

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ  
ИНТЕРЛЕЙКИН-6 И ФИБРИНОГЕН, РИСК ИШЕМИЧЕСКОГО  
ИНСУЛЬТА И УРОВНИ ФИБРИНОГЕНА

© 2012 г. Б. В. Титов<sup>1,2</sup>, Р. М. Барсова<sup>1,2</sup>, М. Ю. Мартынов<sup>1</sup>, А. А. Никонова<sup>1</sup>,  
А. В. Фаворов<sup>3,4</sup>, Е. И. Гусев<sup>1</sup>, О. О. Фаворова<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
Минздравсоцразвития Российской Федерации, Москва, 117437

<sup>2</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс  
Минздравсоцразвития Российской Федерации, Москва, 121552

<sup>3</sup>Государственный научный центр “ГосНИИ генетика”, Москва, 113545

<sup>4</sup>Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US

Поступила в редакцию 13.05.2011 г.

Принята к печати 31.05.2011 г.

Проведен анализ частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфного участка –174G>C гена *IL6* (rs1800795) у больных ишемическим инсультом этнических русских (200 человек) и в контрольной группе той же этнической принадлежности, сходной по полу и возрасту (140 человек). Выявлены значимые различия в частотах носительства аллеля (в гомо- или гетерозиготной форме) *IL6*\*–174G ( $p = 0.0029$ , ОШ = 2.9, 95% ДИ: 1.4–5.8), который может рассматриваться как фактор риска развития ишемического инсульта, и, соответственно, в частотах носительства протективного генотипа *IL6*\*–174C/C ( $p = 0.0029$ , ОШ = 0.35, 95% ДИ: 0.17–0.69). После разделения больных и лиц из контрольной группы по гендерному признаку аналогичные значимые различия наблюдали только между женщинами, перенесшими ишемический инсульт, и женщинами контрольной группы, а после разделения по возрасту – только в группах старше 60 лет. Комплексный анализ ассоциации с ишемическим инсультом носительства аллелей и генотипов SNP –174G>C гена *IL6* в сочетании с SNP 4266A>G (Thr312Ala) гена *FGA* (rs6050) и –249C>T гена *FGB* (rs1800788) выявил протективные сочетания *IL6*\*–174C/C + *FGA*\*4266A и *IL6*\*–174C/C + *FGB*\*–249C, которые несколько более значимо, чем один протективный генотип *IL6*\*–174C/C, ассоциированы с ишемическим инсультом и имеют практически такую же величину ОШ. В то же время выявлены сочетания альтернативного аллеля *IL6*\*–174G и тех же аллелей *FGA*\*4266A или *FGB*\*–249C, характеризующиеся, в сравнении с носительством одного аллеля риска *IL6*\*–174G, снижением как уровня значимости, так и величины ОШ. При совместном носительстве аллеля *IL6*\*–174G с генотипами *FGA*\*4266A/A, *FGB*\*–249C/C или с сочетаниями этих аллелей/генотипов “нейтрализующий” эффект усиливался. Иными словами, мы наблюдали ассоциацию с ишемическим инсультом сочетаний аллелей/генотипов *IL6*, *FGA* и *FGB*, в которых гену *IL6* принадлежит ведущая роль, а генам *FGA* и *FGB* – модулирующая. При анализе ассоциации аллелей/генотипов трех полиморфных участков с уровнем фибриногена в плазме крови значимых различий не выявлено.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, русские, гены, аллельный полиморфизм, интерлейкин-6, фибриноген, *IL6*, *FGA*, *FGB*, APSampler.

POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES ENCODING INTERLEUKIN-6 AND FIBRINOGEN, THE RISK OF ISCHEMIC STROKE AND FIBRINOGEN LEVELS, by B. V. Titov<sup>1,2</sup>, R. M. Barsova<sup>1,2</sup>, M. Yu. Martynov<sup>1</sup>, A. A. Nikonova<sup>1</sup>, A. V. Favorov<sup>3,4</sup>, E. I. Gusev<sup>1</sup>, O. O. Favorova<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>Pirogov Russian State Medical University, Moscow, 117437 Russia; <sup>2</sup>Russian Cardiology Scientific and Production Center, Moscow, 121552 Russia; <sup>3</sup>State Research Center “GosNII Genetika”, Moscow, 113545 Russia; <sup>4</sup>Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US; \*e-mail: olga.favorova@gmail.com). Carriage frequencies of alleles and genotypes of polymorphous locus of –174G>C *IL6* (rs1800795) were analyzed in the patients with

