

Толщина комплекса интима–медиа сонных артерий у пациентов с артериальной гипертензией среди населения Горной Шории: связь с генетическими факторами

Т. А. Мулерова^{1,2}, А. В. Понасенко¹, Е. В. Индукаева¹, В. Н. Максимов³, М. И. Воевода³, М. Ю. Огарков^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово

² НГИУВ – филиал ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новокузнецк

³ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Абстракт

Цель исследования: установить ассоциации полиморфизмов генов-кандидатов ACE, AGT, AGTR1, ADRB1, ADRA2B, MTHFR и NOS3 с увеличенной толщиной комплекса интима-медиа (ТКИМ) у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) среди коренного (шорцев) и некоренного населения Горной Шории.

Материал и методы. Проведено клинико-эпидемиологическое исследование компактно проживающего населения в труднодоступных районах Горной Шории. Данный регион среднегорья расположен на юге Западной Сибири. Обследовано 830 человек [494 человека – представители коренной национальности (шорцы), 336 человек – представители некоренной национальности (90% из них европеоиды)]. Диагноз «АГ» выставлялся в соответствии с рекомендациями ВНОК/РМОАГ (2010 г.). Оценка толщины комплекса интима-медиа сонных артерий пациентам с АГ проводилась методом ультразвукового дуплексного сканирования на аппарате Medison Sonoace PICO (235 человек среди шорцев и 178 человек среди некоренных жителей). Полиморфизмы генов ACE (I/D, rs 4340), AGT (с.803T>C, rs699), AGTR1 (A1166C, rs5186), ADRB1 (с.145A>G, Ser49Gly, rs1801252), ADRA2B (I/D, rs 28365031), MTHFR (с.677C>T, Ala222Val, rs1801133) и NOS3 (VNTR, 4b/4a) тестировали с помощью ПЦР.

Результаты. Частота увеличенной ТКИМ у пациентов с АГ оказалась выше в коренной этнической группе (78,3%) по сравнению с некоренной (69,7%, $p = 0,046$). При корреляционном анализе была выявлена прямая взаимосвязь между уровнями систолического и диастолического артериального давления и ТКИМ ($r = 0,4$, $p = 0,0001$ и $r = 0,3$, $p = 0,0001$ среди шорцев; $r = 0,3$, $p = 0,0001$ и $r = 0,2$, $p = 0,0001$ среди некоренного населения соответственно). В группе обследованных с АГ и атеросклерозом сонных артерий частота гомозиготного генотипа I/I гена ACE в когорте шорцев оказалась выше, гетерозиготного генотипа I/D, напротив, ниже, чем в когорте некоренных представителей. В группе лиц с указанной патологией процент носителей прогностически благоприятного генотипа I/I гена ADRA2B среди шорцев был меньше, чем среди лиц некоренного этноса. Аналогичная закономерность выявлена и в отношении распространенности мутантных генотипов T/T гена MTHFR и 4a/4a гена NOS3.

Заключение. Установлена в когорте шорцев ассоциация с атеросклерозом сонных артерий генотипа T/C гена AGT и генотипа C/T гена MTHFR по сверхдоминантному типу наследования. Рискový эффект генотипа C/T гена MTHFR увеличивался у лиц возрастной группы 18–64 лет, женского пола и имеющих дислипидемию. Протективное действие выявлено для гена ADRB1 по лог-аддитивному типу наследования. В когорте некоренного этноса с атеросклерозом сонных артерий ассоциировался ген AGT по лог-аддитивному типу наследования. Протективное действие установлено для генотипа I/D гена ADRA2B по сверхдоминантному типу наследования.

Ключевые слова: толщина комплекса интима-медиа, ассоциации генов-кандидатов, этнос.

Carotid intima-media thickness in patients with arterial hypertension among the population of Gornaya Shoriya: relationship with genetic factors

T. A. Mulerova^{1,2}, A. V. Ponasenko¹, E. V. Indukaeva¹, V. N. Maksimov³, M. I. Voevoda³, M. Y. Ogarkov^{1,2}

¹ Federal State Budgetary of Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

² State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education "Novokuznetsk state Institute of Postgraduate Medicine" of health Ministry of Russian, Novokuznetsk, Russia

³ "Research Institute of Internal and Preventive Medicine" – Branch of the Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Novosibirsk, Russia

Abstract

Purpose. We aimed to identify the associations of polymorphisms of *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *MTHFR* and *NOS3* candidate genes with the increased carotid intima-media thickness (CIMT) in patients with arterial hypertension (AH) among indigenous (the Shors) and non-indigenous population of Gornaya Shoriya.

Material and methods. We performed a clinical and epidemiological study of the compactly settled population in the remote areas of Gornaya Shoria. This region of middle mountains is situated in the south of Western Siberia. We examined 830 subjects [494 subjects – the representatives of indigenous nationality (the Shors), 336 subjects – representatives of non-indigenous nationality (90% among them were the representatives of the European ethnicity)]. AH was diagnosed according to the National Guidelines of the Russian Society of Cardiology/the Russian Medical Society on Arterial Hypertension (2010). The thickness of carotid intima-media in patients with AH was evaluated using ultrasound duplex scanning at Medison Sonoace PICO apparatus (235 subjects among the Shors and 178 subjects among the non-indigenous inhabitants). Polymorphisms of genes *ACE* (I/D, rs 4340), *AGT* (c.803T>C, rs699), *AGTR1* (A1166C, rs5186), *ADRB1* (c.145A>G, Ser49Gly, rs1801252), *ADRA2B* (I/D, rs 28365031), *MTHFR* (c.677C>T, Ala222Val, rs1801133) and *NOS3* (VNTR, 4b/4a) were tested using PCR.

