипирования полиморфизмов [11], [12], [13], [14].

Таблица 11 – Буквенное соответствие изучаемого полиморфизма в гене *GPX1* и белке GPX1

Генетический код	Белковый код
...gсgгсггсггсггсгсс...	...MCAARLAAAAAQS V YA...
...gсгггсггсггсггсггсгсс...	...MCAARLAAAAAQS V YA...
...gсггсггсггсггсггсггсгсс...	...MCAARLAAAAAQA S VYA...

В нашем исследовании, полиморфные варианты повтора GCG были успешно прогенотипированы для всех образцов ДНК (360 ДНК образцов опытной группы и 341 образца контрольной группы). Из них, 30 ДНК образцов были прогенотипированы методом электрофоретического разделения ПЦР продуктов в 25%-ом полиакриламидном геле. Метод позволил выявить все 6 возможных сочетаний аллелей в генотипах, использованных позднее, в качестве контрольных стандартов для HRM (Рисунок 14).

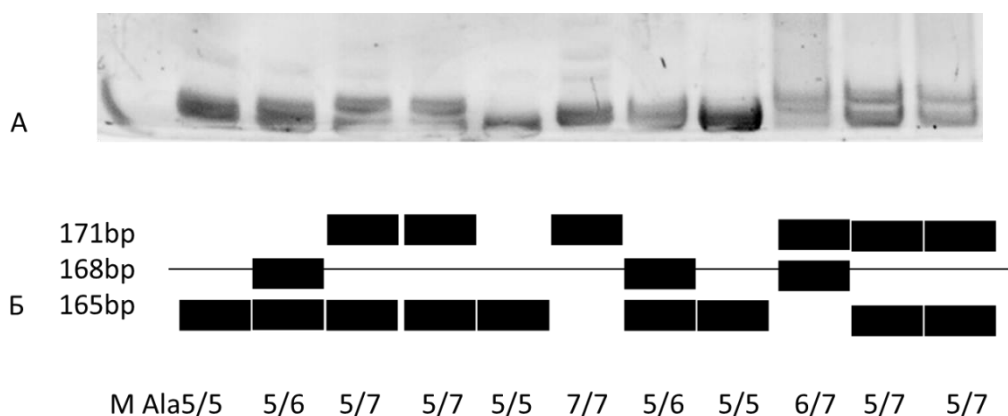
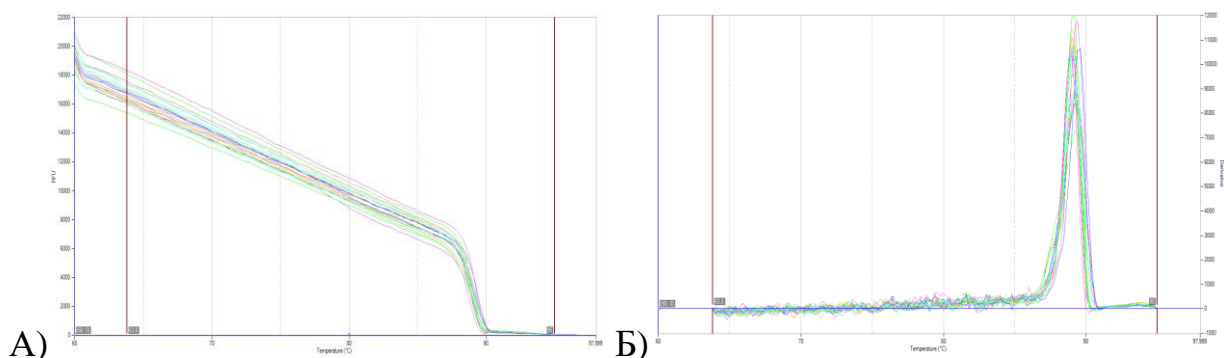


Рисунок 14 – А) электрофореграмма и Б) схематическое изображение амплифицированных фрагментов гена *GPX1*, показывающих 6 возможных сочетаний аллелей в генотипах

Для 671 других образцов ДНК, 659 образцов были полностью генотипированы с помощью анализа HRM (Рисунок 15, А).

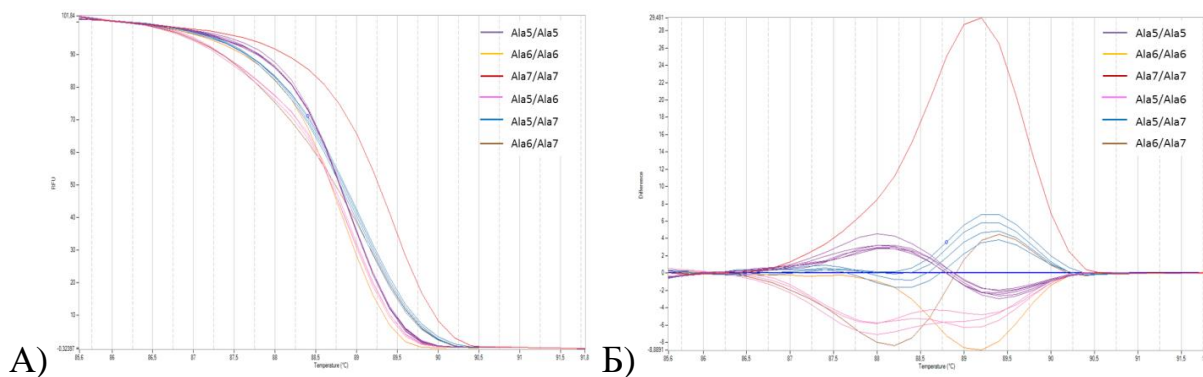


А) Стандартный график кривой плавления; Б) Производная графика кривой плавления

Рисунок 15 – Цифровые данные ПЦР в реальном времени, отображенные в виде графиков температуры плавления ДНК в анализируемых образцах.

Абсолютная флуоресценция варьировалась от образца к образцу. Исходные данные кривой плавления отображались на графике зависимости флуоресценции от температуры. Все образцы имели четкие и высокие пики на графике производной кривой плавления, без пиков более низкой интенсивности, представляющих неспецифические продукты (Рисунок 15, Б). Нормализация первичных данных, с помощью PikoReal Software 2.2, позволяет получить визуально более информативные графики кривых плавления по флуоресценции (Рисунок 16, А) и дифференциальных графиков (Рисунок 16, Б). 12 образцов прогенотипировать методом HRM не удалось, поскольку при плавлении давали не специфическую кривую плавления, отличную от кривой плавления известных образцов. Данные образцы были повторно прогенотипированы путем разделения в 25%-ом полиакриламидном геле электрофорезе.

Таким образом, в нашей работе, мы так же, подтверждаем высокую чувствительность метода HRM, при генотипировании короткого tandemного повтора GCG в экзонной области гена *GPX1*. 689 ДНК образцов дали четко видимые генотип-специфические профили плавления и были полностью и успешно прогенотипированы. 12 образцов ДНК дали одинаковые, но неспецифичные профили плавления. Иной профиль ДНК плавления, не специфичный для одного из изучаемых генотипов, может указывать на наличие в амплифицированной области дополнительной сайт-специфической мутации и необходим анализ этой области методом секвенирования. Примечательно, что эти профили ДНК плавления были зафиксированы в основном в группе ИБС: 10 образцов в группе ИБС, против 2 образцов в контрольной группе.



А) Кривые плавления ДНК образцов, после нормализации данных по флуоресценции;
 Б) Графики различия по флуоресценции данных после нормализации

Рисунок 16 – Генотипирование GCG повтора гена *GPX1* высокоразрешающим анализом температуры плавления амплифицированных фрагментов ДНК.

Анализ результатов генотипирования повтора GCG в гене GPX1

Результаты генотипирования показали, что частоты генотипов согласуются с равновесием Харди-Вайнберга в обеих группах: для контрольной группы $\chi^2=2.517$, $p=0.998$ ($df=5$) и опытной группы $\chi^2=9.524$, $p=0.090$ ($df=5$). Хотя, для опытной группы, значение p отклоняется от 1 значительно, следует учитывать влияние ограниченности выборки в 360 человек, для трех аллелей и соответственно 6 генотипов. Размер выборки не позволил «уловить» в достаточном количестве некоторые генотипы, внося, при этом, определенную долю ошибки, которая, однако, не выходит за рамки крайних значений ($p>0,05$) (Рисунок 17).

Для удобства анализа ассоциативных связей, дальнейшее обсуждение полученных результатов будут проводиться в формате белкового кода – аланиновых повторов (Ala).

Анализируя общую, этнически смешанную, популяцию, достоверно значимых ассоциаций Ala-повторов в гене *GPX1* с риском развития ИБС, обнаружено не было. Хотя, общая модель наследования и показала тенденцию двух генотипов к рисковому свойству: Ala5/5 OR=1.27 и Ala7/7 OR=1.67, $\chi^2=3.818$, $p=0.148$.

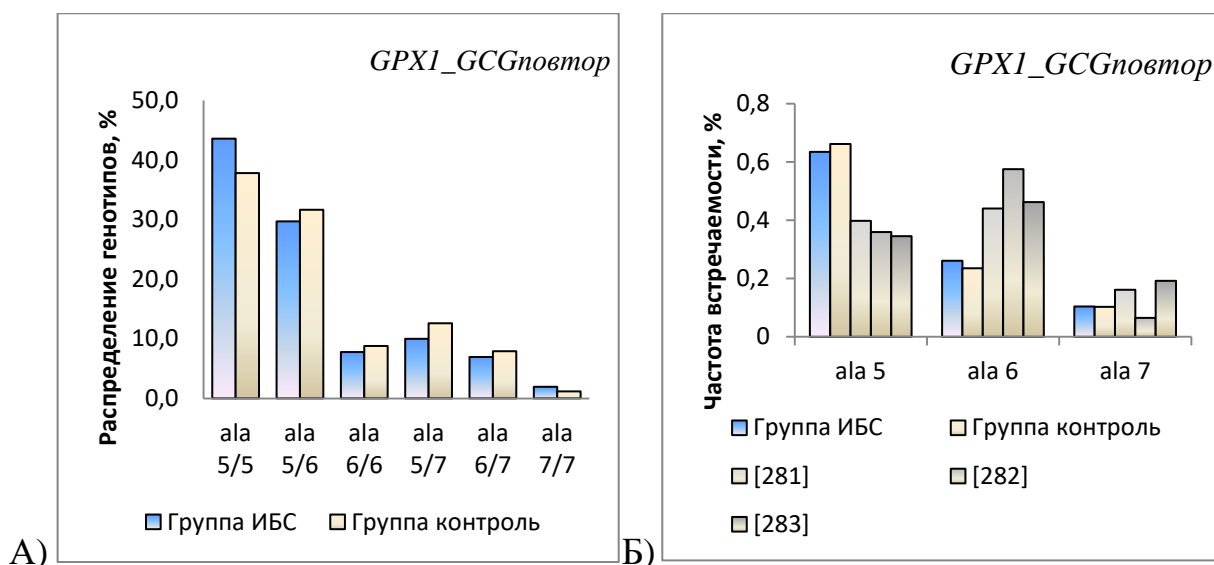


Рисунок 17 – Распределение частот а) генотипов и б) аллелей по полиморфному GCG повтору, гена *GPX1*, в когортах здоровых людей и пациентов с ИБС (контроль $\chi^2=2.517$, $p=0.998$, $df=5$; опыт $\chi^2=9.524$, $p=0.090$, $df=5$). На диаграмме б), отражены данные частот по трем аллелям ala5/ala6/ala7 гена *GPX4*, в изучаемой контрольной группе, в сравнении с литературными источниками [281], [282], [283]

Результаты анализа по трем этническим группам, показали, с высокой степенью достоверности, ассоциацию Ala-повторов с риском развития ИБС у Казахов (Таблица 12). У этногруппы Казахов, аллель Ala5 показывает ассоциацию с риском развития ИБС, с высокой степенью достоверности ($OR=1.73$; $95\% CI=1.31-2.29$; $\chi^2=17.248$, $p=0.000$). При сочетании в генотипе, аллель Ala5 проявляет рисковые свойства только в гомозиготном состоянии (Ala5/5: $OR=1.88$; $95\% CI=1.30-2.71$; $\chi^2=16.902$, $p=0.005$), тогда как в гетерозиготных состояниях его негативный эффект элиминируется аллелями Ala6 и/или Ala7 (Ala5/6 – $OR=0.91$, и Ala5/7 – $OR=0.54$). Согласно мультипликативной модели, аллели Ala6 ($OR=0.69$) и Ala7 ($OR=0.47$), проявляют защитные свойства, что и обуславливает их положительный эффект в комбинации с рисковым аллелем Ala5. Сочетание Ala6 и Ala7 в генотипе, дают наибольший защитный эффект (Ala6/7 $OR=0.33$; $95\% CI=0.12-0.92$; $\chi^2=16.902$, $p=0.005$).

Для этногруппы Русских, были противоположные результаты по ассоциации аллелей и генотипов гена *GPX1* с ИБС. Аллель Ala5 оказывал незначительный защитный эффект, в соответствии с мультипликативной моделью наследования ($OR=0.67$; $\chi^2=3.346$, $p=0.188$), тогда как аллели Ala6 и Ala7 обладали свойствами риска (Ala6 $OR=1.20$; Ala7 $OR=1.37$). Общая модель наследования показала риск для генотипов Ala6/6 ($OR=1.38$; $95\% CI=0.58-3.29$) и Ala7/7 ($OR=2.16$; $95\% CI=0.42-11.00$) и защитную роль для генотипа Ala5/5 ($OR=0.59$; $95\% CI=0.27-1.32$). Но эти данные также не были статистически достоверными ($\chi^2=3.398$, $p=0.183$).

Не было статистически значимых ассоциаций с ИБС и среди этногруппы других азиатов.

Таблица 12 - Ассоциативный анализ OR, Ala5-7 полиморфизма гена *GPXI* с риском развития ИБС для этнической группы Казахов

Аллели и их комбинации	Контроль	Группа ИБС	OR (95% CI)	χ^2	Значение p
Мультипликативная модель (df=2)					
<i>Ala5</i>	339	293	1.73 (1.31 – 2.29)	17.248	≤ 0
<i>Ala6</i>	98	133	0.69 (0.51 – 0.94)		
<i>Ala7</i>	23	48	0.47 (0.28 – 0.78)		
Общая модель (df=5)					
<i>Ala5/5</i>	126	93	1,88 (1.30 – 2.71)	16.902	<u>0.005</u>
<i>Ala5/6</i>	71	78	0,91 (0.62 – 1.34)		
<i>Ala6/6</i>	11	20	0,54 (0.26 – 1.16)		
<i>Ala5/7</i>	16	29	0,54 (0.28 – 1.02)		
<i>Ala6/7</i>	5	15	0,33 (0.12 – 0.92)		
<i>Ala7/7</i>	1	2	0,51 (0.05 – 5.70)		

Генотипирование полиморфного tandemного повтора GCG в гене *GPXI* показывает важность этнической составляющей в получении объективных данных, отражающих вклад генетических факторов в формирование фенотипических особенностей индивидуумов. Так, прогенотипировав общеэтническую популяцию, как в контрольной группе, так и в группе ИБС, мы не обнаружили каких-либо достоверно значимых ассоциаций полиморфизма GCG, с риском развития ИБС. Анализируя полученные данные по этническим группам в отдельности, для этногруппы Казахов аллель *Ala5* оказался высокой степени рисковым к развитию ИБС, тогда как оставшиеся два аллеля *Ala6* и *Ala7*, наоборот, показали защитные свойства, перекрывающие негативное влияние *Ala5* в гетерозиготе. Поэтому, для Казахской этногруппы, риск выражен только для гомозиготных носителей *Ala5/5*. Для Русской этногруппы, не смотря на то, что достоверно значимых данных по ассоциации мы не получили, частота встречаемости аллеля *Ala7* слегка повышена в группе ИБС. Недостоверная тенденция аллеля *Ala7*, и в меньшей степени, *Ala6*, к рисковым свойствам, возможно, обусловлена числовой недостаточностью выборки. Русская группа представлена в двое меньшим количеством участников в обоих когортах, по сравнению с Казахской этногруппой, и для трех аллельного полиморфизма, для достижения статистически значимых результатов, порог числовой выборки должен быть несомненно выше, чем для двух аллельного полиморфизма. Однако, эти данные уже подчеркивают неоднородность влияния генетической составляющей, у исторически разных этногрупп, в развитие ИБС. Особенности образа жизни, исторически сложившиеся среди этнических наций и селективно-генетически закрепленные, могут по-разному

влиять на современные урбанистические изменения, способствующие возникновению проблем со здоровьем.