Принятые сокращения: ДИ – доверительный интервал; ИИ – ишемический инсульт; ИМ – инфаркт миокарда; КТ – компьютерная томография; МРТ – магнитно-резонансная томография; ОКС – острый коронарный синдром; ОШ – отношение шансов; ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ср. возраст – средний возраст; *APOE* – ген, кодирующий аполипопротеин E; *FGA* – ген, кодирующий  $\alpha$ -фибриноген; *FGA* –  $\alpha$ -фибриноген; *FGB* – ген, кодирующий  $\beta$ -фибриноген; *FGB* –  $\beta$ -фибриноген; *IL6* – ген, кодирующий интерлейкин-6; *IL-6* – интерлейкин-6; SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism).

\* Эл. почта: olga.favorova@gmail.com

ischemic stroke (IS) of Russian ethnic descent (200 cases) and in the control group of the same ethnic descent with similar sex and age (140 controls). Significant differences were identified in frequencies of carriage (in homo- or heterozygous form) of allele *IL6*\*-174G ( $p = 0.0029$ , OR = 2.9, 95% CI: 1.4–5.8), which can be considered as risk factor for IS and in frequencies of *IL6*\*-174C/C genotype carriage, correspondingly ( $p = 0.0029$ , OR = 0.35, 95% CI: 0.17–0.69). After sex stratification of patients and controls similar significant differences were observed only between female patients and controls, after age stratification the difference was observed only for the age group older 60 years. Complex analysis of association of SNP –174G>C *IL6* alleles and genotypes carriage in combination with SNP 4266A>G (Thr312Ala) *FGA* (rs6050) и –249C>T *FGB* (rs1800788) with IS revealed protective combinations *IL6*\*-174C/C + *FGA*\* 4266A и *IL6*\*-174C/C + *FGB*\*-249C, which were slightly more significant than single protective genotype *IL6*\*-174C/C associated with IS and their ORs didn't differ substantially from the single genotypes's OR value. At the same time the combinations of alternative allele *IL6*\*-174G with the same *FGB*\*-249C or *FGA*\* 4266A alleles were revealed and their association significance levels as well as OR values were lower than the values for the single risk allele *IL6*\*-174G. In case of the mutual carriage of *IL6*\*-174G allele with *FGA*\*4266A/A, *FGB*\*-249C/C genotypes or with combinations of these alleles/genotypes the “neutralized” effect became stronger. In other words, we observed association of IS with allele/genotype combinations of genes *IL6*, *FGA* and *FGB*, in which *IL6* plays key role and *FGA* and *FGB* have modulating function. In analysis of association of fibrinogen plasma levels with three analyzed polymorphous loci significant differences were not revealed.

**Keywords:** ischemic stroke, Russian, genes, allelic polymorphism, interleukin-6, fibrinogen, *IL6*, *FGA*, *FGB*, APSampler.

В России, как и во всем мире, цереброваскулярные события, в частности ишемический инсульт (ИИ), являются одной из главных причин инвалидизации и смертности. Частота инсультов варьирует, по разным данным, от 240 (Дижон, Франция) до 600 (Новосибирск, Россия) на 100000 населения [1]. В России регистрируется в среднем более 450000 случаев инсульта в год [2]. До 80% инсультов составляет ИИ [3], который поражает, наряду с людьми пожилого возраста, и работоспособное население.

Основной причиной ИИ считается атеросклеротическое поражение сосудов головного мозга, в котором важную роль играет провоспалительный цитокин интерлейкин-6 (IL-6). Согласно современным представлениям, IL-6 это не только компонент, значимый для развития атеросклеротических бляшек в сосудах головного мозга [4] и в сонной артерии [5], он обладает также нейротрофическим действием при церебральной ишемии [6].

ИИ представляет собой комплексное (многофакторное) заболевание с менделевским типом наследования, его развитие, клиническое течение и исход обусловлены как факторами внешней среды, так и генетической предрасположенностью, определяемой вкладом многих генов. Сложность взаимодействий внешних и генетических факторов предрасположенности не позволяет однозначно предсказать возникновение ИИ исходя из отдельно взятого признака, однако выявление эффекта того или иного конкретного гена на развитие или течение ИИ может способствовать пониманию биологической природы заболевания и открыть новые возможности для его профилактики и лечения. В полной мере это относится к гену *IL6*, кодирующему ключевой цитокин IL-6.