Results. The frequency of the increased CIMT in patients with AH was higher in the indigenous ethnic group (78.3%) as compared with the non-indigenous group (69.7%, $p = 0.046$). A correlation analysis revealed a direct correlation between the levels of systolic and diastolic blood pressure and CIMT ($r = 0.4$, $p = 0.0001$ and $r = 0.3$, $p = 0.0001$ among the Shors; $r = 0.3$, $p = 0.0001$ and $r = 0.2$, $p = 0.0001$ among the non-indigenous population, respectively). In the group of the examined subjects with AH and carotid atherosclerosis the frequency of homozygous I/I genotype of *ACE* gene in the cohort of the Shors was higher, and the frequency of heterozygous I/D genotype, on the contrary, was lower than in the cohort of non-indigenous representatives. In the group of subjects with the indicated pathology the percentage of the carriers of the prognostically favourable I/I genotype of *ADRA2B* gene among the Shors was lower than among the subjects of non-indigenous ethnoses. The similar pattern was also revealed regarding to the prevalence of mutant T/T genotypes of *MTHFR* gene and 4a/4a of *NOS3* gene.

Conclusion. The association of T/C genotype of *AGT* gene and C/T genotype of *MTHFR* gene in a superdominant mode of inheritance with carotid atherosclerosis was established in the cohort of the Shors. The risk effect of C/T genotype of *MTHFR* gene was increasing in female subjects aged 18–64 years and having dyslipidemia. The protective effect was revealed for *ADRB1* gene in log-addictive mode of inheritance. In the cohort of non-indigenous ethnoses *AGT* gene in log-addictive mode of inheritance was associated with carotid atherosclerosis. The protective effect was established for I/D genotype of *ADRA2B* gene in a superdominant mode of inheritance.

Keywords: carotid intima-media thickness, associations of candidate genes, ethnoses.

Введение

В последние годы при изучении артериальной гипертензии (АГ) все больше внимания уделяется поражению органов-мишеней, изменения в которых определяющим образом влияют на прогноз заболевания. Ключевым показателем развития

атеросклеротического процесса и ремоделирования сосудов у больных АГ являются изменения интимо-медиальной оболочки сонных артерий [1–4].

Прогностическое значение увеличения толщины комплекса интима-медиа (ТКИМ) каротидных артерий доказано в популяционных исследованиях в США [5, 6] и Европе [7]. В многочисленных

крупных проспективных исследованиях, таких как Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) [8], Second Manifestations of ARterial disease (SMART) [9], Longevity and Aging in Hokkaido County (LILAC) [10], увеличение ТКИМ являлось независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний.

АГ также ассоциирована с повышением ТКИМ сонных артерий. Эта взаимосвязь подтверждается практически всеми работами по оценке детерминант атеросклероза каротидных артерий у мужчин и женщин различной расовой принадлежности в широком возрастном диапазоне [11–13].

Генетические факторы занимают особое место в процессах ремоделирования сосудистой стенки, так как их влияние может реализовываться при участии как гемодинамических, так и нейрогуморальных механизмов. С позиций генетики данная патология характеризуется клинико-генеалогической неоднородностью, мультифакториальностью проявлений и наследования. Вместе с тем использование генетических методов, направленных на выявление и оценку генетического риска, прогнозирование осложнений заболевания является перспективным для дальнейшего изучения влияния полиморфизма генов-кандидатов на прогрессирование АГ.

Несмотря на активный интерес к проблеме сосудистого ремоделирования в настоящее время имеется ограниченное количество данных о связи атеросклероза сонных артерий у пациентов с АГ в зависимости от этнической принадлежности, что указывает на необходимость учета популяционных особенностей при изучении роли полиморфизмов генов в развитии мультифакториальной болезни и ее осложнений. Именно поэтому на когортах малочисленных коренных народов с их характерным укладом жизни перспективно изучать роль генетической регуляции заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Цель исследования: установить ассоциации полиморфизмов генов-кандидатов *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *MTHFR* и *NOS3* с увеличенной ТКИМ у пациентов с АГ среди коренного (шорцев) и некоренного населения Горной Шории.

Материал и методы исследования

Проведено клинико-эпидемиологическое исследование компактно проживающего населения труднодоступных районов Горной Шории (п. Ортон, п. Усть-Кабырза) и поселка городского типа (п. Шерегеш). Данные регионы среднегорья расположены на юге Западной Сибири. Шорцы относятся к малочисленным народам южносибирского типа монголоидной расы.

В местах компактного проживания малочисленного народа обследовано 830 человек [494 человека – представители коренной национальности (шорцы), 336 человек – представители некоренной национальности (90% из них европеоиды)].

Выборка состояла из взрослого населения, включая лиц 18 лет и старше, из них 33,5% – мужчины, 66,5% – женщины. Средний возраст мужчин составил 48 ± 1 год у шорцев и 47 ± 1 год у некоренных жителей ($p=0,595$); женщин – 49 ± 1 год и 51 ± 1 год ($p=0,054$) соответственно. Протокол исследования одобрен комитетом по этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово (протокол № 10 от 10.06.2015). Перед включением в исследование все пациенты подписывали информированное согласие на добровольное участие в исследовании.

Осмотры специалистов (кардиолога, эндокринолога и терапевта) проходили в условиях экспедиции на базе сельских фельдшерско-акушерских пунктов. Измерение артериального давления (АД) проводилось по методике ВОЗ/РМОАГ (2010 г.). Диагноз «АГ» выставлялся в соответствии с рекомендациями ВНОК/РМОАГ (2010 г.): систолическое АД больше или равно 140 мм рт. ст., диастолическое АД больше или равно 90 мм рт. ст. Кроме этого, диагноз «АГ» устанавливался независимо от уровня АД на фоне приема антигипертензивных препаратов. Антропометрическое исследование включало измерение роста, веса, окружности талии. Рассчитывали индекс Кетле (ИК). Согласно классификации ВОЗ (1997 г.), ожирение определяли при ИК $30,0 \text{ кг/м}^2$ и более. Критериями абдоминального ожирения считали окружность талии (ОТ) выше 94 см у мужчин и выше 80 см у женщин. Курящими считали лиц, выкуривающих хотя бы одну сигарету (папиросу) в день.

Кровь для биохимических исследований брали из кубитальной вены утром натощак; ее центрифугировали, сыворотку замораживали и хранили при отрицательной температуре. В лабораторию материал доставляли в контейнерах с жидким азотом, не допуская размораживания. Содержание общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛВП), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП) в сыворотке крови оценивали с помощью стандартных тест-систем фирмы Thermo Fisher Scientific (Финляндия). О наличии гиперхолестеринемии свидетельствовал уровень $\text{ОХС} > 4,9 \text{ ммоль/л}$, гипербетакхолестеринемии уровень – $\text{ХС-ЛНП} > 3,0 \text{ ммоль/л}$. Сниженным считался уровень $\text{ХС-ЛВП} < 1,2 \text{ ммоль/л}$ у женщин, $< 1,0 \text{ ммоль/л}$ у мужчин. Повышенным считался уровень $\text{ТГ} > 1,7 \text{ ммоль/л}$.