Несмотря на то, что мало что известно о специфическом молекулярном механизме влияния повтора GCG на функции белка GSH-Px1, накопленные литературные данные, а также, полученные нами данные, дополняют представление о его важной функциональной роли в организме. С тех пор, как Shen Q с соавт., [284] впервые, опубликовали данные о присутствии повторяющегося GCG тандемного повтора в гене *GPX1*, и показали его высокую нестабильность *in vitro*, на линии клеток миелолейкоза человека; было получено не много новых данных, раскрывающих молекулярный механизм влияния этого полиморфизма на активность белка GSH-Px1. Кроме того, были идентифицированы дополнительные однонуклеотидные полиморфные сайты в гене *GPX1*, включая промоторные области, которые могут влиять на активность белка GSH-Px1 в клетках [285]. Было показано, что полиморфные аллели GCG, находятся в неравновесном сцеплении с аллелями Pro198Leu [286] и -602A/G, -2C/T [287]. Hamanishi T. с соавт. показали, что комбинация Ala6/198Leu имела 40% снижение активности фермента GSH-Px1 в экспериментах *in vitro*. Более того, они продемонстрировали отрицательную связь комбинаций -602A/G, +2C/T, 5Ala/6Ala и Pro198Leu в гене *GPX1*, с толщиной сонной артерии и риском ССЗ у пациентов с сахарным диабетом 2 типа [286]. Winter J. с соавт., выявили ассоциацию аллеля Ala6 в гене *GPX1* с риском развития ИБС, но не в сочетании с Pro198Leu [282]. Противоположный вывод был сделан Hardie J с соавт., при наблюдении изменений уровня 8OHdG (8-гидроксидезоксигуанозина) в нормальной и опухолевой тканях легких [288]. 8OHdG представляет собой маркер активации свободнорадикального окисления ДНК, под действием гидроксильного радикала OH*. Хотя, в эксперименте, не было существенных различий между уровнями 8-OHdG в опухоли и нормальной ткани легкого, но была тенденция к снижению уровня 8-OHdG у людей, обладающих аллелями Ala6 в нормальной ткани. Кроме того, потеря гетерозиготности (LOH) в этом регионе продемонстрировала увеличение уровней 8-OHdG и снижение активности GSH-Px1 в опухолевых тканях легких по сравнению с нормой. Событие LOH в GCG-полиморфном локусе гена *GPX1*, довольно часто наблюдается при развитии различных типов рака [289], [290], [291]. Согласно исследованиям, аллельная потеря области аланиновых повторов, может увеличить до 42% случаев колоректального рака [292]. Но, в то же время, Kote-Jarai Z. с соавт., не обнаружили каких-либо ассоциаций GCG полиморфизма с раком предстательной железы у европейцев, живущих в Англии [281].

Также, было отмечено, что этот GCG полиморфизм, по отдельности и в сочетании с Pro198Leu, ассоциирован с развитием остеопороза, характеризующимся чрезмерной продукцией свободно-радикальных процессов. Наименьшая плотность костей, признак остеопороза, была характерна для группы участников, с генотипами Ala6/6, тогда как, генотип Ala7/7 показал

протективные свойства [293]. В противоположность, аллель Ala6, по-видимому, является протективным и при аутизме [294].

Таким образом, данные нашего исследования и литературные данные, показывают неодинаковую вовлеченность белка GSH-Px1 в развитие различного рода заболеваний, характеризующихся усиленным оксидативным стрессом. Противоречивые данные по полиморфизмам, показывают неоднозначность их влияния на биохимические процессы. Дальнейшие исследования помогут глубже понять роль, не только самого белка GSH-Px1 в биохимии клетки, но и роль его генетических модификаций.

По теме подраздела опубликована статья: L. A. Skvortsova, A. V. Perfiljeva, E. M. Khussainova, A. T. Mansharipova, B. O. Bekmanov, L. B. Djansugurova. Association of GCG repeats polymorphism of the GPX1 gene coding selenium dependent antioxidant enzyme with ischemic heart disease development in Kazakhstan population // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – Т. 2, № 326, - 2018. – С.74 – 83 [295]

Изучение промоторных полиморфизмов –129 Т/С (rs17883901) и –588 Т/С (rs41303970) генов *GCLC* и *GCLM* и их ассоциация с риском развития ИБС

Анализ результатов генотипирования

Промоторные полиморфизмы –129Т/С и –588Т/С генов *GCLC* и *GCLM* соответственно, были успешно прогенотипированы для всех образцов ДНК (360 ДНК образцов опытной группы и 341 образец контрольной группы). Однако, амплификация промоторной области генов может быть сопряжена с затрудненным отжигом праймеров, поскольку промоторная область содержит повышенный набор GC пар. Для оптимизации протекающей реакции и увеличения выхода продукта ПЦР, в реакционную ПЦР смесь были добавлены 1% DMSO и 0,3% Triton[®]X-100. Результаты рестрикции ПЦР-фрагментов, сохранялись в цифровом формате, с последующей кодировкой и архивированием в соответствующих папках компьютера.

Результаты генотипирования полиморфизма –588Т/С гена *GCLM* и –129Т/С гена *GCLC* согласуются с равновесием Харди-Вайнберга по распределению генотипов в изучаемых когортах. Так, распределение генотипов по –588Т/С гена *GCLM*, в контрольной группе, составило $\chi^2=1.397$, $p=0.497$; в опытной $\chi^2=0.531$, $p=0.725$. Распределение генотипов по –129Т/С гена *GCLC*, в контрольной группе, составило $\chi^2=0.456$, $p=0.796$; в опытной группе $\chi^2=0.204$, $p=0.701$. Частоты встречаемости аллелей и генотипов, по обоим полиморфизмам, представлены графически в виде диаграмм на Рисунке 18 и 19.

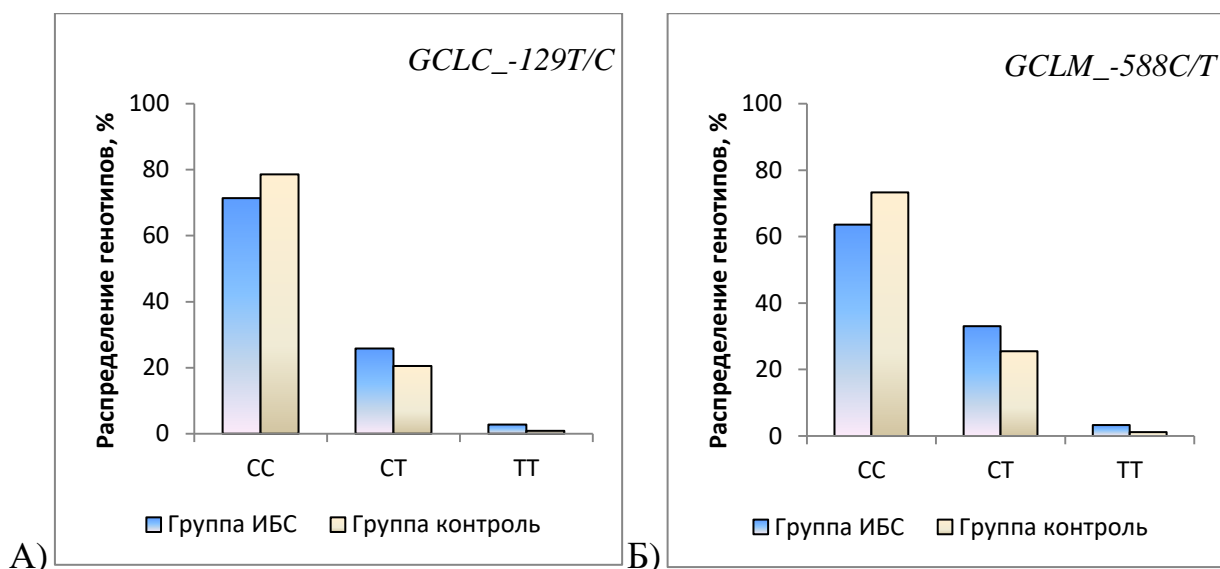


Рисунок 18 – Распределение частот генотипов по полиморфизму а) –588 Т/С гена *GCLM* (контроль $\chi^2=1.397$, $p=0.497$; опыт $\chi^2=0.531$, $p=0.725$) и б) –129 Т/С гена *GCLC* (контроль $\chi^2=0.456$, $p=0.796$; опыт $\chi^2=0.204$, $p=0.701$), в когортах здоровых людей и пациентов с ИБС

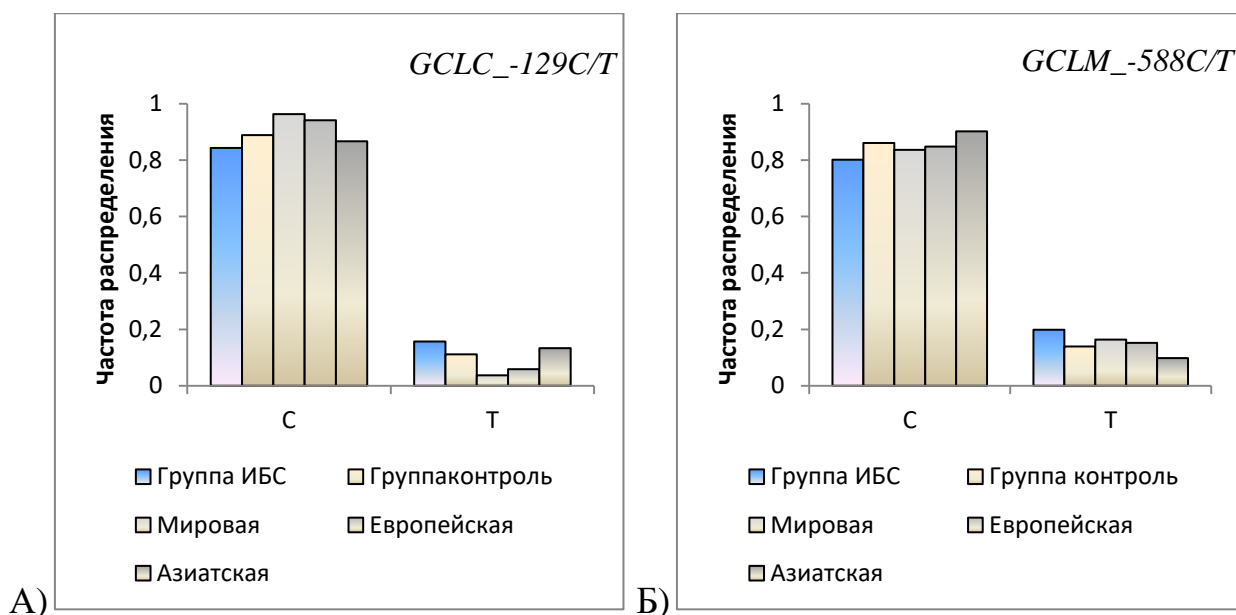


Рисунок 19 – Частоты встречаемости аллелей а) –129Т/С гена *GCLC* и б) –588Т/С гена *GCLM* для казахстанской популяции (контроль) в сравнении с данными других изученных популяций, согласно источникам в мировой базе данных NCBI. [260] для –129Т/С гена *GCLC* и [260] для –588Т/С гена *GCLM*

Для проверки гипотезы о роли однонуклеотидного полиморфизма в области промотора генов с риском развития ИБС, был проведен ассоциативный анализ данных, с использованием мультипликативной, общей, доминантной и рецессивной моделей наследования.

Согласно мультипликативной модели наследования, риск (OR) одинаково выражен для аллеля Т в обоих генах в общей группе, включающей все национальности: для аллеля -588Т гена *GCLM*, OR=1,53 (CI95%=1,15-2,03, $\chi^2=8,743$, $p=0,003$); для аллеля -129Т гена *GCLC*, OR=1,48 (CI95% = 1,09-2,03, $\chi^2=6,212$, $p=0,013$). Тогда как, аллель С в обоих полиморфизмах демонстрирует защитный эффект: для аллеля -588С гена *GCLM*, OR=0,65 (CI95%=0,49-0,87, $\chi^2=8,743$, $p=0,003$) и для аллеля -129С гена *GCLC*, OR=0,67 (CI95%=0,49-0,92, $\chi^2=6,219$, $p=0,013$).

В Таблице 13 приведены результаты ассоциативного анализа для общей этнически смешанной группы пациентов с ИБС (опыт) и контрольной группы (тест χ^2 , $df=2$). Общая модель наследования показала негативное влияние аллеля -588Т гена *GCLM* и -129Т гена *GCLC*, при сочетании в генотипах: для гена *GCLM*, в присутствии одного аллеля -588Т, в составе гетерозиготы (СТ), отмечено повышение OR-1,44 ($p=0,009$); в гомозиготном состоянии (ТТ) OR увеличивается вдвое (OR=2,91, $p=0,009$). Для гена *GCLC*, наличие одного аллеля -129Т в генотипе СТ, увеличивало риск до 1,35 ($p=0,03$), тогда как для генотипа ТТ, OR был в два с половиной раза выше (OR=3,22, $p=0,03$).

Комбинация генотипов СС+СТ, в доминантной модели наследования, подтвердила эти выводы и продемонстрирован действительно защитный эффект аллеля С, для обоих генов: -588Т/С гена *GCLM* (OR=0,34, $p=0,05$) и -129Т/С гена *GCLC* (OR=0,31, $p=0,06$). По рецессивной модели наследования, комбинация СТ+ТТ характеризуется пониженным риском ИБС для гена *GCLM* (OR=1,57, $p=0,006$) и для гена *GCLC* (OR=1,47, $p=0,03$), по-видимому, из-за положительного влияния аллеля С на генотип СТ.

Поскольку, исследуемые группы «случай-контроль» неоднородны по этнической принадлежности, возрасту, полу и статусу курения, мы провели отдельный анализ ассоциации для двух полиморфизмов генов для казахской и русской этнических групп (Таблица 14) и для двух возрастных групп (моложе 45 лет и старше 45 лет) для мужчин/женщин и курящих/некурящих, представленных в Таблице Г1, Приложение Г. Анализ ассоциации полиморфизмов обоих генов для казахской и русской этнической принадлежности на основе моделей доминантного и рецессивного наследования также представлен в Таблице В1, Приложение В.

Таблица 13 – Ассоциация полиморфизма –588Т/С гена *GCLM* и –129Т/С гена *GCLC*, с риском развития ИБС по общей популяции

Полиморфизм	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение р
GCLM (-588С/Т)	СС	250	229	0.64 (0.46 – 0.88)	0.009
	СТ	87	119	1.44 (1.04 – 2.00)	
	ТТ	4	12	2.91 (0.93 – 9.10)	
GCLM (-588С/Т), доминантная модель	СС+СТ	337	348	0.34 (0.11 – 1.08)	0.05
	ТТ	4	12	2.91 (0.93 – 9.10)	
GCLM (-588С/Т), рецессивная модель	СС	250	229	0.64 (0.46 – 0.88)	0.006
	СТ+ТТ	91	131	1.57 (1.14 – 2.17)	
GCLC (-129Т/С)	СС	268	257	0.68 (0.48 – 0.96)	0.03
	СТ	70	93	1.35 (0.95 – 1.92)	
	ТТ	3	10	3.22 (0.88 – 11.80)	
GCLC (-129Т/С), доминантная модель	СС+СТ	338	350	0.31 (0.08 – 1.14)	0.06
	ТТ	3	10	3.22 (0.88 – 11.80)	
GCLC (-129Т/С) рецессивная модель	СС	268	257	0.68 (0.48 – 0.96)	0.03
	СТ+ТТ	73	103	1.47 (1.04 – 2.08)	

Согласно общей модели наследования, генотип -588ТТ гена *GCLM*, связан с высоким риском ИБС в Казахской этногруппе (OR=4,23), а генотип -588СС гена *GCLM* демонстрирует защитный эффект (OR=0,67), который усиливается комбинацией доминантной модели СС vs СТ+ТТ (OR=0,24, 95% CI=0,05-1,12, $\chi^2=3,866$, $p=0,05$). Таким образом, наличие у казахов хотя бы одного аллеля Т в генотипе, увеличивает риск развития ИБС. У русской этногруппы, прослеживается тенденция к повышению ассоциации риска ИБС для генотипа -588ТТ (OR=1,41), особенно по рецессивной модели наследования (OR=1,46, 95% ДИ=0,77-2,76, $\chi^2=1,376$, $p=0,2$). Генотип -588СС гена *GCLM*, также показывает защитные свойства, как по общей (OR=0,68), так и по рецессивной (OR=0,68) моделям наследования. Однако, полученные данные для русской этнической группы, не являются статистически значимыми ($p>0,5$).