Поскольку разные этносы значительно отличаются распределением аллелей и генотипов отдельных генов, ассоциацию ИИ с аллельным полиморфизмом гена *IL6* необходимо изучать в этнически гомогенных группах. Действительно, при анализе ассоциации однонуклеотидного полиморфизма (SNP) –174G>C гена *IL6* (rs1800795) с развитием ИИ в различных этнических группах европеоидов получены противоречивые результаты. В одних этносах генотип G/G этого полиморфного участка оказался связан с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий, одним из ранних факторов риска развития сердечно-сосудистых патологий [7], в частности ИИ. В работах, выполненных на других этнических группах, с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий ассоциирован генотип C/C [8]. У белых североамериканцев [9] и итальянцев [10] с развитием ИИ ассоциирован аллель *IL6*\*-174G. В большинстве исследований не наблюдали ассоциации полиморфных участков гена *IL6* с ИИ, сравнивая общую группу больных с контрольной группой [11–14], но в некоторых из них ассоциация была выявлена при разбиении больных на различные подгруппы, например, по клиническим и лабораторным признакам, по субтипу инсульта и т.д. В русской популяции ассоциацию полиморфных вариантов *IL6* с развитием ИИ ранее не анализировали.

Воспаление при ИИ развивается не только через механизмы атерогенеза, но и вследствие усиления свертывающей способности крови [15]. IL-6, наряду с глюкокортикоидами, IL-1 $\beta$  и TNF, регулирует синтез фибриногена в острой фазе воспаления [16]. В промоторных областях всех трех генов, кодирующих субъединицы фибриногена человека (*FGA*, *FGB*, *FGG*), идентифицировано несколько IL-6-чувствительных элементов, связывающих STAT3 – основной фактор транскрип-

ции, передающий сигнал от рецептора IL-6 к ядру [17, 18]. В промоторных областях генов фибриногенов обнаружены также сайты связывания других факторов транскрипции, необходимых для полной экспрессии этих генов, индуцированной IL-6, в частности, сайт связывания ядерного фактора 3 гепатоцитов (HNF-3) в промоторе гена *FGB* [19]. По этому механизму IL-6 вносит свой вклад в повышение свертываемости крови и, в частности, в усиление атеротромбоза. Исходя из этих данных, в исследовании The Cardiovascular Health Study [20] у американских европеоидов проведен поиск сочетанных ассоциаций различных SNP в генах *IL6*, *FGA*, *FGB* и *FGG* с уровнями фибриногена в крови и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и выявлены некоторые аллельные сочетания SNP *IL6* и генов фибриногена, ассоциированные с уровнем фибриногена в крови. Однако четкой ассоциации между анализируемыми полиморфизмами и сердечно-сосудистыми заболеваниями, в том числе ИИ, не обнаружили.

В настоящей работе изучали ассоциацию носительства аллелей и генотипов SNP – 174G>C гена *IL6* (rs1800795) с развитием ИИ у этнических русских как по отдельности, так и в сочетании с SNP 4266A>G (Thr312Ala) гена *FGA* (rs6050) и –249C>T гена *FGB* (rs1800788). Изучали зависимость уровня фибриногена и показателей тромبوцитарного гемостаза в плазме крови от носительства вариантов этих генов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования.** Для исследования методом “случай-контроль” использовали образцы из коллекции крови и геномной ДНК 200 больных русской этнической принадлежности, перенесших ИИ, ср. возраст –  $64.1 \pm 10.8$  лет. Из них 123 мужчины (ср. возраст –  $61.2 \pm 9.8$ ) и 77 женщин (ср. возраст –  $68.7 \pm 10.7$ ). Все индивиды, вошедшие в исследование, были обследованы на кафедре неврологии и нейрохирургии Российского государственного медицинского университета на базе 12-го и 13-го неврологических отделений ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова. Во всех случаях диагноз “ИИ” подтвержден результатами КТ и/или МРТ. Контрольная группа состояла из 140 русских без анамнестических и диагностических указаний на стойкие и преходящие нарушения мозгового кровообращения, ср. возраст  $\pm$  SD (стандартное отклонение) –  $61.8 \pm 12.3$  лет. Из них 78 мужчин (ср. возраст –  $60.0 \pm 10.9$ ) и 62 женщины (ср. возраст –  $64.0 \pm 13.7$ ). От всех больных или их родственников получено информированное согласие на проведение исследования.