Исследование ТКИМ сонных артерий проводилось методом ультразвукового дуплексного сканирования на аппарате Medison Sonoace PICO. Согласно рекомендациям РМОАГ (2013 г.), утолщением интимо-медиальной стенки каротидных артерий считали ТКИМ $\geq 0,9$ и/или наличие бляшки.

Для молекулярно-генетического тестирования у обследуемых кровь из кубитальной вены собирали в вакуумные пробирки (Vacuette, Австрия) с стандартизованным содержанием антикоагулянта К3ЕДТА



(1,2–2,0 мг на 1 мл крови) утром натощак. Для обеспечения полного перемешивания реагента и крови сразу же после наполнения пробирки ее аккуратно переворачивали 8–10 раз. Выделение ДНК из крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции [14]. Полиморфизмы генов *ACE* (I/D, rs 4340), *ADRB1* (c.145A>G, Ser49Gly, rs1801252), *ADRA2B* (I/D, rs 28365031), *MTHFR* (c.677C>T, Ala222Val, rs1801133) и *NOS3* (VNTR, 4b/4a) тестировали с помощью ПЦР по следующим методикам, описанным Snapir A. с соавт. (2003), Lima J.J. с соавт. (2007) и Salimi S. с соавт. (2006) [15–17]. Полиморфизмы генов *AGT* (c.803T>C, rs699) и *AGTR1* (A1166C, rs5186) тестировали с помощью аллель-специфичной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (RT-PCR). Генотипирование методом RT-PCR осуществляли с зондами в 96-луночном формате по технологии TaqMan по протоколу производителя (Applied Biosystems, США) на амплификаторе RT-PCR ViiA7 (Applied Biosystems, США). Для контроля качества 10% случайно выбранных образцов были подвергнуты повторному генотипированию. Лабораторный персонал не имел данных о персонификации образцов.

Статистическая обработка проводилась с помощью программ STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США) и SNPStats. Для описания количественных показателей использовано среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Равенство дисперсий в сравниваемых группах оценивалось критерием Левина. При фактическом распределении, близком к нормальному, и при равенстве дисперсий в сравниваемых группах использовались параметрические критерии сравнения количественных показателей, при несоблюдении данных условий – непараметрические аналоги. Сравнение двух групп проводилось t-критерием Стьюдента для несвязанных выборок (параметрический) и критерием Манна – Уитни (непараметрический). Для характеристики качественных признаков рассчитывали удельный вес вариантов. При оценке статистической значимости различий качественных показателей строились таблицы сопряженности с последующим расчетом критерия χ^2 Пирсона, при доле ожидаемых чисел в таблицах менее пяти использовался критерий Фишера. Для оценки риска вычислялись отношение шансов (ОШ) и 95%-ные доверительные интервалы (ДИ) в пяти моделях наследования (кодминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Различия признавались статистически значимыми при вероятности отклонить нулевую гипотезу (p) менее 0,05.

Результаты

Основные показатели, характеризующие когорты пациентов с АГ в обеих этнических группах, представлены в табл. 1.

В результате проведенного эпидемиологического исследования в Горной Шории выявлено,

что у больных с повышенным уровнем АД атеросклеротические изменения сонных артерий чаще встречались среди коренного населения (78,3%) по сравнению с некоренным (69,7%, $p=0,046$).

Однако средние показатели ТКИМ у пациентов с АГ не различались и составили $1,08 \pm 0,25$ см у шорцев и $1,07 \pm 0,27$ см у некоренных жителей ($p=0,566$). Подтверждением значимых атеросклеротических изменений каротидных артерий при повышенном уровне АД в обеих этнических группах послужила достоверно большая ТКИМ у больных с АГ ($1,08 \pm 0,25$ см у шорцев и $1,07 \pm 0,27$ см у некоренных жителей) по сравнению с обследованными без АГ ($0,89 \pm 0,19$ см ($p=0,0001$) и $0,87 \pm 0,23$ см ($p=0,0001$) соответственно). Установлены статистически значимые различия между сравниваемыми группами и по частоте обследованных с утолщением ТКИМ, которая была обнаружена как среди шорцев: 78,3% у пациентов с АГ против 43,2% лиц с нормальным уровнем АД ($p=0,0001$), так и среди некоренных представителей – у 69,3% против 36,1% ($p=0,0001$) соответственно. При корреляционном анализе была выявлена прямая взаимосвязь между уровнями систолического и диастолического АД и ТКИМ ($r=0,4$, $p=0,0001$ и $r=0,3$, $p=0,0001$ среди шорцев; $r=0,3$, $p=0,0001$ и $r=0,2$, $p=0,0001$ среди некоренного населения соответственно).

Установлены особенности распределения частот встречаемости аллелей генов *ACE*, *ADRA2B*, *MTHFR* и *NOS3* среди пациентов с АГ и утолщением ТКИМ в зависимости от этнической принадлежности обследуемого (табл. 2). В группе обследованных с указанной патологией частота гомозиготного генотипа I/I гена *ACE* в когорте шорцев оказалась выше, гетерозиготного генотипа I/D, напротив, ниже, чем в когорте некоренных представителей. В группе лиц с АГ и атеросклерозом каротидных артерий процент носителей прогностически благоприятного генотипа I/I гена *ADRA2B* среди шорцев был меньше, чем среди лиц некоренного этноса. Аналогичная закономерность выявлена и в отношении распространенности мутантных генотипов T/T гена *MTHFR* и 4a/4a гена *NOS3*.

В табл. 2 представлены данные об ассоциации генов-кандидатов АГ *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *MTHFR* и *NOS3* с утолщением ТКИМ среди больных АГ.