Кроме того, мы обнаружили, что генотип -588ТТ гена *GCLM* был статистически связан с более высоким риском развития ИБС у женщин (OR=3,97, CI=0,85-18,54, $\chi^2=10,812$, $p=0,004$) и лиц старше 45 лет (OR=2,91,

CI=0,80-10,53, $\chi^2=6,097$, $p=0,04$). Анализ статуса курения людей не выявил никакой связи с развитием ИБС (Таблица В1, Приложение В).

Таблица 14 – Ассоциация полиморфизма –588Т/С гена *GCLM* и –129Т/С гена *GCLC*, с риском развития ИБС, у этнической группы казахов и русских (Общая модель наследования)

Группы	Генотипы	Опыт/Контроль, n	OR (95% CI)	χ^2	Значение p
GCLM -588С/Т					
Национальность					
Казахи	СС	156/180	0.67 (0.44–1.00)	6.211	0.04
	СТ	66/55	1.33 (0.88–2.02)		
	ТТ	8/2	4.23 (0.89–20.16)		
Русские	СС	60/48	0.68 (0.36–1.29)	1.388	0.5
	СТ	38/21	1.41 (0.74–2.70)		
	ТТ	4/2	1.41 (0.25–7.90)		
GCLC -129 Т/С					
Казахи	СС	168/191	0.65 (0.42–1.01)	6.660	0.04
	СТ	53/44	1.31 (0.84–2.06)		
	ТТ	9/2	4.79 (1.02–22.39)		
Русские	СС	66/49	0.82 (0.43–1.57)	0.473	0.8
	СТ	35/21	1.24 (0.65–2.39)		
	ТТ	1/1	0.69 (0.04–11.27)		

Для промоторного полиморфизма -129Т/С гена *GCLC*, негативное влияние на риск развития ИБС выражено для аллеля -129Т (OR=**1,62**, 95%ДИ=1,10-2,40, $\chi^2=5,917$, $p=0,015$) и генотип -129ТТ связан с высоким риском развития ИБС, в Казахской этногруппе, по общей модели наследования (OR=**4,79**, 95%ДИ=1,02-22,39, $\chi^2=6,660$, $p=0,04$). Эти данные подтверждаются доминантной моделью наследования (OR=**4,79**, 95%ДИ=1,02-22,39, $\chi^2=4,781$, $p=0,03$). Аллель -129С показал защитный эффект в соответствии с мультипликативной моделью наследования (OR=**0,62**, 95%ДИ=0,42-0,91, $\chi^2=5,917$, $p=0,015$). Присутствие этого аллеля в генотипе снижает негативное влияние аллеля -129Т, особенно для комбинация СС+СТ vs ТТ (OR=**0,21**, 95% ДИ=0,04-0,98, $\chi^2=4,781$, $p=0,029$).

Для Русской этногруппы, ассоциативный анализ, по всем моделям наследования, не показал каких-либо достоверных рисков развития ИБС для генотипов.

Взаимосвязь полиморфизма -129Т/С гена *GCLC* с возрастом, более всего проявилась в отношении группы старше 45 лет. Хотя, по общей модели наследования, риск ИБС, со значением 7,15 статистически не достоверен (95%ДИ=0,90–56,80, $\chi^2=5,597$, $p=0,06$), по рецессивной модели наследования, в

комбинации СТ+ТТ, это значение подтверждается статистически (95%ДИ=1,02-22,39, $\chi^2=4,694$, $p=0,03$) (Таблица В2, Приложение В). У женщин, данные показали положительную корреляцию для аллеля -129Т, с риском развития ИБС, в соответствии с мультипликативной моделью наследования (OR=1,63, 95% ДИ=1,12-2,37, $\chi^2=6,566$, $p=0,01$). Аллель -129С имел протективный эффект (OR=0,61, 95% ДИ=0,42-0,89, $\chi^2=6,566$, $p=0,01$). Риск ИБС, при этом, был выражен для генотипа -129ТТ (OR=2,33, 95% ДИ=0,61-8,89, $\chi^2=6,376$, $p=0,04$).

Табакокурение, по-видимому, не оказывает значимого влияния на риск развития ИБС в сочетании с генотипической вариабельностью промоторного полиморфизма -129Т/С гена *GCLC* (Таблица В2, Приложение В).

Ассоциативные результаты продемонстрировали высокую положительную связь генотипов -129ТТ гена *GCLC* и -588ТТ гена *GCLM*, с развитием ИБС в общей этнически смешанной популяции. При этом присутствие одного аллеля Т в генотипе увеличивает риск: для гена *GCLC* в генотипе СТ риск равен 1,35 (CI=0,95-1,92, $\chi^2=6,735$, $p=0,03$), тогда как в генотипе ТТ он в два с половиной раза выше (OR=3,22, CI=0,88-11,80, $\chi^2=6,735$, $p=0,03$). Для гена *GCLM*, в присутствии одного Т-аллеля в гетерозиготе (СТ), OR немного выше - 1,44 ($p=0,009$), а в гомозиготном состоянии (ТТ) он уже увеличен вдвое (OR=2,91, $p=0,009$). Эти данные согласуются с большинством ассоциативных данных, полученных ранее при различных патологических состояниях, и, возможно, высокие статистически значимые результаты были получены благодаря тщательному отбору когорт, упомянутых выше.

Как упоминалось ранее, два новаторских исследования, выполненные Koide с соавт. и Nakamura с соавт., установили более низкую активность промотора в клетках для носителей аллеля -129Т гена *GCLC* и для носителей аллеля -588Т гена *GCLM*. Это наблюдение было поддержано в исследованиях Butticaз с соавт., для полиморфизма -129С/Т гена *GCLC*. В дальнейших исследованиях было установлено, что подобный негативный эффект полиморфизма -588Т на эндотелийзависимую вазомоторную реактивность в крупных и резистентных коронарных артериях (аномально низкий дилатационный эффект или аномально высокий тонус сосудов), может влиять на развитие ИБС. Предыдущие исследования предполагали связь этих полиморфизмов с развитием различных заболеваний. Вариант аллеля -129Т в гене *GCLC* может повышать восприимчивость к ИМ [92], почечной недостаточности у пациентов с сахарным диабетом 1 типа [296], шизофренией [297], неалкогольным стеатогепатитом [298], муковисцидозом [299], хронической обструктивной болезнью легких [300], неалкогольным стеатогепатитом у бразильских пациентов [298]. Полиморфизм промотора -588С/Т гена *GCLM*, наблюдается в ассоциациях с астмой [301], ИМ у пациентов с диабетом 2 типа, совместно с другими полиморфизмами генов прооксидантных генов [302], несемейной идиопатической дилатационной кардиомиопатией [303], [304]. В исследовании случай-контроль, выполненном Engstrom с соавт., низкое влияние полиморфизма -588С/Т гена *GCLM* на риск ИМ было обнаружено только в сочетании с уровнем EPA+DHA в плазме крови

и уровнем метилртути в эритроцитах [305]. Muehlhause с соавт., [306] не обнаружили ассоциации полиморфизма -588С/Т гена *GCLM* с риском развития и степенью ИБС в немецкой когорте. Mansego с соавт., не выявили связи полиморфизма -588С/Т гена *GCLM* со значениями артериального давления и артериальной гипертензии в популяционном исследовании, включавшем 1388 участников [307]. Таким образом, связь изучаемых промоторных полиморфизмов с различными заболеваниями, по-видимому, зависит от дополнительных факторов, которые варьируются среди стран и населения. Так, например, как показали исследования, потребление продуктов с высоким содержанием серы, может значительно уменьшать оксидативный стресс, за счет повышения уровня глутатиона в организме [308] [309] [310] [311].

Однако точные механизмы, с помощью которых аллель -129Т гена *GCLC* и -588Т гена *GCLM* могут снижать экспрессию субъединиц *gclс* и *gclm*, до сих пор не выяснены. Хотя, известно, что промоторы генов *GCLC* и *GCLM* имеют несколько идентифицированных антиоксидантных/электрофильных элементов (ARE/ErRE), элементы AP-1, AP-2, чувствительных к уровню оксидативного стресса. Возможно, эти нуклеотидные замены могут влиять на взаимодействия между этими цис-элементами и чувствительными к стрессу факторами транскрипции Nrf2 [88], [89], Maf G/F/K и c-Jun, c-Myc [312], AP-1/2 [91]. Хроническое воспаление при атеросклерозе, как основная причина избыточной оксидативной нагрузки, является катализатором разноуровневой активации вышеперечисленных факторов транскрипции в разных тканях. Данные текущего исследования, наряду с предыдущими исследованиями, убедительно подтверждают эту гипотезу и показывают важность более детальных исследований.

В настоящее время остается неясным вопрос об этническом влиянии на ассоциативные исследования. Согласно имеющимся исследованиям «случай-контроль» по сердечно-сосудистым заболеваниям, были получены высокие результаты ассоциации для генотипа -588ТТ гена *GCLM* с кардиомиопатией, в популяции японцев (OR=3,13) и для генотипа -129ТТ гена *GCLC* с ИМ, также в популяции японцев (OR=1,81). В нашем исследовании, детальный анализ доминантных этнических групп показал, что высокий уровень OR был выявлен для Казахов (-129ТТ гена *GCLC*: OR=4,79, $p=0,04$; -588ТТ гена *GCLM*: OR=4,23, $p=0,04$), но не для Русских (-129ТТ гена *GCLC*: OR=0,69, $p=0,8$; -588ТТ гена *GCLM*: OR=1,41, $p=0,5$). Интерпретация этих результатов также должна учитывать специфику питания казахов: пища этой этнической группы традиционно обогащена жирным мясом с низким потреблением овощей. Кроме того, это может быть объяснено ограниченным и небольшим количеством этногруппы Русских в смешанной популяции (случай (n)=102, контроль (n)=71), что свидетельствует о пользе дальнейших исследований большой группы случай-контроль. Возможно, следует учитывать этнические особенности в отношении восприимчивости GCL-генотипов к болезням ИБС. Следует, также, учитывать, что изменения других нуклеотидов, выявленные в

промоторных областях генов *GCLC* и *GCLM*, могут оказывать влияние на экспрессию и, следовательно, на ассоциативные исследования ИБС [313].

Настоящее исследование показывает, что промоторные полиморфизмы двух субъединиц *GCLC* -129C/T и *GCLM* -588C/T, образующих активный сайт антиоксидантного GCL белка, с высокой степенью достоверности ассоциированы с риском развития ИБС в Казахстанской популяции. Таким образом, подтверждая литературные данные о важной функциональной роли этих полиморфизмов в развитии ССЗ. Влияние этнической составляющей на ассоциативные данные, подчеркивает важность проведения дополнительных исследований, методом «случай-контроль», на различных популяциях, с учетом историко-географических аспектов развития. Данные этих исследований помогут более объективно понять вклад каждого полиморфизма в развитие различных патологий, в том числе и ИБС для разных расово-этнических популяций.

По теме подраздела опубликована статья: Skvortsova L., Perfelyeva A., Khussainova E., Mansharipova A., Forman H.J., Djansugurova L. Association of *GCLM* -588C/T and *GCLC* -129T/C Promoter Polymorphisms of Genes Coding the Subunits of Glutamate Cysteine Ligase with Ischemic Heart Disease Development in Kazakhstan Population // *Dis Markers*, - Vol.2017, Article ID 4209257 doi:10.1155/2017/4209257 [314]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активные формы кислорода (оксидативный стресс) и особенности регуляции экспрессии антиоксидантных белков (антиоксидантной защиты организма) являются неотъемлемой частью патогенеза атеросклероза и его сопутствующего процесса ИБС. Как показывают многочисленные исследования, регуляция экспрессии и антиоксидантный ответ в тканях и клетках осуществляется на разных генно-молекулярных уровнях. Эта область исследований активно изучается и имеет большие перспективы в практическом решении проблем лечения и профилактики атеросклероза и ИБС.

Исследование проведенное в рамках данной PhD работы, показывает непосредственную вовлеченность генетического и белкового статуса антиоксидантной защиты в молекулярно-биохимические пути развития атеросклероза и ИБС и подтверждает наличие различных путей регуляции их активности. Так, в первой экспериментальной части работы, была показана подробная динамика экспрессии двух белков антиоксидантной защиты GPX1 и SOD3 при атеросклерозе. Изучение экспрессии было проведено иммуногистохимическим методом с использованием экспериментальной модели атеросклероза у кроликов.

Многие эпидемиологические исследования показывают наличие корреляций между генетическими факторами в генах антиоксидантной защиты и риском развития атеросклероза и ИБС для различных мировых популяций. Данные о влиянии этих факторов в развитии ИБС для казахстанской популяции ограничены. Вторая часть работы была проведена с целью изучения роли генетических факторов в генах антиоксидантной защиты в предрасположенности и развитии ИБС для казахстанской популяции. Исследование проводили методом «случай-контроль», для которого был собран клинический биоматериал от 360 пациентов с ИБС. Соответственно, учитывая анкетные данные пациентов с ИБС, была тщательно подобрана контрольная группа людей, включающая 341 условно здоровых индивидов без признаков ИБС и сопутствующих заболеваний в анамнезе. В качестве генетических факторов риска были проанализированы и отобраны наиболее значимые нуклеотидные замены в генах антиоксидантной защиты, наиболее задействованные в процессах развития окислительного стресса при атеросклерозе и ИБС: полиморфизм Ala58Thr (rs2536512) в гене *SOD3*, -129C/T (rs17883901) гена *GCLC*, -588C/T (rs41303970) гена *GCLM*, тандемный повтор GCG (rs17838762) в гене *GPX1*, C718T (rs713041) гена *GPX4*. Определение генетических вариаций проводили методами ПЦР-ПДРФ и ПЦР в реальном времени.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- Экспрессия внеклеточного антиоксидантного белка SOD3 индуцируется на ранних стадиях инфильтрации интимального слоя пенистыми клетками (липидные пятна). Зона первичной активации экспрессии SOD3 располагается в интактном медиальном слое, но не интимальном слое;