Через 3–5 дней после прекращения инфузионной терапии (10–14 дни заболевания) у 67 больных ИИ (39 мужчин и 28 женщин) определяли уровень фибриногена в плазме крови (г/л). У 60 человек из

контрольной группы (24 мужчины и 36 женщин) это определение проводили при заборе крови.

**ДНК из периферической крови выделяли** с помощью модифицированного метода с использованием экстракции смесью фенол–хлороформ [21].

**Полиморфный участок –174G>C гена *IL6* (rs1800795)** анализировали, определяя полиморфизм длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР (ПЦР-ПДРФ) [22].

**Полиморфный участок 4266A>G гена *FGA* (rs6050)** анализировали методом ПЦР-ПДРФ как описано в [23].

**Полиморфный участок –249C>T гена *FGB* (rs1800788)** анализировали методом ПЦР-ПДРФ в амплифицированном фрагменте в соответствии с [24].

**Статистический анализ.** Отклонение наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга анализировали с помощью алгоритма максимизации математического ожидания (expectation maximization – EM) с использованием свободно распространяемой программы Haploview 3.32 [25]. Сравнение частот аллелей, частот носительства аллелей и генотипов отдельных SNP у больных ИИ и в контрольной группе проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера с использованием онлайн-версии программы GraphPad InStat [26]. Для выявления значимой связи с ИИ носительства сочетаний аллелей/генотипов SNP –174G>C гена *IL6* с аллелями/генотипами SNP 4266A>G гена *FGA* и –249C>T гена *FGB* применяли программное обеспечение APSampler [27], оценивая значимость ассоциации каждого найденного основным алгоритмом сочетания по значению точного одностороннего критерия Фишера. Значимым считали различие сравниваемых частот при  $p \leq 0.05$ . Оценивая отношения шансов (ОШ) и их 95%-й доверительный интервал (ДИ), исключали из числа статистически значимых ассоциаций те, для которых ДИ пересекал 1. Концентрации фибриногена в различных группах сравнивали с использованием непараметрического теста Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено геномное типирование полиморфного участка в положении –174 промоторной области гена *IL6* (SNP –174G>C) с последующим анализом возможной ассоциации этого полиморфизма с развитием ИИ. Отклонений распределения аллелей и генотипов этого полиморфного участка от равновесия Харди–Вайнберга в контрольной группе не наблюдали.

Частоты аллелей и носительства аллелей и генотипов SNP –174G>C гена *IL6* у лиц, перенесших ИИ, и в контрольной группе приведены в табл. 1. Сравнение частот аллелей показало, что у

**Таблица 1.** Частоты аллелей и носительства аллелей и генотипов полиморфного участка –174G>C гена *IL6* у больных ишемическим инсультом (ИИ) и в контрольной группе

Аллель/генотип	Больные ИИ N = 200	Контрольная группа N = 140	Значение <i>p</i> при сравнении частот	ОШ (ДИ) для значимых различий
Аллели, число (%)				
C	141(35)	121(43)	0.037	0.71 (0.52–0.97)
G	259(65)	159(57)	0.037	1.4 (1.0–1.9)
Аллели, число (%) носителей				
C	126(63.2)	96(69)	Н.з.	
G	186(93)	115(82)	0.0029	2.9 (1.4–5.8)
Генотипы, число (%) носителей				
C/C	14(7)	25(18)	0.0029	0.35(0.17–0.69)
C/G	113(56.2)	71(51)		
G/G	73(36.8)	44(31)	Н.з.	

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 Н.з. – не значимо.

**Таблица 2.** Частоты аллелей и носительства аллелей и генотипов полиморфного участка –174G>C гена *IL6* у больных ишемическим инсультом (ИИ) женщин русской этнической принадлежности и в контрольной группе женщин

Аллель/генотип	Больные ИИ женщины N = 77	Контрольная группа, N = 62	Значение <i>p</i> при сравнении частот	ОШ (ДИ) для значимых различий
Аллели, число (%)				
C	50(32)	58(47)	0.018	0.54 (0.33–0.90)
G	104(68)	66(53)	0.018	1.32(1.0–1.7)
Аллели, число (%) носителей				
C	45(59)	44(71)	Н.з.	
G	72(93)	48(77)	0.011	4.2 (1.4–12.4)
Генотипы, число (%) носителей				
C/C	5(7)	14(23)	0.011	0.23 (0.08–0.70)
C/G	40(52)	30(48)		
G/G	32(41)	18(29)	Н.з.	