В когорте шорцев с увеличенной ТКИМ ассоциировался гетерозиготный генотип T/C гена *AGT*. Среди пациентов с АГ и данным поражением органов-мишеней преобладал генотип T/C в локусе rs699 по сравнению с больными АГ, имеющими нормальную величину ТКИМ: 53,2% против 26,3% (ОШ 3,17; 95% ДИ 1,06–9,50; $p=0,028$). Частота гомозиготного генотипа T/T в первой группе была установлена в 20,8% случаев, во второй – в 31,6% случаев (ОШ 0,57; 95% ДИ (0,19–1,69), $p=0,306$), частота генотипа C/C – в 26,0% и 42,1% случаев (ОШ 0,48; 95% ДИ (0,17–1,34),

Таблица 1. Характеристика пациентов с артериальной гипертонией среди населения Горной Шории с учетом этнических особенностей

Показатель	Некоренное население (n = 178)	Коренное население (n = 235)	P
Возраст, лет, M ± SD	57 ± 11	58 ± 13	0,388
Рост, см, M ± SD	162,1 ± 9,6	154,7 ± 7,3	0,0001
Вес, кг, M ± SD	80,9 ± 18,0	63,7 ± 14,0	0,0001
Курение, n (%)	47 (26,4%)	74 (31,5%)	0,261
ИМТ, кг/м ² , M ± SD	30,8 ± 6,3	26,6 ± 5,7	0,0001
ИМТ ≥ 30 кг/м ² , n (%)	95 (53,4%)	58 (24,7%)	0,0001
ОТ, см, M ± SD	97,1 ± 13,2	87,4 ± 12,7	0,0001
ОТ ≥ 80 см у жен. и ≥ 94 см у муж., n (%)	130 (73,0%)	119 (50,6%)	0,0001
САД, мм рт. ст., M ± SD	149 ± 20	157 ± 19	0,0001
ДАД, мм рт. ст., M ± SD	90 ± 13	92 ± 11	0,038
ОХС, ммоль/л, M ± SD	5,91 ± 1,39	5,72 ± 1,20	0,148
ОХС > 5,0 ммоль/л, n (%)	131 (79,4%)	161 (74,2%)	0,235
ХС-ЛНП, ммоль/л, M ± SD	3,42 ± 0,97	3,40 ± 1,07	0,902
ХС-ЛНП > 3,0 ммоль/л, n (%)	93 (68,4%)	100 (58,5%)	0,074
ХС-ЛВП, ммоль/л, M ± SD	1,21 ± 0,38	1,47 ± 0,45	0,0001
ХС-ЛВП < 1,2 ммоль/л у жен., < 1,0 ммоль/л у муж., n (%)	61 (45,2%)	32 (18,9%)	0,0001
ТГ, ммоль/л, M ± SD	2,33 ± 1,60	1,55 ± 1,25	0,0001
ТГ > 1,7 ммоль/л, n (%)	103 (62,1%)	51 (23,5%)	0,0001

Примечания: ИМТ – индекс массы тела, ОТ – окружность талии, САД – систолическое АД, ДАД – диастолическое АД, ОХС – общий холестерин, ХС-ЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, ХС-ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ТГ – триглицериды.

p = 0,157) соответственно.

Распространенность гомозиготного генотипа А/А гена *ADRB1* у шорцев с АГ и атеросклерозом сонных артерий составила 65,7%, у обследованных с АГ и неувеличенной ТКИМ – 41,7% (p = 0,011). Отношение шансов выявить данное поражение органов-мишеней среди носителей минорного аллеля А в гомозиготном состоянии выше почти в 3 раза по сравнению с носителями генотипов А/Г и Г/Г (ОШ 2,69; 95% ДИ (1,24–5,82), p = 0,011). Частота гетерозиготного генотипа А/Г среди пациентов с АГ и утолщенной ТКИМ была установлена в 30,6% случаев, среди обследованных с повышенным уровнем АД без данной патологии – в 47,2% случаев (ОШ 0,49; 95% ДИ (0,23–1,06), p = 0,069), частота генотипа Г/Г – в 3,7% и 11,1% случаев (ОШ 0,31; 95% ДИ (0,07–1,30), p = 0,108) соответственно.

Среди больных коренной национальности с АГ и увеличенной ТКИМ преобладал генотип С/Т в локусе rs1801133 гена *MTHFR* по сравнению с лицами, имеющими указанное заболевание, но

нормальную величину ТКИМ: 38,0% против 5,4% (ОШ 10,71; 95% ДИ (2,45–46,90), p = 0,0001). Тогда как среди носителей гомозиготного генотипа С/С выявлено снижение риска развития атеросклероза каротидных артерий: 59,3% против 91,9% (ОШ 0,13; 95% ДИ (0,04–0,44), p = 0,0003). Распространенность минорного генотипа Т/Т у обследованных с утолщенной ТКИМ оказалась равной 2,7% и в контроле – 2,7% (ОШ 1,03; (0,10–10,20), p = 0,731).

В когорте шорцев доля обследованных с гетерозиготным генотипом 4b/4a гена *NOS3* у пациентов с АГ и указанным поражением органов-мишеней была выше по сравнению с лицами без него и составила 29,9% против 13,9% (ОШ 2,65; 95% ДИ (0,94–7,42), p = 0,043). При этом гомозиготный генотип 4b/4b оказался протективным в отношении утолщения ТКИМ: его частота в первой группе оказалась равной 67,3%, во второй – 86,1% (ОШ 0,33; 95% ДИ (0,12–0,93), p = 0,030). Распространенность минорного генотипа 4a/4a

Таблица 2. Ассоциации генов-кандидатов *AG ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *MTHFR* и *NOS3* с ТКИМ среди больных артериальной гипертензией в обеих этнических группах Горной Шории