- Деградация внеклеточного матрикса на поздних стадиях развития атеросклеротических бляшек (атеромы), способствует уменьшению содержания внеклеточного белка SOD3 в местах поражения;
- Экспрессия внутриклеточного белка GPX1 индуцируется на ранней стадии атеросклероза (липидные пятна), непосредственно в пораженной интиме, а также в адвентициальном и части медиального слоев;
- На поздних стадиях развития атеросклеротических бляшек (атерома) экспрессия внутриклеточного белка GPX1 существенно подавляется в интимальном и медиальном, но не в адвентициальном слоях;
 - Впервые получены данные по частотному распределению аллельных вариантов генов антиоксидантной защиты (*SOD3*, *GCLC*, *GCLM*, *GPX1* и *GPX4*) в казахстанской популяции людей с верифицированным диагнозом ИБС и условно здоровых людей.
 - Генетический риск развития ИБС достоверно ассоциирован с генотипом -588ТТ гена *GCLM* (OR=2,91; CI=0,93–9,10; p=0,009) и/или генотипом -129ТТ гена *GCLC* (OR=3,22; CI=0,88–11,80; p=0,03). Высокая степень риска отмечена для группы этнических казахов: -588ТТ гена *GCLM* (OR=4,23; CI=0,89–20,16; p=0,04) и/или -129ТТ гена *GCLC* (OR=4,79; CI=1,02–22,39; p=0,04).
 - Наличие пяти аланиновых повторов Ala5 в гене *GPX1* в гомозиготном состоянии является фактором риска развития ИБС у этнических казахов (Ala5/5: OR=1,88; 95%CI=1,30-2,71; $\chi^2=16,902$, p=0,005).
 - Полиморфизм Ala58Thr гена *SOD3* и полиморфизм Leu220= гена *GPX4* не являются факторами риска ишемической болезни сердца для казахстанской популяции (p>0,05).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Risch N., Merikangas K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases // *Science* (80-.). -1996. -V. 265, №5181. -P. 2037–2048.
- 2 Fareed M., Afzal M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service // *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. -2013.-V. 14, №2. -P. 123 - 134
- 3 Chen K., Keaney J.F. Evolving concepts of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular disease // *Curr. Atheroscler. Rep.* -2012.-V. 14, №5. - P. 476–483.
- 4 Schnabel R., Blankenberg S. Oxidative stress in cardiovascular disease: Successful translation from bench to bedside? // *Circulation*. -2007.-V.116, №12. -P. 1338 - 1340.
- 5 Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., ... Murray, C. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 // *J. Am. Coll. Cardiol.* -2017. - V.70, №1. - P. 1–25.
6. Бюро национальной статистики Агентства по стратегическому планированию и реформам Республики Казахстан. Статистика Здравоохранения [Electronic resource]. URL: https://gender.stat.gov.kz/page/frontend/detail?id=58&slug=45&cat_id=3&lang=ru.
- 7 Central Intelligence Agency. The World Factbook [Electronic resource]. URL: <https://www.cia.gov/library/publications/resources/the-world-factbook/geos/xx.html>.
- 8 United Nations. Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics [Electronic resource]. URL: <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>.
- 9 Ahmad, O. B., Boschi-pinto, C., & Lopez, A. D. Age Standardization of Rates: a New WHO Standard // *GPE Discussion Paper Series* .World Heal. Organ. - 2000. -V.31. -P. 1–14.
- 10 Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., & Bhatnagar, P. European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition // *Eur. Hear. Netw.*- 2017. -P. 94-100.
- 11 Thomas, H., Diamond, J., Vieco, A., Chaudhuri, S., Shinnar, E., Cromer, S., ... Moran, A. E. Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control // *Global Heart*.- 2018. -P. 1 - 21.
- 12 History of the Framingham Heart Study [Electronic resource]. URL: <https://framinghamheartstudy.org/fhs-about/history/>.
- 13 DAWBER T.R., MEADORS G.F., MOORE F.E. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. // *Am. J. Public Health*. -1951.-V. 41, №3. -P. 279–281.
- 14 Hajar R. Risk factors for coronary artery disease: Historical perspectives // *Hear. Views*.- 2017.-V.18, №3. -P. 109.

- 15 Folsom A.R. Classical and novel biomarkers for cardiovascular risk prediction in the United States // *J. Epidemiol.* -2013. -V.23, №3. -P. 158–162.
- 16 Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiol. Rev.* 2002.
- 17 Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III // *J. Biol. Chem.* -2003. -V.278, №38. -P. 36027–36031.
- 18 Keaney, J. F., Larson, M. G., Vasani, R. S., Wilson, P. W. F., Lipinska, I., Corey, D., ... Benjamin, E. J. Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* -2003.-V. 23, №3. -P. 434–439.
- 19 Rao, F., Zhang, K., Khandrika, S., Mahata, M., Fung, M. M., Ziegler, M. G., ... O'Connor, D. T. Isoprostane, an 'intermediate phenotype' for oxidative stress: Heritability, risk trait associations, and the influence of chromogranin b polymorphism // *J. Am. Coll. Cardiol.* -2010. -V. 56, №16. -P. 1338–1350.
- 20 Brown D.I., Griendling K.K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system // *Circulation Research.* 2015.
- 21 Stocker, R., & Keaney, J. F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis // *Physiol. Rev.* 2004.
- 22 Davignon, J., & Ganz, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis // *Circulation.* 2004.
- 23 Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J., ... Fogelman, A. M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: A review based on the 1994 George Lyman Duff memorial lecture // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1996.
- 24 Azumi, H., Inoue, N., Takeshita, S., Rikitake, Y., Kawashima, S., Hayashi, Y., ... Yokoyama, M. Expression of NADH/NADPH oxidase p22(phox) in human coronary arteries // *Circulation.* -1999. -V.100, №14. -P. 1494–1498.
- 25 Sorescu, D., Weiss, D., Lassègue, B., Clempus, R. E., Szöcs, K., Sorescu, G. P., ... Griendling, K. K. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis // *Circulation.* -2002.-V. 105, №12. -P. 1429–1435.
- 26 Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R. S., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., ... Drummond, G. R. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice // *AJP Hear. Circ. Physiol.* -2010.-V. 298, №1.
- 27 Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., & Channon, K. M. Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase: Association With Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors // *Circ. Res.* -2000.-V. 86, №9.
- 28 Guzik, T. J., Chen, W., Gongora, M. C., Guzik, B., Lob, H. E., Mangalat, D., ... Harrison, D. G. Calcium-Dependent NOX5 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Contributes to Vascular Oxidative Stress in

- Human Coronary Artery Disease // *J. Am. Coll. Cardiol.* -2008.-V. 52, №22. -P. 1803–1809.
- 29 Barry-Lane, P. A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu, Z., Holland, S. M., Yeh, E. T. H., & Runge, M. S. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^{-/-} mice // *J. Clin. Invest.* -2001.-V. 108, №10. -P. 1513–1522.
- 30 Sheehan, A. L., Carrell, S., Johnson, B., Stanic, B., Banfi, B., & Miller, F. J. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis // *Atherosclerosis.*-2011.-V. 216,№2. -P. 321–326.
- 31 Touyz, R. M., Briones, A. M., Sedek, M., Burger, D., & Montezano, A. C. NOX Isoforms and Reactive Oxygen Species in Vascular Health // *Mol. Interv.* -2011.
- 32 Akasaki, T., Ohya, Y., Kuroda, J., Eto, K., Abe, I., Sumimoto, H., & Iida, M. Increased Expression of gp91phox Homologues of NAD(P)H Oxidase in the Aortic Media during Chronic Hypertension: Involvement of the Renin-Angiotensin System // *Hypertens. Res.* -2006.-V. 29, №10. -P. 813–820.
- 33 Walpole, P. L., Gotlieb, A. I., Cybulsky, M. I., & Langille, B. L. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* -1995.-V. 15, №1. -P. 2–10.
- 34 Godbole, A. S., Lu, X., Guo, X., & Kassab, G. S. NADPH oxidase has a directional response to shear stress // *AJP Hear. Circ. Physiol.* -2008.-V. 296, №1.
- 35 Hwang, J., Saha, A., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., McNally, J. S., Holland, S. M., ... Jo, H. Oscillatory Shear Stress Stimulates Endothelial Production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H Oxidases, Leading to Monocyte Adhesion // *J. Biol. Chem.* -2003.-V. 278, №47. -P. 47291–47298.
- 36 West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... Ghosh, S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS // *Nature.* -2011.-V. 472, №7344. -P. 476–480.
- 37 Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation // *Nature.* -2011.-V. 469,№7329. -P. 221–226.
- 38 Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., ... Latz, E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals // *Nature.* -2010.-V.464, №7293. -P. 1357–1361.
- 39 Li H., Horke S., Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis // *Atherosclerosis.* -2014.
- 40 Epstein B.J., Smith S.M., Choksi R. Recent changes in the landscape of combination RAS blockade // *Expert Review of Cardiovascular Therapy.* -2009.
- 41 Chabrashvili, T., Kitiyakara, C., Blau, J., Karber, A., Aslam, S., Welch, W. J., & Wilcox, C. S. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* -2003.-V. 285, №154-1.

- 42 Kitiyakara, C., Chabrashvili, T., Chen, Y., Blau, J., Karber, A., Aslam, S., ... Wilcox, C. S. Oxidative Stress, and Renal Expression of NADPH Oxidase and Superoxide Dismutase // *J. Am. Soc. Nephrol.* -2003.-V. 14, №11. -P. 2775–2782.
- 43 Feng, D., Yang, C., Geurts, A. M., Kurth, T., Liang, M., Lazar, J., ... Cowley, A. W. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunit p67 phox in the renal medulla contributes to excess oxidative stress and salt-sensitive hypertension // *Cell Metab.* -2012.-V. 15, №2. -P. 201–208.
- 44 Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., ... Yabe-Nishimura, C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: A study in Nox1-deficient mice // *Circulation.* -2005.-V. 112, №17. -P. 2677–2685.
- 45 Wang, H. D., Xu, S., Johns, D. G., Du, Y., Quinn, M. T., Cayatte, A. J., & Cohen, R. A. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice // *Circ. Res.* -2001.-V. 88, №9. -P. 947–953.
- 46 Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., McCann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., ... Harrison, D. G. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction // *J. Exp. Med.* -2007.-V. 204, №10. -P. 2449–2460.
- 47 Zhang, A., Jia, Z., Wang, N., Tidwell, T. J., & Yang, T. Relative contributions of mitochondria and NADPH oxidase to deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in mice // *Kidney Int.* -2011.-V. 80, №1. -P. 51–60.
- 48 Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., ... Dikalov, S. I. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension // *Circ. Res.* -2010.-V. 107, №1. -P. 106–116.
- 49 Widder, J. D., Fraccarollo, D., Galuppo, P., Hansen, J. M., Jones, D. P., Ertl, G., & Bauersachs, J. Attenuation of angiotensin ii-induced vascular dysfunction and hypertension by overexpression of thioredoxin 2 // *Hypertension.* -2009.-V. 54, №2. -P. 338–344.
- 50 Doughan A.K., Harrison D.G., Dikalov S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction // *Circ. Res.* -2008.-V. 102, №4. -P. 488–496.
- 51 Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine // *Cell.* -2012.
- 52 Nogueira V., Hay N. Molecular pathways: Reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy // *Clin. Cancer Res.* -2013.-V. 19, №16. -P. 4309–4314.
- 53 Sautin Y.Y., Johnson R.J. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* -2008.-V. 27. -P. 608–619.
- 54 Closa D., Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response // *IUBMB Life.* -2004.-V.56, №4. -P. 185–191.
- 55 Coleman M.D. Use of in vitro methaemoglobin generation to study antioxidant

- status in the diabetic erythrocyte // *Biochemical Pharmacology*. -2000.-V. 60, №10. -P. 1409–1416.
- 56 Richards, R. S., Roberts, T. K., Dunstan, R. H., McGregor, N. R., & Butt, H. L. Erythrocyte antioxidant systems protect cultured endothelial cells against oxidant damage // *Biochem Mol Biol Int*. -1998.-V.46, №5. -P. 857–865.
- 57 Lynch R.E., Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical // *J. Biol. Chem*. -1978.-V.253, №13. -P. 4697–4699.
- 58 Praticò D. Antioxidants and endothelium protection // *Atherosclerosis*. -2005.-V.181, №2. -P. 215–224.
- 59 Okuda, M., Inoue, N., Azumi, H., Seno, T., Sumi, Y., Hirata, K. I., ... Yokoyama, M. Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: Its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. -2001. -V.21, № 9. -P. 1483–1487.
- 60 Hamanishi, T., Furuta, H., Kato, H., Doi, A., Tamai, M., Shimomura, H., ... Nanjo, K. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients // *Diabetes*. -2004. -V.53, № 9.- P. 2455–2460.
- 61 Forgione, M. A., Weiss, N., Heydrick, S., Cap, A., Klings, E. S., Bierl, C., ... Loscalzo, J. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol*. -2002. -V.282, № 4.-P. H1255–H1261.
- 62 Keegan, A., Walbank, H., Cotter, M. A., & Cameron, N. E. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta // *Diabetologia*. -1995. -V.38,№12. -P. 1475–1478.
- 63 Çinar, M. G., Ülker, S., Alper, G., & Evinç, A. Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats // *Pharmacology*. -2001-V.62, №1. -P. 56–64.
- 64 Heitzer T., Just H., Münzel T. Antioxidant Vitamin C Improves Endothelial Dysfunction in Chronic Smokers // *Circulation*. -1996.-V.94,№1. -P. 6–9.
- 65 Timimi, F. K., Ting, H. H., Haley, E. A., Roddy, M. A., Ganz, P., & Creager, M. A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus // *J. Am. Coll. Cardiol*. -1998.-V.31,№3. -P. 552–557.
- 66 Motoyama, T., Kawano, H., Kugiyama, K., Hirashima, O., Ohgushi, M., Tsunoda, R., ... Yasue, H. Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina // *J. Am. Coll. Cardiol*. -1998. -V.32, №6. -P. 1672–1679.
- 67 Kobayashi, S., Inoue, N., Azumi, H., Seno, T., Hirata, K. ichi, Kawashima, S., ... Yokoyama, M. Expressional Changes of the Vascular Antioxidant System in Atherosclerotic Coronary Arteries. // *J. Atheroscler. Thromb*. -2011. -V.9, №4. -P. 184–190.
- 68 Laatikainen, L. E., Incoronato, M., Castellone, M. D., Laurila, J. P., Santoro, M., & Laukkanen, M. O. SOD3 decreases ischemic injury derived apoptosis

- through phosphorylation of Erk1/2, Akt, and Foxo3a // *PLoS One*. -2011.-V.6, №8. -P. 1-8.
69. Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities // *Antioxid. Redox Signal*. -2011.-V.15, №7. -P. 1957 - 1997.
70. Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine // *Free Radical Biology and Medicine*. -2003.-V.35, №3. -P. 236–256.
71. Qin, Z., Reszka, K. J., Fukai, T., & Weintraub, N. L. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD // *Translational Research*. -2008.-V.151, №2. -P. 68–78.
72. Campo, S., Sardo, A. M., Campo, G. M., D'Ascola, A., Avenoso, A., Castaldo, M., ... Calatroni, A. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene mutations screening in a sample of Mediterranean population // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. -2005.-V.578, №1–2. -P. 143–148.
73. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine // *Alternative Medicine Review*. -2002. -V.7, №1. -P. 22 - 44.
74. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids // *Yonsei Medical Journal*. -2004.-V.45, №5. -P. 776 - 788.
75. Brosnan J.T., Brosnan M.E. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview // *J. Nutr*. -2018.-V.136, №6. -P. 1636S–1640S.
76. Rezk, B. M., Haenen, G. R. M. M., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. Lipoic Acid Protects Efficiently only against a Specific Form of Peroxynitrite-induced Damage // *J. Biol. Chem*. -2004.-V.279, №11. -P. 9693–9697.
77. Manna P., Das J., C. Sil P. Role of Sulfur Containing Amino Acids as an Adjuvant Therapy in the Prevention of Diabetes and its Associated Complications // *Curr. Diabetes Rev*. -2013.-V.9, №3. -P. 237–248.
78. Arnér E.S.J., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // *European Journal of Biochemistry*. -2000.-V.267, №20. -P. 6102 - 6109.
79. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions // *Free Radical Biology and Medicine*. -1999.-V.27, №9-10. -P. 916-921.
80. Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. The glutathione system. I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem*. -2009.-V.3, № 2. -P. 129–144.
81. Lushchak V.I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions // *J. Amino Acids*. -2012.-V. 2012. -P. 1 - 26.
82. Anderson M.E. Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation // *Chem. Biol. Interact*. -1998.-V.111-112. -P. 1-14.
83. Bansal A., Celeste Simon M. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance // *Journal of Cell Biology*. -2018.-V.217, №7. -P. 2291 - 2298.
84. Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato,

- M. A., ... Domenicotti, C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. -2013.-V.2013. -P. 1 - 10.
- 85 Griffith O.W., Mulcahy R.T. The enzymes of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase // *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Part A: Mechanism of Enzyme Action*. -2006.-V.73. -P. 209–267.
- 86 Dickinson, D. A., Levonen, A. L., Moellering, D. R., Arnold, E. K., Zhang, H., Darley-USmar, V. M., & Forman, H. J. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element // *Free Radical Biology and Medicine*. -2004.-V.37, №8. -P. 1152 - 1159.
- 87 Iles K.E., Liu R.M. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal // *Free Radical Biology and Medicine*. -2005.-V.38, №5. -P. 547 - 556.
- 88 Mani, M., Khaghani, S., Mohammadi, T. G., Zamani, Z., Azadmanesh, K., Meshkani, R., ... Mostafavi, E. Activation of Nrf2-Antioxidant Response Element Mediated Glutamate Cysteine Ligase Expression in Hepatoma Cell line by Homocysteine // *Hepat. Mon.* -2013.-V.13, № 5. -P. e8394.
- 89 Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., & Kan, Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* -1994. -V.91, № 21. P. 9926–9930.
- 90 Nguyen T., Sherratt P.J., Pickett C.B. Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated by the Antioxidant Response Element // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* -2003. -V.43, № 1.- P. 233–260.
- 91 Mulcahy R.T., Gipp J.J. Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* -1995. -V.209, № 1. -P. 227–233.
- 92 Koide, S. I., Kugiyama, K., Sugiyama, S., Nakamura, S. I., Fukushima, H., Honda, O., ... Ogawa, H. Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* -2003.-V.41, № 4. -P. 539–545.
- 93 Nakamura, S. ichi, Kugiyama, K., Sugiyama, S., Miyamoto, S., Koide, S. ichi, Fukushima, H., ... Ogawa, H. Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction // *Circulation*. -2002. -V.105, № 25.-P. 2968–2973.
- 94 Mandal, P. K., Seiler, A., Perisic, T., Kölle, P., Canak, A. B., Förster, H., ... Conrad, M. System xc- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency // *J. Biol. Chem.* -2010.-V.285, №29. -P. 22244–22253.
- 95 Rimaniol, A. C., Mialocq, P., Clayette, P., Dormont, D., & Gras, G. Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages // *Am J Physiol Cell Physiol*. -2001.-V.281. -P. C1964–C1970.
- 96 Knickelbein, R. G., Seres, T., Lam, G., Johnston, R. B., & Warshaw, J. B.