больных ИИ чаще встречался аллель *IL6*\*–174G ( $p = 0.037$ , ОШ = 1.4, 95% ДИ: 1.0–1.9) и было выше носительство этого аллеля ( $p = 0.0029$ , ОШ = 2.9, 95% ДИ: 1.4–5.8). Соответственно, в контрольной группе генотип *IL6*\*–174C/C встречался чаще, чем у больных ИИ ( $p = 0.0029$ , ОШ = 0.35, 95% ДИ: 0.17–0.70). Таким образом, носительство аллеля G может рассматриваться как фактор риска ИИ.

После разделения больных и контрольной группы по гендерному признаку наблюдали значимые различия между группами женщин, здоровых и перенесших ИИ. Как и в общей выборке, наблюдается позитивная ассоциация с ИИ частоты аллеля *IL6*\*–174G ( $p = 0.018$ , ОШ = 1.3, 95% ДИ: 1.0–1.7) и носительства этого аллеля ( $p = 0.011$ , ОШ = 4.2, 95% ДИ: 1.4–12.4) и негативная ассоциация генотипа *IL6*\*–174C/C ( $p = 0.011$ , ОШ = 0.23, 95% ДИ: 0.08–0.70) (табл. 2). У лиц муж-

ского пола значимых различий в частотах аллелей, носительства аллелей и генотипов у больных и в контрольной группе не обнаружено.

С целью изучения распределения носительства аллелей и генотипов полиморфного участка –174G>C гена *IL6* в зависимости от возраста каждую группу (больные ИИ и контрольная группа) разделили на две подгруппы: лица в возрасте 60 лет и менее и лица старше 60 лет. Оказалось, что в группе лиц старше 60 лет, как и в полной выборке, носителей аллеля *IL6*\*–174G среди больных было значимо больше, чем в контрольной группе ( $p = 0.0030$ , ОШ = 3.8, 95% ДИ: 1.6–9.2), а носителей генотипа *IL6*\*–174C/C – меньше ( $p = 0.0030$ , ОШ = 0.26, 95% ДИ: 0.11–0.62) (табл. 3). В возрастной группе ≤ 60 лет значимых различий в частотах аллелей и генотипов не выявлено.

**Таблица 3.** Частоты аллелей и носительства аллелей и генотипов полиморфного участка –174G>C гена *IL6* у больных ишемическим инсультом (ИИ) русской этнической принадлежности старше 60 лет и в контрольной группе индивидов старше 60 лет

Аллель/генотип	Больные, N = 133	Контрольная группа, N = 73	Значение <i>p</i> при сравнении частот	ОШ (ДИ) для значимых различий	
Аллели, число (%)					
C	95(36)	65(44)	Н.з.		
G	171(64)	81(56)	Н.з.		
Аллели, число (%) носителей					
C	86(65)	49(67)	Н.з.		
G	124(93)	57(78)	0.0030	3.8 (1.6–9.2)	
Генотипы, число (%) носителей					
C/C	9(7)	16(22)	0.0030	0.26 (0.11–0.62)	
C/G	77(58)	33(45)			
G/G	47(35)	24(33)	Н.з.		

**Таблица 4.** Сочетания аллелей и генотипов гена *IL6* с аллелями и генотипами *FGA* и *FGB*, значимо ассоциированные с ишемическим инсультом\*