Генотипы	Некоренные жители (n = 178)				Коренные жители (n = 235)				P (некор. vs кор.)
	Частота генотипов (%)	P	ОШ	95% ДИ	Частота генотипов (%)	P	ОШ	95% ДИ	
Ген ACE									
I/I	21,4	0,264	0,55	0,19–1,59	42,6	0,612	1,22	0,57–2,62	0,004
I/D	58,6	0,785	0,87	0,32–2,37	38,9	0,185	0,60	0,28–1,28	0,010
D/D	20,0	0,087	5,00	0,62–40,5	18,5	0,205	1,88	0,60–5,90	0,806
Ген AGTR1									
T/T	50,0	0,546	1,25	0,26–5,94	63,5	0,195	0,46	0,14–1,51	0,240
T/C	31,8	0,204	0,37	0,08–1,83	31,3	0,138	2,42	0,66–8,95	0,959
C/C	18,2	0,232	-	-	5,2	0,671	0,99	0,11–8,98	0,061
Ген AGT									
A/A	27,3	0,140	0,30	0,06–1,51	20,8	0,306	0,57	0,19–1,69	0,511
A/C	40,9	0,583	0,87	0,18–4,14	53,2	0,028	3,17	1,06–9,50	0,301
C/C	31,8	0,065	-	-	26,0	0,157	0,48	0,17–1,34	0,583
Ген ADRB1									
A/A	75,4	0,379	1,67	0,53–5,30	65,7	0,011	2,69	1,24–5,82	0,191
A/G	23,0	0,303	0,55	0,17–1,74	30,6	0,069	0,49	0,23–1,06	0,289
G/G	1,6	0,782	-	-	3,7	0,108	0,31	0,07–1,30	0,405
Ген ADRA2B									
I/I	46,9	0,393	1,62	0,53–4,91	30,2	0,724	0,86	0,39–1,94	0,029
I/D	29,7	0,073	0,38	0,13–1,12	43,4	0,329	0,69	0,32–1,46	0,075
D/D	23,4	0,244	2,30	0,47–11,2	26,4	0,092	2,23	0,79–6,29	0,665
Ген MTHFR									
C/C	57,1	0,315	0,56	0,17–1,77	59,3	0,001	0,13	0,04–0,44	0,786
C/T	30,2	0,241	2,02	0,52–7,84	38,0	0,001	10,7	2,45–46,9	0,302
T/T	12,7	0,642	1,09	0,21–5,69	2,7	0,731	1,03	0,10–10,2	0,014
Ген NOS3									
4b/4b	63,1	0,682	1,24	0,44–3,52	67,2	0,030	0,33	0,12–0,93	0,573
4b/4a	26,2	0,641	0,77	0,25–2,34	29,9	0,043	2,65	0,94–7,42	0,597
4a/4a	10,8	0,671	1,03	0,19–5,41	2,8	0,416	-	-	0,036

составила 2,8% и 0,0% ($p = 0,416$) соответственно.

В когорте некоренного этноса ассоциаций между изучаемыми генами-кандидатами АГ и атеросклерозом сонных артерий установлено не было.

При введении в статистический анализ поправок на пол, возраст и наличие дислипидемии (ДЛП) у пациентов с АГ обеих этнических групп установлены следующие взаимосвязи с атеросклерозом сонных артерий в зависимости от типов наследования. Так, в когорте шорцев, независимо от перечисленных факторов риска, генотип Т/С гена *AGT* ассоциировался с высоким риском увеличения ТКИМ (ОШ 3,28; 95% ДИ (1,01–10,70), $p = 0,037$) по сверхдоминантному типу наследования. Для гена *ADRB1* установлено протективное влияние в отношении увеличения ТКИМ у больных с АГ по лог-аддитивному типу наследования (ОШ 0,43; 95% ДИ (0,22–0,85), $p = 0,014$). При этом шанс развития атеросклероза сонных артерий уменьшался у лиц моложе 64 лет среди носителей гетерозиготного генотипа А/Г (ОШ 0,38; 95% ДИ (0,15–0,97), $p = 0,043$); у некурящих и обследованных с нарушениями липидного обмена – среди носителей гомозиготного генотипа Г/Г (ОШ 0,02;

95% ДИ (0,00–0,39), $p = 0,028$) и (ОШ 0,10; 95% ДИ (0,02–0,67), $p = 0,040$) соответственно. Независимо от пола, возраста и наличия ДЛП генотип С/Т гена *MTHFR* ассоциировался с высоким риском развития атеросклероза каротидных артерий (ОШ 10,06; 95% ДИ (2,18–46,39), $p = 0,002$) по сверхдоминантному типу наследования. При этом рискованный эффект гетерозиготного носительства С/Т был связан с половой принадлежностью и почти в 6 раз выше у лиц женского пола (ОШ 5,75; 95% ДИ (1,18–28,11), $p = 0,015$); с возрастной принадлежностью и почти в 10 раз выше у лиц возрастной группы 18–64 лет (ОШ 9,69; 95% ДИ (2,08–45,07), $p = 0,004$); с наличием у обследованных нарушений липидного обмена и в 14 раз выше у лиц с ДЛП (ОШ 14,05; 95% ДИ (1,75–112,29), $p = 0,014$). Кроме этого, отношение шансов данного поражения органов-мишеней у носителей генотипа С/Т гена *MTHFR* повышалось как у некурящих лиц (ОШ 8,75; 95% ДИ (1,03–74,25), $p = 0,040$), так и у курящих (ОШ 12,96; 95% ДИ (1,45–115,76), $p = 0,011$).

В коренной этнической группе совместное наследование аллелей 4b гена *NOS3*, D гена *ADRA2B* и С гена *MTHFR* (гаплотип 4bDC), встречающееся в вы-

борке у 37% обследованных, увеличивало шанс развития утолщения ТКИМ у больных с АГ в 2 раза (ОШ 2,37; 95% ДИ (1,11–5,03), $p=0,027$), у лиц женского пола и пациентов с ДЛП – в 3 раза (ОШ 3,03; 95% ДИ (1,18–7,79), $p=0,0001$) и (ОШ 3,15; 95% ДИ (1,25–7,90), $p=0,0001$) соответственно. Гаплотип DCI (совместное наследование аллелей D гена *ADRA2B*, C гена *MTHFR* и I гена *ACE*), встречающийся в выборке у 25% обследованных, повышал риск формирования атеросклероза сонных артерий у пациентов с повышенным уровнем АД в 3 раза (ОШ 3,23; 95% ДИ (1,12–9,28), $p=0,031$), при этом у женщин – в 6 раз (ОШ 6,21; 95% ДИ (1,34–28,68), $p=0,0001$). В старшей возрастной группе среди больных с АГ сочетание аллелей 4b гена *NOS3*, D гена *ADRA2B* и A гена *ADRB1* (гаплотип 4bDA) встречалось в 33% случаев и увеличивало шанс утолщения ТКИМ (ОШ 62,93; 95% ДИ (20,40–194,13), $p=0,0001$). Установлено протективное действие гаплотипа 4aIG (сочетание аллелей 4b гена *NOS3*, I гена *ADRA2B* и G гена *ADRB1*), встречающееся в выборке у 13% обследованных с АГ (ОШ 0,17; 95% ДИ (0,04–0,71), $p=0,017$).