- Characterization of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells. // *Am. J. Physiol.* -1997.-V.273, №6. -P. L1147 - L1155.
- 97 Olivieri, O., Girelli, D., Azzini, M., Stanzial, A. M., Russo, C., Ferroni, M., & Corrocher, R. Low selenium status in the elderly influences thyroid hormones // *Clin. Sci.* -1995.-V. 89, №6. -P. 637-642.
- 98 Rayman M.P. Selenium and human health // *The Lancet.* -2012.-V.100, №2. -P. 254 - 268.
- 99 Rayman M.P. The importance of selenium to human health // *Lancet.* -2000.-V.356, №9225. -P. 233 - 241.
- 100 Reeves M.A., Hoffmann P.R. The human selenoproteome: Recent insights into functions and regulation // *Cellular and Molecular Life Sciences.* -2009. -V.66, № 15. -P. 2457–2478.
- 101 Behne D., Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins // *Annu. Rev. Nutr.* -2001.-V.21, №1. -P. 453 - 473.
- 102 Shiobara Y., Yoshida T., Suzuki K.T. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* -1998.-V.152, №2. -P. 309-314.
- 103 Allan C.B., Lacourciere G.M., Stadtman T.C. Responsiveness of Selenoproteins To Dietary Selenium // *Annu. Rev. Nutr.* 1999.-V.19, №1. -P. 1 - 16.
- 104 Wu Q., Huang K. Effect of long-term se deficiency on the antioxidant capacities of rat vascular tissue // *Biol. Trace Elem. Res.* -2004.-V. 98, №1. -P. 73–84.
- 105 Ricetti, M. M., Guidi, G. C., Bellisola, G., Marrocchella, R., Rigo, A., & Perona, G. Selenium enhances glutathione peroxidase activity and prostacyclin release in cultured human endothelial cells - Concurrent effects on mRNA levels // *Biol. Trace Elem. Res.* -1994.-V. 46, №1–2. -P. 113–123.
- 106 Combs G.F. Selenium in global food systems // *Br. J. Nutr.* -2001.-V. 85, №5. -P. 517–547.
- 107 Low, S. C., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W., & Berry, M. J. SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy // *EMBO J.* -2000.-V. 19, №24. -P. 6882–6890.
- 108 Squires, J. E., Stoytchev, I., Forry, E. P., & Berry, M. J. SBP2 Binding Affinity Is a Major Determinant in Differential Selenoprotein mRNA Translation and Sensitivity to Nonsense-Mediated Decay // *Mol. Cell. Biol.* -2007.-V. 27, №22. -P. 7848–7855.
- 109 Mix H., Lobanov A. V., Gladyshev V.N. SECIS elements in the coding regions of selenoprotein transcripts are functional in higher eukaryotes // *Nucleic Acids Res.* -2007.-V. 35, №2. -P. 414–423.
- 110 Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview // *FEBS J.* -2008.-V. 275, №15. -P. 3959–3970.
- 111 Mariotti, M., Ridge, P. G., Zhang, Y., Lobanov, A. V., Pringle, T. H., Guigo, R., ... Gladyshev, V. N. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes // *PLoS One.* -2012.-V. 7, №3. -P. e33066.

- 112 Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., & Tosatto, S. C. E. Evolutionary and Structural Insights Into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily // *Antioxid. Redox Signal.* -2008.-V. 10, №9. -P. 1501–1513.
- 113 Herbet S., Roeckel-Drevet P., Drevet J.R. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers // *FEBS Journal.* -2007.-V. 274, №2007. -P. 2163–2180.
- 114 Dear T.N., Campbell K., Rabbitts T.H. Molecular Cloning of Putative Odorant-Binding and Odorant-Metabolizing Proteins // *Biochemistry.* -1991.-V. 30, №43. -P. 10376–10382.
- 115 Cardoso, B. R., Hare, D. J., Bush, A. I., & Roberts, B. R. Glutathione peroxidase 4: A new player in neurodegeneration? // *Molecular Psychiatry.* -2017.-V. 22, №3. -P. 328 - 335.
- 116 Maiorino, F. M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., & Flohé, L. Diversity of Glutathione Peroxidases // *Methods Enzymol.* -1995. -V. 252, № C. P. 38–53.
- 117 EPP O., LADENSTEIN R., WENDEL A. The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution // *Eur. J. Biochem.* -1983.-V. 133, №1. -P. 51–69.
- 118 Tosatto, S. C. E., Bosello, V., Fogolari, F., Mauri, P., Roveri, A., Toppo, S., ... Maiorino, M. The Catalytic Site of Glutathione Peroxidases // *Antioxid. Redox Signal.* -2008.-V. 10, №9. -P. 1515–1525.
- 119 Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., & Maiorino, M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* -2009.-V. 1790, №11. -P. 1486 - 1500.
- 120 Imai H., Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells // *Free Radical Biology and Medicine.* -2003.-V. 34, №2. -P. 145-169.
- 121 Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., ... Takahashi, K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P // *J. Biol. Chem.* -2002.-V. 277, №43. -P. 41254–41258.
- 122 Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., & Ursini, F. A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms // *Antioxid. Redox Signal.* -2011.-V. 15, №3. -P. 763 - 780.
- 123 Alissa E.M., Bahijri S.M., Ferns G.A. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence // *Med Sci.Monit.* -2003.-V. 9, №1. -P. RA9-18.
- 124 Klotz, L. O., Kröncke, K. D., Buchczyk, D. P., & Sies, H. Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the Cellular Defense against Oxidative and Nitrosative Stress // *J. Nutr.* -2003.-V. 133, №5. -P. 1448S–1451S.
- 125 Chen Q.M., Morrissy S., Alpert J.S. Oxidative Stress and Heart Failure / *Comprehensive Toxicology: Third Edition.* -2017.-P. 230 - 251.
- 126 Bhowmick D., Mughesh G. Insights into the catalytic mechanism of synthetic glutathione peroxidase mimetics // *Organic and Biomolecular Chemistry.* -

- 2015.-V. 13, №41. -P. 10262 - 10272.
- 127 Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J. A., Sunde, R. A., Beckett, G. J., Arthur, J. R., & Hesketh, J. E. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. // *Biochem. J.* -1995.-V. 311, №2. -P. 425-430.
 - 128 Hatfield, D. L., Schweizer, U., Tsuji, P. A., & Gladyshev, V. N. Selenium: Its molecular biology and role in human health / Springer International Publishing. 2011.-P. 1 - 628.
 - 129 Holben D.H., Smith A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review // *Journal of the American Dietetic Association.* -1999.-V. 99, №7. -P. 836 - 843.
 - 130 Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., & Sies, H. Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxyxynitrite // *Chem. Res. Toxicol.* - 1998.-V. 11, №12. -P. 1398–1401.
 - 131 Marinho H.S., Antunes F., Pinto R.E. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides // *Free Radic. Biol. Med.* -1997.-V. 22, №5. - P. 871–883.
 - 132 Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., ... Conrad, M. Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death // *Cell Metab.* -2008.-V. 8, №3. -P. 237–248.
 - 133 Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., & Funk, C. D. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia // *J. Biol. Chem.* - 1997.-V. 272, №26. -P. 16644–16651.
 - 134 De Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R. D., Cheung, N. S., ... Kola, I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* - 1998.-V. 273, №35. -P. 22528–22536.
 - 135 Cheng, W. H., Ho, Y. S., Valentine, B. A., Ross, D. A., Combs, G. F., & Lei, X. G. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice // *J. Nutr.* -1998.-V. 128, №7. -P. 1070–1076.
 - 136 Cowan, D. B., Weisel, R. D., Williams, W. G., & Mickle, D. A. G. Identification of oxygen responsive elements in the 5' flanking region of the human glutathione peroxidase gene // *J. Biol. Chem.* -1993.-V. 268, №36. -P. 26904–26910.
 - 137 Merante, F., Altamentova, S. M., Mickle, D. A. G., Weisel, R. D., Thatcher, B. J., Martin, B. M., ... Li, R. K. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension // *Mol. Cell. Biochem.* -2002.-V. 229, №1–2. -P. 73–83.
 - 138 Jornot L., Junod A.F. Hyperoxia, unlike phorbol ester, induces glutathione

- peroxidase through a protein kinase C-independent mechanism // *Biochem. J.* - 1997.-V. 326, №1. -P. 117–123.
- 139 Cho, C. S., Kato, G. J., Yang, S. H., Bae, S. W., Lee, J. S., Gladwin, M. T., & Rhee, S. G. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. // *Antioxid. Redox Signal.* - 2010.-V. 13, №1. -P. 1–11.
- 140 Tan, M., Li, S., Swaroop, M., Guan, K., Oberley, L. W., & Sun, Y. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53 // *J. Biol. Chem.* -1999.-V. 274, №17. -P. 12061–12066.
- 141 Zhou L.Z.H., Johnson A.P., Rando T.A. NFκB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells // *Free Radic. Biol. Med.* -2001.-V. 31, №11. -P. 1405–1416.
- 142 Borrás, C., Gambini, J., Gómez-Cabrera, M. C., Sastre, J., Pallardó, F. V., Mann, G. E., & Viña, J. 17β-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFκB cascade // *Aging Cell.* -2005.-V. 4, №3. -P. 113–118.
- 143 Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F. V., & Viña, J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males // *Free Radic. Biol. Med.* -2003.-V. 34, №5. -P. 546–552.
- 144 Pinto R.E., Bartley W. The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. // *Biochem. J.* -1969.-V. 115, №3. -P. 449–456.
- 145 Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., & Curran, T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro // *Science (80-.).* -1990.-V. 249, №4973. -P. 1157–1161.
- 146 Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., ... Spiegelman, B. M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 // *Cell.* -1999.-V. 98, №1. -P. 115–124.
- 147 St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., ... Spiegelman, B. M. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators // *Cell.* -2006.-V. 127, №2. -P. 397–408.
- 148 Hernandez-Montes, E., Pollard, S. E., Vauzour, D., Jofre-Montseny, L., Rota, C., Rimbach, G., ... Spencer, J. P. E. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* -2006.-V. 346, №3. -P. 851–859.
- 149 Singh, A., Rangasamy, T., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Osburn, W. O., Brigelius-Flohé, R., ... Biswal, S. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2 // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* -2006.-V. 35, №6. -P. 639–650.
- 150 Copeland P.R., Driscoll D.M. Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS- binding protein 2, a protein involved in selenoprotein

- biosynthesis // *J. Biol. Chem.* -1999.-V. 274, №36. -P. 25447–25454.
- 151 Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P., & Krol, A. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. // *EMBO J.* -2000.-V. 19, №17. -P. 4796–4805.
- 152 Papp, L. V., Lu, J., Striebel, F., Kennedy, D., Holmgren, A., & Khanna, K. K. The Redox State of SECIS Binding Protein 2 Controls Its Localization and Selenocysteine Incorporation Function // *Mol. Cell. Biol.* -2006.-V. 26, №13. -P. 4895–4910.
- 153 Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Harney, J. W., Driscoll, D. M., ... Berry, M. J. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion // *EMBO Rep.* -2000.-V. 1, №2. -P. 158–163.
- 154 Silva A.L., Romão L. The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? // *FEBS Letters.* -2009.-V. 583, №3. -P. 499 - 505.
- 155 Weiss Sachdev S., Sunde R.A. Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver // *Biochem. J.* -2001.-V. 357, №3. -P. 851–858.
- 156 Dumitrescu, A. M., Cosmo, C. D., Liao, X. H., Weiss, R. E., & Refetoff, S. The Syndrome of Inherited Partial SBP2 Deficiency in Humans // *Antioxid. Redox Signal.* -2010.-V. 12, №7. -P. 905 - 920.
- 157 Azevedo, M. F., Barra, G. B., Naves, L. A., Velasco, L. F. R., Castro, P. G. G., De Castro, L. C. G., ... Neves, F. D. A. R. Selenoprotein-related disease in a young girl caused by nonsense mutations in the SBP2 gene // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* -2010.-V. 95, №8. -P. 4066–4071.
- 158 Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., ... Lackner, K. J. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease // *N. Engl. J. Med.* -2003.-V. 349, №17. -P. 1605–1613.
- 159 Schnabel, R., Lackner, K. J., Rupprecht, H. J., Espinola-Klein, C., Torzewski, M., Lubos, E., ... Blankenberg, S. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: Results from the atherogene study // *J. Am. Coll. Cardiol.* -2005.-V. 45, №10. -P. 1631–1637.
- 160 Espinola-Klein, C., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Schnabel, R., Genth-Zotz, S., Torzewski, M., ... Blankenberg, S. Glutathione Peroxidase-1 Activity, Atherosclerotic Burden, and Cardiovascular Prognosis // *Am. J. Cardiol.* -2007.-V. 99, №6. -P. 808–812.
- 161 Covas, M. I., Flores-Mateo, G., Carrillo-Santisteve, P., Elosua, R., Guallar, E., Marrugat, J., & Bleys, J. Antioxidant Enzyme Activity and Coronary Heart Disease: Meta-analyses of Observational Studies // *Am. J. Epidemiol.* -2009.-V. 170, №2. -P. 135–147.
- 162 Lei, C., Niu, X., Wei, J., Zhu, J., & Zhu, Y. Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy // *Clin. Chim. Acta.* -2009.-V. 399, №1–2. -P. 102–108.
- 163 Kuzuya, M., Ando, F., Iguchi, A., & Shimokata, H. Glutathione peroxidase 1