Полиморфные участки генов в составе сочетания*			Носители (%) / неносители (%) сочетания		Величина <i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
<i>IL6</i> (–174G>C)	<i>FGB</i> (–249C>T)	<i>FGA</i> (4266A>G)	ИИ N = 200	контроль N = 140		
Носительство сочетаний аллелей/генотипов						
C/C	–	A	13(6)/187(94)	24(18)/110(82)	0.0011	0.32(0.15–0.65)
C/C	C	–	12(6)/188(94)	23(17)/115(83)	0.0015	0.32(0.15–0.66)
C/C	–	–	14(7)/186(93)	25(18)/115(82)	<b>0.0019</b>	<b>0.35(0.17–0.69)</b>
G	–	–	186(93)/14(7)	115(82)/25(18)	<b>0.0019</b>	<b>2.9(1.4–5.8)</b>
G	C	A	170(85)/30(15)	97(72)/37(28)	0.0039	2.2(2.3–3.7)
G	C	–	176(88)/24(12)	107(77)/31(23)	0.0083	2.1(1.2–3.8)
G	C	A/A	111(55)/89(45)	57(42)/77(58)	0.013	1.7 (1.1–2.6)
G	–	A	172(86)/28(14)	102(76)/32(24)	0.016	1.9(1.1–3.4)
G	–	A/A	111(55)/89(45)	58(43)/76(57)	0.019	1.6 (1.1–2.5)
G	C/C	A	116(58)/84(42)	102(76)/32(24)	0.031	1.6 (1.0–2.4)

\* Сочетания представлены в порядке возрастания величины *p*.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что этнические русские, носители аллеля *IL6*\*–174G в гомо- или гетерозиготной форме, имеют в 3–4 раза больший риск развития ИИ, чем носители генотипа *IL6*\*–174C/C (последних, как следует из наших данных, в русской популяции около 20%). Этот эффект более выражен у лиц старше 60 лет и у женщин в сравнении с мужчинами.

В табл. 4 приведены сочетания аллелей и генотипов гена *IL6* и *FGA* и *FGB*, значимо ассоциированные с развитием ИИ. Видно, что риск ИИ определяется геном *IL6*, и “ядро” выявленных сочетаний – носительство “протективного” генотипа *IL6*\*–174C/C или “аллеля риска” *IL6*\*–174G (генотипы C/G + G/G) (выделены жирным). Но-

сительство совместно с “протективным” генотипом *IL6*\*–174C/C аллеля *FGA*\*4266A либо аллеля *FGB*\*–249C практически не сказывается на величине ОШ, лежащей в диапазоне от 0.32 до 0.35, и несколько повышает значимость ассоциации с *p* = 0.0019 у одного генотипа *IL6*\*–174C/C гена до *p* = 0.0011 и *p* = 0.0015 в присутствии аллелей *FGA*\*4266A или *FGB*\*–249C соответственно. Здесь важно отметить, что в полном соответствии с данными, опубликованными нами ранее для несколько меньшей выборки [28], ассоциаций ИИ с носительством распространенных аллелей 4266A гена *FGA* и –249C гена *FGB* (частоты носительства у больных и здоровых более 90%) по отдельности не наблюдалось; это справедливо также для других аллелей и генотипов этих полиморфных участков. Вместе с тем, в сравнении с носитель-

**Таблица 5.** Сравнение концентраций фибриногена в плазме крови носителей различных генотипов полиморфных участков генов *IL6*, *FGB* и *FGA* среди 127 индивидов (независимо от статуса больной/здоровый)

Полиморфные участки генов	Генотип ( <i>N</i> носителей)	Фибриноген в плазме крови, г/л				
		медиана	min	max	среднее	SD*
<i>IL6</i> -174G>C	C/C (17)	4.9	4.1	5.1	4.8	0.22
	C/G (70)	4.9	4.5	6.7	4.9	0.39
	G/G (40)	4.9	2.2	7.1	4.8	0.71
	C/C + C/G (87)	4.9	4.1	6.7	4.9	0.37
	G/G + C/G (110)	4.9	2.2	7.1	4.9	0.54
<i>FGB</i> -249C>T	C/C (76)	4.9	2.2	6.7	4.8	0.5
	C/T (40)	4.9	4.1	7.1	5.0	0.5
	T/T (11)	4.9	4.7	5.5	4.9	0.25
	C/C + C/T (116)	4.9	2.2	7.1	4.9	0.5
<i>FGA</i> 4266A>G	TT + C/T (51)	4.9	4.1	7.1	5.0	0.5
	A/A (73)	4.9	2.2	6.7	4.8	0.5
	A/G (47)	4.9	4.1	6.7	4.9	0.4
	G/G (7)	4.7	4.7	7.1	5.2	0.8
	A/A + A/G (120)	4.9	4.9	6.7	4.9	0.5
	G/G + A/G (54)	4.9	4.9	7.1	4.9	0.5

\* SD – стандартное отклонение.