В когорте некоренного населения, независимо от пола, возраста и наличия ДЛП, обнаружена ассоциация полиморфизма *AGT* с высоким риском развития атеросклероза каротидных артерий у пациентов с АГ (ОШ 5,30; 95% ДИ (1,16–24,35), $p=0,014$) по лог-аддитивному типу наследования. Тогда как для генотипа I/D гена *ADRA2B* установлено протективное влияние в отношении формирования данного поражения органов-мишеней среди обследованных с повышенным уровнем АД (ОШ 0,21; 95% ДИ (0,06–0,74), $p=0,013$) по сверхдоминантному типу наследования. При этом отношение шансов уменьшалось преимущественно у лиц женского пола (ОШ 0,16; 95% ДИ (0,03–0,90), $p=0,023$), возрастной группы 18–64 лет (ОШ 0,14; 95% ДИ (0,03–0,59), $p=0,005$) и некурящих (ОШ 0,08; 95% ДИ (0,01–0,55), $p=0,006$).

Обсуждение

На сегодняшний день в рамках глобальной стратегии снижения сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности основной задачей является выявление лиц, имеющих повышенный риск развития осложнений. На популяционном уровне именно у категории пациентов с АГ, в силу многочисленности этой группы, актуально проведение дополнительных исследований для уточнения степени риска. В опубликованных ранее данных было показано, что с атеросклерозом сонных артерий у больных АГ Горной Шории в когорте шорцев ассоциировались возраст, курение, гиперхолестеринемия, в когорте некоренного населения – давность анамнеза АГ, возраст, гипербетакхолестеринемия [18]. Одним из перспективных дополнительных исследований для оценки индивидуального риска является опре-

деление генетических маркеров субклинического поражения сонных артерий, в частности увеличения ТКИМ [19]. Ранее в популяционных исследованиях в России анализ подобного рода практически не проводился.

По результатам нашего исследования отмечалась высокая распространенность субклинического поражения каротидных артерий у пациентов с АГ среди коренного и некоренного населения Горной Шории. Важными представляются полученные нами данные о том, что у больных с повышенным уровнем АД атеросклеротические изменения сонных артерий чаще встречались среди коренного населения по сравнению с некоренным (78,3% против 69,7%, $p=0,046$). Данный факт, вероятно, определяется ранее установленными особенностями распределения полиморфизма гена аполипопротеина E (*ApoE*) у коренного населения. В когорте шорцев чаще встречался прогностически неблагоприятный аллель *ApoE4* по сравнению с некоренным населением [20]. Эта находка позволила предположить, что у шорцев с АГ стратегия профилактических усилий должна быть направлена на предупреждение появления и прогрессирования утолщения интимомедиальной стенки сонных артерий.

В нашей работе мы подтвердили, что увеличение ТКИМ ассоциировано с АГ в обеих этнических группах. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, которые показали положительную корреляционную связь изменений ТКИМ при увеличении систолического АД в популяционных исследованиях Китая, Финляндии и Италии [13, 21, 22].

Вместе с тем при обследовании населения Горной Шории нами показан вклад в этот процесс полиморфизмов генов-кандидатов АГ. У коренного этноса с АГ из изучаемых генов-кандидатов белков ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (*ACE*, *AGT* и *AGTR1*) с атеросклерозом сонных артерий ассоциировался полиморфизм гена *AGT*. В когорте шорцев риск развития увеличенной ТКИМ повышался в 3 раза у носителей гетерозиготного генотипа T/C по сверхдоминантному типу наследования, в когорте некоренного этноса взаимосвязь данного гена с субклиническим поражением каротидных артерий установлена по лог-аддитивному типу наследования. Ранее ассоциацию аллеля 235T гена *AGT* с увеличенной ТКИМ продемонстрировали М.Р. Елисеева с соавт. (2009 г.) в своей работе на узбекских пациентах с АГ [23]. В финской популяции подобной закономерности выявлено не было [24].

Результаты исследований возможной ассоциации I/D полиморфизма гена *ACE* с атеросклерозом сонных артерий в различных популяциях также противоречивы. У пациентов Кореи и Южной Италии с повышенным уровнем АД была установлена взаимосвязь мутантного генотипа D/D с увеличением ТКИМ [25, 26]. В 2012 г. опубликованы данные обследования когорты пациентов Сербии, где было показано независимое влияние генотипа D/D на на-

личие бляшек [27]. В когорте шорцев не установлено ассоциаций между полиморфизмом гена ACE и субклиническим поражением сонных артерий. Полученные нами данные согласовались с работами D. Purnamasari et al. (2012 г.) [28] и S. Merlo et al. (2016 г.) [29].

В нашем исследовании генотип С/Т гена *MTHFR* повышал шанс развития утолщения ТКИМ почти в 11 раз в коренной этнической группе. Даже при введении поправок на пол, возраст и наличие ДЛП данная ассоциация сохранялась по сверхдоминантному типу наследования. При этом рискованный эффект гетерозиготного носительства С/Т был связан с половой и возрастной принадлежностями. Недавно были опубликованы данные о распространенности атеросклероза сонных артерий у женщин Египта (280 человек): пациенты, несущие аллель Т, имели статистически значимый более высокий риск развития указанной патологии по сравнению с обследованными, несущими аллель С; кроме того, генотип Т/Т был независимым фактором риска увеличения ТКИМ [30]. Многие исследования демонстрировали ассоциацию именно аллеля Т с каротидным атеросклерозом [31, 32]. Однако A. Collings et al. (2008 г.) у населения Финляндии [33] и K. Sun et al. (2017 г.) у населения Китая [34] установили отсутствие зависимости между увеличением ТКИМ и распределением частот встречаемости аллелей гена *MTHFR*.