- Pro198Leu variant contributes to the metabolic syndrome in men in a large Japanese cohort // *Am. J. Clin. Nutr.* -2008.-V. 87, №6. -P. 1939–1944.
- 164 Nemoto, M., Nishimura, R., Sasaki, T., Hiki, Y., Miyashita, Y., Nishioka, M., ... Tajima, N. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography // *Cardiovasc. Diabetol.* -2007.-V. 6, №1. -P. 1 - 7.
- 165 Oguri, M., Kato, K., Hibino, T., Yokoi, K., Segawa, T., Matsuo, H., ... Yamada, Y. Genetic risk for restenosis after coronary stenting // *Atherosclerosis.* -2007.-V. 194, №2. -P. e172–e178.
- 166 Tang, N. P., Wang, L. S., Yang, L., Gu, H. J., Sun, Q. M., Cong, R. H., ... Wang, B. Genetic variant in glutathione peroxidase 1 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease in a Chinese population // *Clin. Chim. Acta.* -2008.-V. 395, №1–2. -P. 89–93.
- 167 Soerensen, M., Christensen, K., Stevnsner, T., & Christiansen, L. The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old // *Mech. Ageing Dev.* -2009.-V. 130, №5. -P. 308–314.
- 168 Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., ... Nakagawa, Y. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* -2003.-V. 305, №2. -P. 278–286.
- 169 Smith, A. C., Mears, A. J., Bunker, R., Ahmed, A., MacKenzie, M., Schwartzentruber, J. A., ... Graham, G. E. Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia // *J. Med. Genet.* -2014.-V. 51, №7. -P. 470–474.
- 170 Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., & Gregolin, C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* -1982.-V. 710, №2. -P. 197–211.
- 171 Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F., & Girotti, A. W. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* -1990.-V. 1045, №3. -P. 252–260.
- 172 Chisolm, G. M., Ma, G., Irwin, K. C., Martin, L. L., Gunderson, K. G., Linberg, L. F., ... Dicatorleto, P. E. 7 β -Hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* -1994.-V. 91, №24. -P. 11452–11456.
- 173 Weitzel F., Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone // *J. Biol. Chem.* -1993.-V. 268, №9. -P. 6288–6292.
- 174 Schnurr, K., Belkner, J., Ursini, F., Schewe, T., & Kühn, H. The selenoenzyme

- phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products // *J. Biol. Chem.* -1996.-V. 271, №9. -P. 4653–4658.
- 175 Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., & Nakagawa, Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // *J. Biol. Chem.* -1998.-V. 273, №4. -P. 1990–1997.
- 176 Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors // *Biological Chemistry.* -2006.-V. 387, №10-11. -P.1329-1335.
- 177 Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation // *Trends in Cell Biology.* -2016.-V. 26, №3. -P. 165 - 176.
- 178 Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... Stockwell, B. R. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 // *Cell.* -2014.-V. 156, №1–2. -P. 317–331.
- 179 Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* -2016.-V. 113, №34. -P. E4966–E4975.
- 180 Aumann, K. D., Bedorf, N., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, D., & Flohé, L. Glutathione peroxidase revisited--simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. // *Biomed. Environ. Sci.* -1997.-V. 10, №2–3. -P. 136–155.
- 181 Ursini F., Maiorino M., Roveri A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? // *Biomed. Environ. Sci.* -1997.-V. 10, №2–3. -P. 327–332.
- 182 Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Roveri, A., Maiorino, M., Nisii, C., ... Panfili, E. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis nuclei is bound to chromatin // *Biochem. Mol. Med.* -1996.-V. 59, №2. -P. 118–124.
- 183 Maiorino, M., Roveri, A., Benazzi, L., Bosello, V., Mauri, P., Toppo, S., ... Ursini, F. Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase // *J. Biol. Chem.* -2005.-V. 280, №46. -P. 38395–38402.
- 184 Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., & Flohé, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation // *Science (80-.)* -1999.-V. 285, №5432. -P. 1393–1396.
- 185 Kelner M.J., Montoya M.A. Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): Chromosomal localization to 19p13.3 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* -1998.-V. 249, №1. -P. 53–55.
- 186 Baker L.M.S., Poole L.B. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*: Sulfenic acid formation and overoxidation of essential Cys61 // *J. Biol. Chem.* -2003.-V. 278, №11. -P. 9203–9211.

- 187 Roveri A., Maiorino M., Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase // *Methods Enzymol.* -1994.-V. 233, №C. -P. 202–212.
- 188 Maiorino, M., Chu, F. F., Ursini, F., Davies, K. J. A., Doroshow, J. H., & Esworthy, R. S. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines // *J. Biol. Chem.* -1991.-V. 266, №12. -P. 7728–7732.
- 189 Pushpa-Rekha, T. R., Burdsall, A. L., Oleksa, L. M., Chisolm, G. M., & Driscoll, D. M. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites // *J. Biol. Chem.* -1995.-V. 270, №45. -P. 26993–26999.
- 190 Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., & Behne, D. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation // *FASEB J.*-2001.-V. 15, №7. -P. 1236–1238.
- 191 Casañas-Sánchez, V., Pérez, J. A., Fabelo, N., Herrera-Herrera, A. V., Fernández, C., Marín, R., ... Díaz, M. Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: Potential implications in neuroprotection // *J. Neurochem.* -2014.-V. 131, №4. -P. 470–483.
- 192 Maiorino, M., Scapin, M., Ursini, F., Biasolo, M., Bosello, V., & Flohé, L. Distinct Promoters Determine Alternative Transcription of gpx-4 into Phospholipid-Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Variants // *J. Biol. Chem.* -2003.-V. 278, №36. -P. 34286–34290.
- 193 Savaskan, N. E., Ufer, C., Kühn, H., & Borchert, A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: From genomic structure to developmental expression and neural function // *Biological Chemistry.* -2007.-V. 388, №10. -P. 1007 - 1017.
- 194 Arai, M., Imai, H., Sumi, D., Imanaka, T., Takano, T., Chiba, N., & Nakagawa, Y. Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* -1996.-V. 227, №2. -P. 433–439.
- 195 Huang H.S., Chen C.J., Chang W.C. The CCAAT-box binding factor NF-Y is required for the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells // *FEBS Lett.* -1999.-V. 455, №1–2. -P. 111–116.
- 196 Ufer C., Borchert A., Kuhn H. Functional characterization of cis- and transregulatory elements involved in expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // *Nucleic Acids Res.* -2003.-V. 31, №15. -P. 4293–4303.
- 197 Tramer F. et al. cAMP-response element modulator-tau activates a distinct promoter element for the expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene // *Biochem J.* -2004.-V. 383, №1. -P. 179 - 185.

- 198 Copeland, P. R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., & Driscoll, D. M. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs // *EMBO J.* -2000.-V. 19, №2. -P. 306–314.
- 199 Villette, S., Kyle, J. A. M., Brown, K. M., Pickard, K., Milne, J. S., Nicol, F., ... Hesketh, J. E. A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism // *Blood Cells Mol Dis.* -2002.-V. 29, № 2. -P. 174–178.
- 200 Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. // *Circulation.* -1976.-V. 54, № 3. -P. 522–523.
- 201 Rapaport, E., Bernard, R., & Corday, E. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. // *Circulation.* -1979.-V. 59, № 3. -P. 607–609.
- 202 Nakamura, S. I., Sugiyama, S., Fujioka, D., Kawabata, K. I., Ogawa, H., & Kugiyama, K. Polymorphism in glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with impairment of nitric oxide-mediated coronary vasomotor function // *Circulation.* -2003. -V. 108, № 12. -P. 1425–1427.
- 203 Daley, S. J., Herderick, E. E., Fredrick Cornhill, J., & Rogers, K. A. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis - Part 1: Differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* -1994.-V. 14, №1. -P. 95–104.
- 204 Buchwalow I.B., Böcker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods / Immunohistochemistry: Basics and Methods.* -2010. Springer Berlin Heidelberg.
- 205 Hofman F.M., Taylor C.R. *Immunohistochemistry // Curr. Protoc. Immunol. Curr. Protoc. Immunol.* -2013.-V. 103. -P. 21.4.1-21.4.26.
- 206 Stary H.C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions an update // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* -2000. -V. 20, № 5. -P. 1177 - 1178.
- 207 Sanz J., Fayad Z.A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease // *Nature.* -2008. -V. 451, № 7181. -P. 953 - 957.
- 208 Ramos-Vara J.A. Principles and methods of immunohistochemistry // *Methods in Molecular Biology.* -2017. -V. 1641. -P. 115–128.
- 209 Ikeda, K., Monden, T., Kanoh, T., Tsujie, M., Izawa, H., Haba, A., ... Monden, M. Extraction and Analysis of Diagnostically Useful Proteins from Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections // *J. Histochem. Cytochem.* -1998.-V. 46, №3. -P. 397–403.
- 210 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* -1976.-V. 72, №1–2. -P. 248–254.
- 211 Maganto-Garcia E., Tarrío M., Lichtman A.H. Mouse models of atherosclerosis // *Curr. Protoc. Immunol.* -2012.
- 212 Breslow J.L. Mouse models of atherosclerosis // *Science (80-.).* -1996.-V. 272,

- №5262. -P. 685–688.
- 213 Stehbens W.E. An appraisal of cholesterol feeding in experimental atherogenesis // *Prog. Cardiovasc. Dis.* -1986.-V. 29, №2. -P. 107–128.
 - 214 Fernandez M.L., Volek J.S. Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation // *Nutrition and Metabolism.* -2006.-V. 3, №1. -P. 1 - 6.
 - 215 Fernandez M.L., Wood R.J. Guinea pigs as models for human cholesterol and lipoprotein metabolism // *Source Book of Models for Biomedical Research.* - 2008. -P. 201 - 212.
 - 216 Kushwaha R.S., McGill H.C. Diet, plasma lipoproteins and experimental atherosclerosis in baboons (*Papio sp.*) // *Human Reproduction Update.* 1998.
 217. Shamekh R. et al. Endogenous and diet-induced hypercholesterolemia in nonhuman primates: Effects of age, adiposity, and diabetes on lipoprotein profiles // *Metabolism.* -2011. -V. 4. -P. 420–429.
 - 218 Marotti, K. R., Castle, C. K., Murray, R. W., Rehberg, E. F., Polites, H. G., & Melchior, G. W. The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein A-I metabolism: Insights from studies with transgenic mice // *Arterioscler. Thromb.* -1992.-V. 12, №6. -P. 736–744.
 - 219 Meineri G., Giacobini M., Forneris G. Evaluation of physiological parameters of the plasma oxidative status in rabbits // *J. Appl. Anim. Res.* -2017.-V. 45, №1. -P. 315–319.
 - 220 Stylianou, I. M., Bauer, R. C., Reilly, M. P., & Rader, D. J. Genetic basis of atherosclerosis: Insights from mice and humans // *Circulation Research.* -2012.-V. 11, №2. -P. 337 - 355.
 - 221 Henderson J.D., Webster W.S., Clarkson T.B. Diet-induced hypercholesterolemia in the chinchilla and rabbit // *Atherosclerosis.* -1970.-V. 12, №3. -P. 341–348.
 - 222 Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., & Chen, Y. E. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine // *Pharmacology and Therapeutics.* - 2015.-V.146. -P. 104 - 119.
 - 223 Roberts, D. C. K., West, C. E., Redgrave, T. G., & Smith, J. B. Plasma cholesterol concentration in normal and cholesterol-fed rabbits. Its variation and heritability // *Atherosclerosis.* -1974.-V. 19, №3. -P. 369–380.
 - 224 Stary H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions // *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology.* -1992. Springer-Verlag.
 - 225 Olson R.E. Is it wise to restrict fat in the diets of children? // *J. Am. Diet. Assoc.* 2000.
 - 226 Rodriguez E.R., Tan C.D. Cardiovascular pathology // *Essentials of Anatomic Pathology: Fourth Edition.* -2016.
 - 227 Garn, S. M. Diet and health: implications for reducing chronic disease risk. Committee on Diet and Health, National Research Council // *Am Journal of Human Biology.* -1990.-V. 2, №5. -P. 587–588.

- 228 Serras F. The benefits of oxidative stress for tissue repair and regeneration // *Fly*. -2016.-V. 10, №3. -P. 128 - 133.
- 229 Lu D., Kassab G.S. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology // *Journal of the Royal Society Interface*. -2011.-V. 8, №63. -P. 1379 - 1385.
230. Stralin P., Marklund S.L. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts // *Biochem. J.* -1994.-V. 298, №2. -P. 347–352.
- 231 Foresman E.L., Miller F.J. Extracellular but not cytosolic superoxide dismutase protects against oxidant-mediated endothelial dysfunction // *Redox Biol.* - 2013.-V. 1, №1. -P. 292–296.
- 232 Maifrino, L. B. M., de Lima, N. E. A., Marques, M. R., Cardoso, C. G., de Souza, L. B., Tomé, T. de C., ... Fonseca, F. L. A. Evaluation of collagen fibers, MMP2, MMP9, 8-OHdG and apoptosis in the aorta of ovariectomized LDL knockout mice submitted to aerobic exercise // *Arq. Bras. Cardiol.* -2019.-V. 112, №2. -P. 180–188.
- 233 Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., ... Frid, M. G. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function // *Annu. Rev. Physiol.* - 2013.-V. 75, №1. -P. 23 - 47.
- 234 Maiellaro K., Taylor W.R. The role of the adventitia in vascular inflammation // *Cardiovascular Research*. -2007.-V. 75, №4. -P. 640 - 648.
- 235 Marklund S.L. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts // *J. Biol. Chem.* - 1992.-V. 267, №10. -P. 6696–6701.
- 236 Fukai, T., Siegfried, M. R., Ushio-Fukai, M., Cheng, Y., Kojda, G., & Harrison, D. G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training // *J. Clin. Invest.* -2000.-V. 105, №11. -P. 631–1639.
- 237 Lin, S.-L., Lee, S.-T., Yeh, J.-L., & Geng, Y.-J. BACULOVIRUSES-MEDIATED SUPEROXIDE DISMUTASE GENE THERAPY INHIBITS SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION, MIGRATION, INFLAMMATION, AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BALLOON-INJURED ARTERIES // *J. Am. Coll. Cardiol.* -2017.-V. 69, №11. -P. 2030.
- 238 Lin, S. L., Yeh, J. L., Tsai, P. C., Chang, T. H., Huang, W. C., Lee, S. T., ... Sulistyowati, E. Inhibition of Neointima Hyperplasia, Inflammation, and Reactive Oxygen Species in Balloon-Injured Arteries by HVJ Envelope Vector-Mediated Delivery of Superoxide Dismutase Gene // *Transl. Stroke Res.* -2019.-V. 10, №4. -P. 413–427.
- 239 Oshikawa, J., Urao, N., Kim, H. W., Kaplan, N., Razvi, M., McKinney, R., ... Ushio-Fukai, M. Extracellular SOD-derived H₂O₂ promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice // *PLoS One*. - 2010.-V.5, №4. -P. e10189.
- 240 Laukkanen, M. O., Cammarota, F., Esposito, T., Salvatore, M., & Castellone, M. D. Extracellular superoxide dismutase regulates the expression of small

- GTPase regulatory proteins GEFs, GAPs, and GDI // *PLoS One*. -2015.-V. 10, №3. -P. e0121441.
- 241 Ozumi, K., Tasaki, H., Takatsu, H., Nakata, S., Morishita, T., Koide, S., ... Nakashima, Y. Extracellular superoxide dismutase overexpression reduces cuff-induced arterial neointimal formation // *Atherosclerosis*. -2005.-V. 181, №1. -P. 55–62.
- 242 Landmesser, U., Merten, R., Spiekermann, S., Büttner, K., Drexler, H., & Hornig, B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: Relation to endothelium-dependent vasodilation // *Circulation*. -2000.-V. 101, №19. -P. 2264–2270.
- 243 Luoma, J. S., Strålin, P., Marklund, S. L., Hiltunen, T. P., Särkioja, T., & Ylä-Herttuala, S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: Colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* -1998.-V. 18, №2. -P. 157–167.
- 244 Landmesser, U., Merten, R., Spiekermann, S., Büttner, K., Drexler, H., & Hornig, B. Vascular Extracellular Superoxide Dismutase Activity in Patients With Coronary Artery Disease: Relation to Endothelium-Dependent Vasodilation // *Circulation*. -2000. -V. 101, № 19. -P. 2264–2270.
- 245 Libby P., Lichtman A.H., Hansson G.K. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans // *Immunity*. -2013.-V. 38, №6. -P. 1092 - 1104.
- 246 Yin, C., Mohanta, S. K., Srikakulapu, P., Weber, C., & Habenicht, A. J. R. Artery tertiary lymphoid organs: Powerhouses of atherosclerosis immunity // *Frontiers in Immunology*. -2016.-V.7. -P. 1 - 15.
- 247 Tellides G., Pober J.S. Inflammatory and immune responses in the arterial media // *Circulation Research*. -2015.-V. 116, №2. -P. 312 - 322.
- 248 Cochain C., Zerneck A. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts // *Basic Research in Cardiology*. -2015.-V. 110, №4. -P. 1 - 12.
- 249 Otsuka, F., Kramer, M. C. A., Woudstra, P., Yahagi, K., Ladich, E., Finn, A. V., ... Virmani, R. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study // *Atherosclerosis*. -2015.-V. 241, №2. -P. 772–782.
- 250 Shiomi, M., Yamada, S., Matsukawa, A., Itabe, H., & Ito, T. Invasion of atheromatous plaques into tunica media causes coronary outward remodeling in WHHLMI rabbits // *Atherosclerosis*. -2008.-V. 198, №2. -P. 287–293.
- 251 Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., ... Lackner, K. J. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* -2003. -V. 349, № 17. -P. 1605–1613.
- 252 Lapenna, D., De Gioia, S., Ciofani, G., Mezzetti, A., Uchino, S., Calafiore, A. M., ... Cuccurullo, F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques // *Circulation*. -1998.-V. 97, №19. -P. 1930–1934.