Заключение

В работе проанализирована распространенность

увеличенной ТКИМ у пациентов с АГ в двух этнических когортах и установлены ассоциации генов-кандидатов *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *ADRB1*, *ADRA2B*, *MTHFR* и *NOS3* с субклиническим поражением каротидных артерий. Частота данного поражения оказалась выше в коренной этнической группе (78,3%) по сравнению с некоренной (69,7%).

Установлена в когорте шорцев ассоциация с атеросклерозом сонных артерий генотипа Т/С гена *AGT* и генотипа С/Т гена *MTHFR* по сверхдоминантному типу наследования. Рисковый эффект генотипа С/Т гена *MTHFR* увеличивался у лиц возрастной группы 18–64 лет, женского пола и имеющих дислипидемию. Протективное действие выявлено для гена *ADRB1* по лог-аддитивному типу наследования.

В когорте некоренного этноса с атеросклерозом сонных артерий ассоциировался ген *AGT* по лог-аддитивному типу наследования. Протективное действие установлено для генотипа I/D гена *ADRA2B* по сверхдоминантному типу наследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Список литературы

1. Eleid MF, Lester SJ, Wiedenbeck TL, Patel SD, Appleton CP, Nelson MR, Humphries J, Hurst RT. Carotid ultrasound identifies high risk subclinical atherosclerosis in adults with low framingham risk scores. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010;23(8):802–8.
2. Davis PH, Dawson JD, Blecha MB, Mastbergen RK, Sonka M. Measurement of aortic intima-media thickness in adolescent and young adults. *Ultrasound Me. Biol.* 2010;36(4):560–5.
3. Costanzo P, Perrone-Filardi P, Vassallo E, Paolillo S, Cesarano P, Brevetti G, Chiariello M. Does carotid intima-media thickness regression predict reduction of cardiovascular events? *J. Am Coll Cardiol.* 2010;56(24):2006–20.
4. Sumin AN, Kukhareva IN, Trubnikova OA, Kovalenko AV. Carotid artery stenotic lesions in patients with ischemic stroke: prevalence, severity and associated factors. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2013;(3):12–17. Russian (Сумин АН, Кухарева ИИ, Трубникова ОА, Коваленко АВ. Стенозы каротидных артерий у больных с ишемическим инсультом: распространенность, выраженность, факторы, ассоциированные с их наличием. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2013;(3):12–17).
5. Buchanan DN, Lindenmaier T, McKay S. The relationship of carotid three-dimensional ultrasound vessel wall volume with age and sex: comparison to carotid intima-media thickness. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2012;38(7):1145–53.
6. Hermann DM, Gronewold J, Lehmann N, Seidel UK, Möhlenkamp S, Weimar C, Kälsch H, Moebus S, Jöckel KH, Erbel R, Bauer M. Intima-media thickness predicts stroke risk in the Heinz Nixdorf recall study in association with vascular risk factors, age and gender. *Atherosclerosis.* 2012;224(1):84–9.
7. Gepner AD, Keevil JG, Wyman RA. Use of carotid intima-media thickness and vascular age to modify cardiovascular risk prediction. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2006;19(9):1170–74.

8. Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharrett AR, Shabar E, Nieto FJ, Rosamond WD, Evans G. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *American Journal of Epidemiology*. 2000;151(5):478-87.
9. Dijk JM, van der Graaf Y, Bots ML, Grobbee DE, Algra A. Carotid intima-media thickness and the risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the SMART study. *European Heart Journal*. 2006;27(16):1971-78.
10. Murakami S, Otsuka K, Hotta N, Yamanaka G, Kubo Y, Matsuoka O, Yamanaka G, Kubo Y, Matsuoka O, Yamanaka T, Shinagawa M, Numoda S, Nishimura Y, Shibata K, Takasugi E, Nishinaga M, Ishibe M, Wada T, Okumiya K, Matsubayashi K, Yano S, Ichihara K, Cornélissen G, Halberg F. Common carotid intima-media thickness is predictive of all-cause and cardiovascular mortality in elderly community-dwelling people: Longitudinal Investigation for the Longevity and Aging in Hokkaido County (LILAC) study. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(suppl 1):S49-53.
11. Rafael H, Pierrejean T, Honorio S. Increase of Intima-Media thickness of the common carotid artery is associated with combined hypertension. *Am. J. Hyper*. 2005;18(5):149.
12. Tartiure JM, Kesri L, Safar, Girerd X, Bots M, Safar ME, Blacher J. Association between pulse pressure, carotid intima-media thickness and carotid and/or iliofemoral plaque in hypertensive. *J. Hum. Hypertens*. 2004;18(5):325-31.
13. Yu RHY, Ho SC, Ho SSY, Chan SS, Woo JL, Abuja AT. Carotid atherosclerosis and the risk factors in early postmenopausal Chinese women. *Maturitas*. 2009;63(3):233-9.
14. Maniatis T, Fritsch E, Sembrook J. Methods of genetic engineering. *Molecular cloning*. М., Мир, 1984, 480 p. Russian (Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984, 480 с.).
15. Snapir A, Scheinin M, Groop LC, Orho-Melander M. The insertion/deletion variation in the $\alpha 2B$ -adrenoceptor does not seem to modify the risk for acute myocardial infarction, but may modify the risk for hypertension in sib-pairs from families with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2003;24(2):15.
16. Lima JJ, Feng H, Duckworth L, Wang J, Sylvester JE, Kissoon N, Garg H. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism*. 2007;56(6):757-65.
17. Salimi S, Firoozrai M, Nourmohammadi I, Shabani M, Mobeibbi A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. *Indian J Med Res*. 2006;124(6):683-8.
18. Mulerova TA, Ogarkov MYu, Yankin AYu, Filimonov ES, Gruzdeva OV, Tsygankova DP, Barbarash OL. Influence of the ethnic factor on the defeat of target organs in arterial hypertension in the population of Gornaya Shoria. *Kardiologichesky vestnik* 2016;11(3):40-9. Russian (Мулерова ТА, Огарков МЮ, Янкин АЮ, Филимонов ЕС, Груздева ОВ, Цыганкова ДП, Барбараш ОЛ. Влияние этнического фактора на поражение органов-мишеней при артериальной гипертензии у населения Горной Шории. Кардиологический вестник. 2016;11(3):40-9).
19. Alieva AS, Boyarinova MA, Orlov AV, Moguchaya EV, Kolesova EP, Vasilyeva EY, Solntsev VN, Rotar OP, Konradi AO. Comparative analysis of diagnostic methods for subclinical vessels lesion (under the cohort of epidemiological study ESS-RF). *Russian Journal of Cardiology*. 2016;6(134):20-26. Russian (Алиева АС, Бояринова МА, Орлов АВ, Могучая ЕВ, Колесова ЕП, Васильева ЕЮ, Солнцев ВН, Ротарь ОП, Конради АО. Сравнительный анализ методов диагностики субклинического поражения сосудов (на примере выборки эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ) Российский кардиологический журнал. 2016;6(134):20-26).
20. Shakhbshneider EV, Kulikov IV, Ustinov SN, Yudin NS, Baum VA, Ogarkov MY, Polikutina OM, Kobzev VF, Malutina SK, Romashchenko AG, Voevoda MI. Polymorphism of the gene apolipoprotein E and its relationship with blood lipid levels in various ethnic groups of North Asia. The gene pool of the population of Siberia. Collection of scientific articles. Novosibirsk, 2003. С.169-173. Russian (Шахмашнейдер ЕВ, Куликов ИВ, Устинов СН, Юдин НС, Баум ВА, Огарков МЮ, Поликутина ОМ, Кобзев ВФ, Малютина СК, Ромащенко АГ, Воевода МИ. Полиморфизм гена аполипопротеина Е и его связь с уровнями липидов крови в различных этнических группах Северной Азии. Генофонд населения Сибири. Сборник научных статей. Новосибирск, 2003. С.169-173).
21. Toikka JO, Laine H, Ahotupa M, Haapanen A, Viikari JS, Hartiala JJ, Raitakari OT. Increased arterial intima-media thickness and in vivo LDL oxidation in young men with borderline hypertension. *Hypertension*. 2000; 36:929-33.
22. Prati P, Vanuzzo D, Casaroli M, Di Chiara A, De Biasi F, Feruglio GA, Touboul PJ. Prevalence and determinants of carotid atherosclerosis in a general population. *Stroke*. 1992;23:1705-11.
23. Eliseeva MR, Srozhidinova NZ, Khamidullaeva GA, Abdullaeva GZh. Genetic determinants of cardiovascular remodeling in Uzbek patients with essential hypertension. *Ter Arkh*. 2009;81(1):64-9. Russian (Елисеева МР, Срождинова НЗ, Хамидуллаева ГА, Абдуллаева ГЖ. Генетические детерминанты ремоделирования сердечно-сосудистой системы при эссенциальной гипертензии у узбеков. Терапевтический архив. 2009;81(1):64-9).
24. Islam MS, Lehtimäki T, Juonala M, Kähönen M, Hutri-Kähönen N, Kainulainen K, Miettinen H, Taittonen L, Kontula K, Viikari JS, Raitakari OT. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensinogen (AGT) genes and their associations with blood pressure and carotid artery intima media thickness among healthy Finnish young adults the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis*. 2006;188(2):316-22.

25. Park EY, Abn HM, Lee JA, Hong YM. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in Korean hypertensive adolescents. *Heart Vessels*. 2009;24(3):193-8.
26. Imbalzano E, Vatrano M, Quartuccio S, Di Stefano R, Aragona CO, Mamone F, D'Ascola A, Scuruchi M, Felice F, Trapani G, Alibrandi A, Cicone VA, Ceravolo R, Saitta A, Mandraffino G. Clinical impact of angiotensin I converting enzyme polymorphisms in subjects with resistant hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2017 Feb 11.
27. Kolakovi A, Zivkovi M, Radak D, Djuri T, Koncar I, Davidovi L, Dinci D, Alavanti D, Stankovi A. The association of ACEI/D gene polymorphism with severe carotid atherosclerosis in patients undergoing carotid endarterectomy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012;13(1):141-7.
28. Purnamasari D, Widjojo BD, Antono D, Syampurnawati M. ACE gene polymorphism and atherosclerotic lesion of carotid artery among offspring's of type 2 diabetes mellitus. *Acta Med Indones*. 2012;44(2):128-34.
29. Merlo S, Novák J, Tká ová N, Nikolajevi Starčevi J, Šantl Letonja M, Makuc J, Cokan Vujkovic A, Letonja J, Bregar D, Zorc M, Rojko M, Mankoč S, Kruzliak P, Petrovič D. Association of the ACE rs4646994 and rs4341 polymorphisms with the progression of carotid atherosclerosis in slovenian patients with type 2 diabetes mellitus. *Balkan J Med Genet*. 2016;18(2):37-42.
30. Abd El-Aziz TA, Mohamed RH. Influence of MTHFR C677T gene polymorphism in the development of cardiovascular disease in Egyptian patients with rheumatoid arthritis. *Gene*. 2017;610:127-132.
31. Saitou M, Osonoi T, Kawamori R, Katakami N, Kaneto H, Matsubisa M, Yamasaki Y. Gene tic risk factors and the anti-atherosclerotic effect of pioglitazone on carotid atherosclerosis of subjects with type 2 diabetes a retrospective study. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(4):386-94.
32. Koo HS, Lee HS, Hong YM. Methylenetetrahydrofolate reductase TT genotype as a predictor of cardiovascular risk in hypertensive adolescents. *Pediatr Cardiol*. 2008;29(1):1.
33. Collings A, Raitakari OT, Juonala M, Rontu R, Kähönen M, Hutri-Kähönen N, Rönnemaa T, Marniemi J, Viikari JS, Lehtimäki T. Associations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with markers of subclinical atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(1):22-30.
34. Sun K, Song J, Liu K, Fang K, Wang L, Wang X, Li J, Tang X, Wu Y, Qin X, Wu T, Gao P, Chen D, Hu Y. Associations between homocysteine metabolism related SNPs and carotid intima-media thickness: a Chinese sib pair study. *J Thromb Thrombolysis*. 2017; 43(3): 401-10.