- 253 Pagano, P. J., Chanock, S. J., Siwik, D. A., Colucci, W. S., & Clark, J. K. Angiotensin II induces p67(phox) mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts // *Hypertension*. - 1998.-V. 32, №2. -P. 331–337.
- 254 Pagano, P. J., Clark, J. K., Eugenia Cifuentes-Pagano, M., Clark, S. M., Callis, G. M., & Quinn, M. T. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: Enhancement by angiotensin II // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* -1997.-V. 94, №26. -P. 14483–14488.
- 255 Meijles D.N., Pagano P.J. Nox and Inflammation in the Vascular Adventitia // *Hypertension*. -2016. -V.67, №1. -P. 14–19.
- 256 Sorescu, D., Weiss, D., Lassègue, B., Clempus, R. E., Szöcs, K., Sorescu, G. P., ... Griendling, K. K. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis // *Circulation*. -2002.-V. 105, №12. -P. 1429–1435.
- 257 Takapoo, M., Chamseddine, A. H., Bhalla, R. C., & Miller, F. J. Glutathione peroxidase-deficient smooth muscle cells cause paracrine activation of normal smooth muscle cells via cyclophilin A. // *Vascul. Pharmacol.* -2011.-V. 55, №5–6. -P. 143–148.
- 258 Cheng, F., Torzewski, M., Degreif, A., Rossmann, H., Canisius, A., & Lackner, K. J. Impact of Glutathione Peroxidase-1 Deficiency on Macrophage Foam Cell Formation and Proliferation: Implications for Atherogenesis // *PLoS One*. - 2013.-V. 8, №8. -P. e72063.
- 259 Skvortsova L.A. , Ahsan A. , Berkimbayeva Z.A. , Khussainova E.M. , Bekmanov B.O., Mansharipova A.T. D.L.B. Immunohistochemistry of extracellular SOD and GPX1 enzymes in rabbit atherosclerotic lesions // *Вестник КазНМУ*. -2018. -V. 3. -P. 203–207.
- 260 NCBI. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs2536512 [Electronic resource]. 2020. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2536512>.
- 261 Hubackova, M., Vaclavikova, R., Ehrlichova, M., Mrhalova, M., Kodet, R., Kubackova, K., ... Soucek, P. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas // *Int. J. Cancer*. -2012.-V. 130, №2. -P. 338–348.
- 262 Ganguly, K., Depner, M., Fattman, C., Bein, K., Oury, T. D., Wesselkamper, S. C., ... Schulz, H. Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function // *Physiol. Genomics*. -2009.-V. 37, №3. -P. 260–267.
- 263 Rosta, K., Molvarec, A., Enzsöly, A., Nagy, B., Rónai, Z., Fekete, A., ... Vér, Á. Association of extracellular superoxide dismutase (SOD3) Ala40Thr gene polymorphism with pre-eclampsia complicated by severe fetal growth restriction // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* -2009.-V. 142, №2. -P. 134–138.
- 264 Tamai, M., Furuta, H., Kawashima, H., Doi, A., Hamanishi, T., Shimomura, H., ... Nanjo, K. Extracellular superoxide dismutase gene polymorphism is associated with insulin resistance and the susceptibility to type 2 diabetes // *Diabetes Res. Clin. Pract.* -2006.-V. 71, №2. -P. 140–145.

- 265 Dong, X. L., Li, D. J., Liu, H., & Zhao, Y. Y. SOD3 and eNOS genotypes are associated with SOD activity and NOx // *Exp. Ther. Med.* -2014.-V. 8, №1. -P. 328–334.
- 266 Iida, R., Tsubota, E., Takeshita, H., & Yasuda, T. Multiplex single base extension method for simultaneous genotyping of non-synonymous SNP in the three human SOD genes // *Electrophoresis.* -2008.-V. 29, №23. -P. 4788–4794.
- 267 Petersen, S. V., Valnickova, Z., Oury, T. D., Crapo, J. D., Chr Nielsen, N., & Enghild, J. J. The subunit composition of human extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) regulate enzymatic activity // *BMC Biochem.* -2007.-V. 8, №1. -P. 1 - 7.
- 268 Samoila, O. C., Carter, A. M., Futers, S. T., Otiman, G., Anghel, A., Tamas, L., & Seclaman, E. Polymorphic variants of extracellular superoxide dismutase gene in a romanian population with atheroma // *Biochem. Genet.* -2008.-V. 46, №9–10. -P. 634–643.
- 269 Скворцова Л.А. , Байжигитова Д.Т. , Хусаинова Е.М. , Джансугурова Л.Б., Бекманов Б.О., Маншарипова А.Т. Роль полиморфизма Ala58Thr внеклеточной супероксид дисмутаза SOD3 с развитием ишемической болезни сердца в казахстанской популяции // *Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская.* -2016.-V. 4, № 316. -P. 79–85.
- 270 Gautrey, H., Nicol, F., Sneddon, A. A., Hall, J., & Hesketh, J. A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* -2011.-V. 1810, №6. -P. 284–291.
- 271 Villette, S., Kyle, J. A. M., Brown, K. M., Pickard, K., Milne, J. S., Nicol, F., ... Hesketh, J. E. A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism // *Blood Cells, Mol. Dis.* -2002.-V. 29, №2. -P. 174–178.
- 272 Chen C.J., Huang H.S., Chang W.C. Depletion of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase up-regulates arachidonate metabolism by 12S-lipoxygenase and cyclooxygenase 1 in human epidermoid carcinoma A431 cells. // *FASEB J.* -2003.-V. 17, №12. -P. 1694–1696.
- 273 Méplan, C., Crosley, L. K., Nicol, F., Horgan, G. W., Mathers, J. C., Arthur, J. R., & Hesketh, J. E. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: Interaction with sex // *Am. J. Clin. Nutr.* -2008.-V. 87, №4. -P. 1019–1027.
- 274 Crosley, L. K., Bashir, S., Nicol, F., Arthur, J. R., Hesketh, J. E., & Sneddon, A. A. The single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene influences endothelial cell function: Interaction with selenium and fatty acids // *Mol. Nutr. Food Res.* -2013.-V. 57, №12. -P. 2185–2194.
- 275 Bermano, G., Pagmantidis, V., Holloway, N., Kadri, S., Mowat, N. A. G., Shiel, R. S., ... Hesketh, J. E. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer // *Genes Nutr.* -2007.-V. 2, №2. -P. 225–232.

- 276 Polonikov, A. V., Vialykh, E. K., Churnosov, M. I., Illig, T., Freidin, M. B., Vasil'Eva, O. V., ... Solodilova, M. A. The C718T polymorphism in the 3'-untranslated region of glutathione peroxidase-4 gene is a predictor of cerebral stroke in patients with essential hypertension // *Hypertens. Res.* -2012.-V. 35, №5. -P. 507–512.
- 277 Udler, M., Maia, A. T., Cebrian, A., Brown, C., Greenberg, D., Shah, M., ... Pharoah, P. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer // *J. Clin. Oncol.* -2007.-V. 25, №21. -P. 3015–3023.
- 278 Méplan, C., Dragsted, L. O., Ravn-Haren, G., Tjønneland, A., Vogel, U., & Hesketh, J. Association between Polymorphisms in Glutathione Peroxidase and Selenoprotein P Genes, Glutathione Peroxidase Activity, HRT Use and Breast Cancer Risk // *PLoS One.* -2013.-V. 8, №9. -P. 1 - 9.
- 279 Simmonds M.J. GWAS in autoimmune thyroid disease: Redefining our understanding of pathogenesis // *Nature Reviews Endocrinology.* -2013.-V. 9, №5. -P. 277 - 287.
- 280 Skvortsova L., Baizhigitova D., Khussainova E., Djansugurova L., Bekmanov B. M.A. Polymorphisms in Antioxidant Genes GCLM and GPX-4 and Ischemic Heart Disease Development in Kazakhstan Population // *Clin. Res. Open Access.* -2015. -V. 1, № 1. -P. 1 - 4.
- 281 Kote-Jarai, Z., Durocher, F., Edwards, S. M., Hamoudi, R., Jackson, R. A., Ardern-Jones, A., ... Eeles, R. Association between the GCG polymorphism of the selenium dependent GPX1 gene and the risk of young onset prostate cancer // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* -2002. -V. 5, № 3. -P. 189–192.
- 282 Winter, J. P., Gong, Y. Y., Grant, P. J., & Wild, C. P. Glutathione peroxidase 1 genotype is associated with an increased risk of coronary artery disease // *Coron. Artery Dis.* -2003.-V. 14, №2. -P. 149–153.
- 283 Knight, J. A., Onay, U. V., Wells, S., Li, H., Shi, E. J. Q., Andrulis, I. L., & Ozcelik, H. Genetic Variants of GPX1 and SOD2 and Breast Cancer Risk at the Ontario Site of the Breast Cancer Family Registry // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* -2004.-V. 13, №1. -P. 146–149.
- 284 Shen, Q., Townes, P. L., Padden, C., & Newburger, P. E. An in-frame trinucleotide repeat in the coding region of the human cellular glutathione peroxidase (gpx1) gene: In vivo polymorphism and in vitro instability // *Genomics.* -1994.-V. 23, №1. -P. 292–294.
- 285 Ravn-Haren, G., Olsen, A., Tjønneland, A., Dragsted, L. O., Nexø, B. A., Wallin, H., ... Vogel, U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study // *Carcinogenesis.* -2006.-V. 27, №4. -P. 820–825.
- 286 Hamanishi, T., Furuta, H., Kato, H., Doi, A., Tamai, M., Shimomura, H., ... Nanjo, K. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients // *Diabetes.* -2004.-

- V. 53, №9. -P. 2455–2460.
- 287 Moscow J.A. et al. Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer // *Carcinogenesis*. -1994.-V. 12, №3. -P. 271.
- 288 Hardie, L. J., Briggs, J. A., Davidson, L. A., Allan, J. M., King, R. F. G. J., Williams, G. I., & Wild, C. P. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer // *Carcinogenesis*.-2000.-V. 21, №2. -P. 167–172.
- 289 Hu Y.J., Diamond A.M. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: Loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium // *Cancer Res*. -2003.-V. 63, №12. -P. 3347–3351.
- 290 Hu, Y. J., Dolan, M. E., Bae, R., Yee, H., Roy, M., Glickman, R., ... Diamond, A. M. Allelic loss at the GPx-1 locus in cancer of the head and neck // *Biol. Trace Elem. Res*. -2004.-V. 101, №2. -P. 97–106.
- 291 Goldberg, M., Alberts, D. S., Buckmeier, J. A., Prasad, A. R., Krouse, R. S., & Diamond, A. M. Loss of Heterozygosity at the Glutathione Peroxidase 1 Locus Is Not an Early Event in Colon Carcinogenesis // *Genes and Cancer*. -2011.-V. 2, №9. -P. 910–913.
- 292 Hu, Y., Benya, R. V., Carroll, R. E., & Diamond, A. M. Allelic Loss of the Gene for the GPX1 Selenium-Containing Protein Is a Common Event in Cancer // *J. Nutr*. -2005.-V. 135, №12. -P. 30215 - 30245.
- 293 Mlakar, S. J., Osredkar, J., Prezelj, J., & Marc, J. The antioxidant enzyme GPX1 gene polymorphisms are associated with low BMD and increased bone turnover markers // *Dis. Markers*. -2010.-V. 29, №2. -P. 71–80.
- 294 Ming, X., Johnson, W. G., Stenroos, E. S., Mars, A., Lambert, G. H., & Buyske, S. Genetic variant of glutathione peroxidase 1 in autism // *Brain Dev*. -2010.-V. 32, №2. -P. 105–109.
- 295 Skvortsova L. A., Perfilyeva A. V. , Khussainova E. M. , Mansharipova A. T. , Bekmanov B. O. D.L.B. Association of GCG repeats polymorphism of the GPX1 gene coding selenium dependent antioxidant enzyme with ischemic heart disease development in Kazakhstan population // *Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская*. -2018. -V. 2, № 326. -P. 74–83.
- 296 Vieira, S. M., Monteiro, M. B., Marques, T., Luna, A. M., Fortes, M. A., Nery, M., ... Corrêa-Giannella, M. L. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus // *BMC Med. Genet*. -2011. -V. 12, № 1. -P. 1 - 6.
- 297 Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., ... Do, K. Q. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. -2007. -V. 104, № 42. -P. 16621–16626.
- 298 Oliveira, C. P. M. S., Stefano, J. T., Cavaleiro, A. M., Zanella Fortes, M. A. H., Vieira, S. M., Rodrigues Lima, V. M., ... Corrêa-Giannella, M. L. Association of polymorphisms of glutamate-cystein ligase and microsomal triglyceride transfer protein genes in non-alcoholic fatty liver disease // *J. Gastroenterol*.

- Hepatol. -2010. -V. 25, № 2. -P. 357–361.
- 299 McKone, E. F., Shao, J., Frangolias, D. D., Keener, C. L., Shephard, C. A., Farin, F. M., ... Kavanagh, T. J. Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease // *Am J Respir Crit Care Med.* -2006. -V. 174, № 4. -P. 415–419.
- 300 De Andrade, M., Li, Y., Marks, R. S., Deschamps, C., Scanlon, P. D., Olswold, C. L., ... Yang, P. Genetic variants associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease with and without lung cancer. // *Cancer Prev. Res. (Phila).* -2012. -V. 5, № 3. -P. 365–373.
- 301 Polonikov, A. V., Ivanov, V. P., Solodilova, M. A., Khoroshaya, I. V., Kozhuhov, M. A., & Panfilov, V. I. The relationship between polymorphisms in the glutamate cysteine ligase gene and asthma susceptibility // *Respir. Med.* -2007. -V. 101, № 11. -P. 2422–2424.
- 302 Katakami, N., Sakamoto, K., Kaneto, H., Matsuhisa, M., Shimizu, I., Ishibashi, F., ... Yamasaki, Y. Combined effect of oxidative stress-related gene polymorphisms on atherosclerosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* -2009. -V. 379, № 4. -P. 861–865.
- 303 Kawabata K., Kobayashi T., Fujioka D., Tamaru S., Watanabe Y., Watanabe K., Mishina H., Sano K., Nakamura T., Saito Y., Kitta Y., Obata J., Kugiyama K. Abstract 9208: Association of Polymorphism in Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit Gene with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy // *Circulation.* -2015. -V. 124, № Suppl 21.
- 304 Watanabe, Y., Watanabe, K., Kobayashi, T., Saito, Y., Fujioka, D., Nakamura, T., ... Kugiyama, K. Chronic depletion of glutathione exacerbates ventricular remodelling and dysfunction in the pressure-overloaded heart // *Cardiovasc. Res.* -2013. -V. 97, № 2. -P. 282–292.
- 305 Engström, K. S., Wennberg, M., Strömberg, U., Bergdahl, I. A., Hallmans, G., Jansson, J. H., ... Broberg, K. Evaluation of the impact of genetic polymorphisms in glutathione-related genes on the association between methylmercury or n-3 polyunsaturated long chain fatty acids and risk of myocardial infarction: a case-control study // *Environ. Heal.* -2011. -V. 10, № 1. P. 1 - 8.
- 306 Muehlhause A., Kropf S., Gardemann A. C–588T polymorphism of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is not associated with the risk and extent of ischemic heart disease in a German cohort // *Clin. Chem. Lab. Med.* -2007. -V. 45, № 10. -P. 1416–1418.
307. Mansego, M. L., Solar, G. D. M., Alonso, M. P., Martínez, F., Sáez, G. T., Escudero, J. C. M., ... Chaves, F. J. Polymorphisms of antioxidant enzymes, blood pressure and risk of hypertension // *J. Hypertens.* -2011. -V. 29, № 3.- P. 492–500.
- 308 Bogaards, J. J. P., Verhagen, H., Willems, M. I., Poppel, G. V., & Bladeren, P. J. van. Consumption of brussels sprouts results in elevated α -class glutathione s-transferase levels in human blood plasma // *Carcinogenesis.* -1994.-V. 15, №5. -P. 1073–1075.

- 309 Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Hedayati, M., Hosseinpour-Niazi, S., & Azizi, F. Broccoli sprouts reduce oxidative stress in type 2 diabetes: A randomized double-blind clinical trial // *Eur. J. Clin. Nutr.* -2011.-V. 65, №8. -P. 972–977.
- 310 Esposito, F., Morisco, F., Verde, V., Ritieni, A., Alezio, A., Caporaso, N., & Fogliano, V. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects // *Aliment. Pharmacol. Ther.* -2003.-V. 17, №4. -P. 595–601.
- 311 Scharf G., Prustomersky S., Huber W.W. Elevation of Glutathione Levels by Coffee Components and Its Potential Mechanisms // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* -2011.-V.500. -P. 535–539.
- 312 Levy S., Forman H.J. C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements // *IUBMB Life.* -2010. -V. 62, № 3. -P. 237–246.
- 313 Nichenametla S.N., Lazarus P., Richie J.P. A GAG trinucleotide-repeat polymorphism in the gene for glutathione biosynthetic enzyme, GCLC, affects gene expression through translation. // *FASEB J.* -2011. -V. 25, № 7. -P. 2180–2187.
314. Skvortsova, L., Perfelyeva, A., Khussainova, E., Mansharipova, A., Forman, H. J., & Djansugurova, L. Association of GCLM -588C/T and GCLC -129T/C Promoter Polymorphisms of Genes Coding the Subunits of Glutamate Cysteine Ligase with Ischemic Heart Disease Development in Kazakhstan Population // *Dis. Markers.* -2017. -V. 2017. -P. 1 - 8.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Ассоциация полиморфизма Ala58Thr гена *SOD3* с риском развития ИБС у Казахов

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
SOD3 Ala58Thr	GG	84	62	0,67 (0,45 – 1,00)	0,13
	GA	109	117	1,22 (0,85 – 1,75)	
	AA	44	51	1,25 (0,80 – 1,96)	
Доминантная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG + GA	193	179	0,80 (0,51 – 1,26)	0,33
	AA	44	51	1,25 (0,80 – 1,96)	
Рецессивная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG	84	62	0,67 (0,45 – 1,00)	0,05
	GA + AA	153	168	1,49 (1,00 – 2,21)	

Таблица А2 – Ассоциация полиморфизма Ala58Thr гена *SOD3* с риском развития ИБС у Русских

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
SOD3 Ala58Thr	GG	12	14	0,78 (0,34 – 1,81)	0,24
	GA	36	42	0,68 (0,37 – 1,25)	
	AA	23	46	1,71 (0,91 – 3,22)	
Доминантная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG + GA	48	56	0,58 (0,31 – 1,10)	0,09
	AA	23	46	1,71 (0,91 – 3,22)	
Рецессивная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG	12	14	0,78 (0,34 – 1,81)	0,6
	GA + AA	59	88	1,28 (0,55 – 2,96)	

Таблица А.3 – Ассоциация полиморфизма Ala58Thr гена *SOD3* с риском развития ИБС у Азиатов

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
SOD3 Ala58Thr	GG	5	10	3,11 (0,91 – 10,60)	0,15
	GA	20	14	0,65 (0,23 – 1,80)	
	AA	8	4	0,52 (0,14 – 1,96)	
Доминантная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG + GA	25	24	1,92 (0,51 – 7,22)	0,3
	AA	8	4	0,52 (0,14 – 1,96)	
Рецессивная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG	5	10	3,11 (0,91 – 10,60)	0,06
	GA + AA	28	18	0,32 (0,09 – 1,10)	

Таблица А.4 – Ассоциация полиморфизма Ala58Thr гена *SOD3* с риском развития ИБС у Казахов и Русских

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Мультипликативная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	Аллель <i>G</i>	168	155	0,73 (0,59 – 0,91)	<u>0.005</u>
	Аллель <i>A</i>	140	177	1,37 (1,10 – 1,71)	
Общая модель (df=2)					
SOD3 Ala58Thr	GG	96	76	0,66 (0,46 – 0,93)	0,02
	GA	145	159	1,03 (0,76 – 1,41)	
	AA	67	97	1,48 (1,04 – 2,13)	
Доминантная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG + GA	241	235	0,67 (0,47 – 0,96)	0,03
	AA	67	97	1,48 (1,04 – 2,13)	
Рецессивная модель (df=1)					
SOD3 Ala58Thr	GG	96	76	0,66 (0,46 – 0,93)	0,02
	GA + AA	212	256	1,53 (1,07 – 2,17)	

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Ассоциация полиморфизма Т718С гена *GPX4* с риском развития ИБС у Казахов

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
GPX4 718T/C	ТТ	37	50	0,72 (0,45 – 1,15)	0,2
	ТС	111	118	0,94 (0,65 – 1,35)	
	СС	82	69	1,35 (0,91 – 1,99)	
Доминантная модель (df=1)					
GPX4 718T/C	ТТ + ТС	148	168	0,74 (0,50 – 1,09)	0,13
	СС	82	69	1,35 (0,91 – 1,99)	
Рецессивная модель (df=1)					
GPX4 718T/C	ТТ	37	50	0,72 (0,45 – 1,15)	0,16
	ТС + СС	193	187	1,39 (0,87 – 2,23)	

Таблица Б.2 – Ассоциация полиморфизма Т718С гена *GPX4* с риском развития ИБС у Русских

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Общая модель (df=2)					
GPX4 718T/C	ТТ	15	12	0,85 (0,37 – 1,94)	0,9
	ТС	49	34	1,01 (0,55 – 1,84)	
	СС	38	25	1,09 (0,58 – 2,05)	
Доминантная модель (df=1)					
GPX4 718T/C	ТТ + ТС	64	46	0,92 (0,49 – 1,02)	0,8
	СС	38	25	1,09 (0,58 – 2,05)	
Рецессивная модель (df=1)					
GPX4 718T/C	ТТ	15	12	0,85 (0,37 – 1,94)	0,7
	ТС + СС	87	59	1,18 (0,52 – 2,70)	

Таблица Б.3 – Ассоциация полиморфизма Т718С гена *GPX4* с риском развития ИБС с учетом возраста

Полиморфизм гена	Генотип	Контроль	Опыт	OR (95% CI)	Значение <i>p</i>
Возраст <45					
GPX4 718Т/С общая модель	ТТ	7	19	1,20 (0,44 – 3,29)	0,4
	ТС	6	30	0,51 (0,18 – 1,41)	
	СС	13	32	1,53 (0,63 – 3,62)	
GPX4 718Т/С доминантная модель	ТТ + ТС	13	49	0,65 (0,27 – 1,59)	0,35
	СС	13	32	1,53 (0,63 – 3,72)	
GPX4 718Т/С рецессивная модель	ТТ	7	19	1,20 (0,44 – 3,29)	0,7
	ТС + СС	19	62	0,83 (0,30 – 2,28)	
Возраст >45					
GPX4 718Т/С Мультипликативная модель	<i>T</i> аллель	134	117	0,78 (0,62 – 0,98)	<u>0,03</u>
	<i>C</i> аллель	201	143	<u>1,28</u> (1,02 – 1,62)	
GPX4 718Т/С общая модель	ТТ	49	50	0,72 (0,47 – 1,11)	0,09
	ТС	169	139	0,89 (0,64 – 1,23)	
	СС	117	71	1,43 (1,00 – 2,03)	
GPX4 718Т/С доминантная модель	ТТ + ТС	218	189	0,70 (0,49 – 1,00)	0,05
	СС	117	71	1,43 (1,00 – 2,03)	
GPX4 718Т/С рецессивная модель	ТТ	49	50	0,72 (0,47 – 1,11)	0,1
	ТС + СС	286	210	1,39 (0,9 – 2,14)	

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В.1 – Ассоциация полиморфизма -588С/Т гена *GCLM* (rs17883901) с риском развития ИБС, в комбинации с этнической принадлежностью, возрастом, полом и табакокурением

Группы	Модель наследования	Генотипы	Случай/ Контроль, n	OR (95% CI)	χ^2	Значение p
GCLM -588С/Т						
Национальность						
Казахи	Доминантная	СС+СТ	222/235	0.24 (0.05–1.12)	3.866	0.04
		ТТ	8/2	4.23 (0.89–20.16)		
	Рецессивная	СС	156/180	0.67 (0.44–1.00)	3.816	0.05
		СТ+ТТ	74/57	1.50 (1.00–2.25)		
Русские	Доминантная	СС+СТ	98/69	0.71 (0.13–3.99)	0.153	0.7
		ТТ	4/2	1.41 (0.74–2.70)		
	Рецессивная	СС	60/48	0.68 (0.36–1.29)	1.376	0.24
		СТ+ТТ	42/23	1.46 (0.77–2.76)		
Возраст						
<45	Общая	СС	21/67	1.10 (0.33–3.70)	0.986	0.6
		СТ	3/13	0.71 (0.19–2.74)		
		ТТ	1/1	3.33(0.20–55.32)		
>45	Общая	СС	208/183	0.69 (0.49–0.97)	6.097	0.04
		СТ	116/74	1.33 (0.94–1.89)		
		ТТ	11/3	2.91 (0.80–10.53)		
Пол						
Мужчины	Общая	СС	62/77	0.92 (0.5–1.69)	0.463	0.793
		СТ	25/30	1.01 (0.54–1.89)		
		ТТ	3/2	1.84(0.30–11.29)		
Женщины	Общая	СС	167/173	0.55 (0.38–0.81)	10.81 2	0.004
		СТ	94/57	1.64 (1.11–2.42)		
		ТТ	9/2	3.97 (0.85–18.54)		
Табакокурение						
Да	Рецессивная	СС	26/45	0.50 (0.20–1.23)	2.331	0.1
		СТ+ТТ	14/12	2.02 (0.81–5.02)		
Нет	Общая	СС	203/205	0.67 (0.47–0.94)	5.758	0.05
		СТ	108/75	1.42 (1.00–2.02)		
		ТТ	9/4	2.03 (0.62–6.65)		

Таблица В.2 – Ассоциация полиморфизма -129 С/Т гена *GCLC* (rs41303970) с риском развития ИБС, в комбинации с этнической принадлежностью, возрастом, полом и табакокурением

Группы	Модель наследования	Генотипы	Случай/ Контроль, n	OR (95% CI)	χ^2	Значение p
GCLC -129 С/Т						
Национальность						
Казахи	Доминантная	СС+СТ	221/235	0.21 (0.04–0.98)	4.781	0.03
		ТТ	9/2	4.79 (1.02–22.39)		
	Рецессивная	СС	168/191	0.65 (0.42 – 1.01)	3.740	0.05
		СТ+ТТ	62/46	1.53 (0.99 – 2.37)		
Русские	Dominant	СС+СТ	101/70	1.44 (0.09–23.46)	0.067	0.8
		ТТ	1/1	0.69 (0.04–11.27)		
	Recessive	СС	66/49	0.82 (0.43–1.57)	0.349	0.6
		СТ+ТТ	36/22	1.21 (0.64–2.32)		
Возраст						
<45	Общая	СС	19/70	0.50 (0.16–1.52)	1.548	0.5
		СТ	5/9	2.00 (0.60–6.64)		
		ТТ	1/2	1.65 (0.14–8.95)		
>45	Общая	СС	238/198	0.77 (0.53–1.11)	5.597	0.06
		СТ	88/61	1.16 (0.80–1.69)		
		ТТ	9/1	7.15 (0.90–6.80)		
Пол						
Мужчины	Рецессивная	СС	62/77	0.91 (0.48–1.71)	0.093	0.76
		СТ+ТТ	28/32	1.10 (0.58–2.09)		
Женщины	Общая	СС	191/186	0.60 (0.39–0.91)	6.376	0.04
		СТ	71/43	1.57 (1.02–2.41)		
		ТТ	8/3	2.33 (0.61–8.89)		
Табакокурение						
Да	Рецессивная	СС	28/45	0.62 (0.25–1.58)	1.011	0.3
		СТ+ТТ	12/12	1.61 (0.63–4.07)		
Нет	Общая	СС	229/223	0.69 (0.47–1.00)	6.748	0.03
		СТ	81/59	1.29 (0.88–1.89)		
		ТТ	10/2	4.55 (0.99–0.94)		

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Анкета

Код образца 072
003-118

I. Идентификационные сведения

1. Фамилия Кешаев

2. Имя, отчество Курбанов Валиевич

3. Адрес Орлов 4-37-35

4. Дата рождения 21.03.1986

5. Пол Муж Жен

6. Национальность Казах Русс. Другое (указать)

7. Места проживания (указать время) Орлов с 1980 г. по ___ г.
с 19___ г. по ___ г.
с 19___ г. по ___ г.

8. Тип жилища 1. Кирпич 2. Железобетон 3. Дерево 4. Саман

II. История семьи

8. Имена и даты рождения членов семьи

Жена / Муж +

Мать 3 детей

Отец _____

Дети _____

9. Являются ли Ваши мать и отец близкими родственниками? Да Нет

III. Профессия и образ жизни

10. Профессия юрис

11. Получали ли Вы радиационное облучение в медицинских целях или в результате профессионального вреда? (укажите вид и время) нет

Дата последнего диагностического рентгена 11.2013

12. Вы курите? Нет

Да Как давно? с _____ г. Сколько сигарет в день? _____

Бросил(а) Сколько лет не курите? _____ лет

13. Употребляете алкоголь? Нет Да Сколько лет? _____ лет

Какие напитки предпочитаете? кофе

14. Принимаете ли Вы наркотические средства? Нет , да ? _____

15. Какой диеты придерживаетесь? (нужное подчеркнуть)

Мясо: каждый день, раз в 3 дня, раз в неделю, не ем

Фрукты: каждый день, раз в 3 дня, раз в неделю, не ем

Овощи: каждый день, раз в 3 дня, раз в неделю, не ем

Рыба или птица: каждый день, раз в 3 дня, раз в неделю, не ем

III Медицинские данные

15. Болеете ли Вы следующими заболеваниями?

- | | | |
|----|---|---------------------------|
| 1. | Рак (указать вид) _____ | Дата диагноза _____ |
| 2. | Туберкулез _____ | Дата диагноза _____ |
| 3. | Гипотиреоз <u>с 1992</u> | Дата диагноза _____ |
| 4. | Астматический бронхит <u>с 1984</u> | Дата диагноза _____ |
| 5. | Сердечно-сосудистые заболевания (указать вид) _____ | Дата диагноза _____ |
| 6. | Другие (указать вид) <u>Шизофрения</u> | Дата диагноза <u>1981</u> |

16. Знаете ли Вы о врожденных дефектах или других генетических заболеваниях ваших родственников?

Нет Да , какие? _____

17. Укажите заболевания Ваших близких родственников?

Отец AS

Мать AS

Муж/Жена 2

Сыновья 2

Дочери _____

Для женщины:

18. Сколько беременностей было? 10

Сколько детей? 3

Сколько аборт? 7

Сколько спонтанных выкидышей? _____

Сколько мертворождений? _____

19. Дата заполнения анкеты и взятия образца крови 01.11.13