ством одного “неблагоприятного” аллеля *IL6*\*-174G ( $p = 0.0019$ , ОШ = 2.9) мы наблюдали снижение как уровня значимости, так и величины ОШ при совместном носительстве этого аллеля и тех же аллелей *FGB*\*-249C ( $p = 0.0083$ , ОШ = 2.1) или *FGA*\* 4266A ( $p = 0.016$ , ОШ = 1.92), которые входят в протективные сочетания. Такой же эффект наблюдали при совместном носительстве аллеля *IL6*\*-174G с обоими этими аллелями вместе, с генотипом *FGA*\*4266A/A, с аллелем *FGB*\*-249C совместно с генотипом *FGA*\*4266A/A и с аллелем *FGA*\*4266A совместно с генотипом *FGB*\*-249C/C. Последнее сочетание характеризовалось наихудшим уровнем значимости ( $p = 0.031$ ) и наименьшей величиной ОШ, равной 1.6. Таким образом, мы наблюдали ассоциацию с ИИ сочетаний аллелей/генотипов *IL6*, *FGA* и *FGB*, в которых гену *IL6* принадлежит ведущая роль, а генам *FGA* и *FGB* – модулирующая.

Нами изучено влияние полиморфизма генов *IL6*, *FGB* и *FGA* на уровень фибриногена в плазме крови. Поскольку значимых различий в уровне фибриногена в группе с ИИ и в контрольной группе, в полном соответствии с полученными нами ранее результатами [29], не выявлено, анализ проводили в объединенной группе из 127 человек независимо от статуса больной ИИ/здоровый (табл. 5). Сравнение уровня фибриногена у носителей различных генотипов полиморфного участка -174G>C гена *IL6* по критерию Манна-Уитни не выявило между ними значимых разли-

чий. Не наблюдали также значимых отличий в уровне фибриногена у носителей аллеля G (в гомо- или гетерозиготном состоянии, генотипы G/G + G/C) и аллеля C (генотипы C/C + G/C) от неносителей этих аллелей. Уровень фибриногена значимо не отличался и у носителей различных аллелей и генотипов полиморфных участков 4266A>G гена *FGA* и -249C>T гена *FGB*. Использование другого подхода: сравнение частот аллелей и генотипов всех изученных полиморфных участков в подгруппах, сформированных по уровню фибриногена в плазме крови (75 человек с уровнем фибриногена  $\geq 4.8$  г/л и 52 человека с уровнем фибриногена  $< 4.8$  г/л), также не показало значимых отличий.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллель *IL6*\*-174G, который, по нашим данным, ассоциирован с риском ИИ, является распространенным аллелем (аллелем “дикого типа”) у этнических русских: он встречается у 93% больных ИИ и у 82% индивидов контрольной группы, тогда как протективный генотип C/C несут 7% больных ИИ и 18% индивидов контрольной группы. Сходную ситуацию мы наблюдали ранее при анализе гена *APOE* – единственного из шести изучавшихся в работе [28] генов, аллели/генотипы которого оказались ассоциированными с ИИ у русских поодиночке. Таким образом, по результатам анализа исследованных к настоящему вре-

мени генов складывается представление, что русская популяция в целом генетически предрасположена к ИИ, а носительство редких аллелей служит протективным фактором. Эти данные согласуются с гипотезой об участии распространенных вариантов генов в развитии эволюционно нейтральных (возникающих после репродуктивного периода) распространенных заболеваний (common disease/common variant hypothesis, или CDCV hypothesis) [30].

Более 80% этнических русских, носителей аллеля *IL6\**–174G в гомо- или гетерозиготной форме, имеют в 3–4 раза больший риск развития ИИ, чем относительно немногочисленные носители генотипа *IL6\**–174C/C. Однако это соотношение не отражает индивидуального риска каждого отдельного человека, поскольку не учитывает возможного разнонаправленного вклада носительства аллелей/генотипов других генов, которые поодиночке или в составе сочетаний влияют на риск ИИ. У носителей аллеля *IL6\**–174G и генотипа *IL6\**–174C/C риск развития ИИ зависит также от пола и возраста. При введении разграничения по возрасту лица старше 60 лет характеризуются, несмотря на уменьшение размеров выборок как больных ИИ, так и здоровых, несколько более высокими значениями ОШ у носителей аллеля *IL6\**–174G по сравнению с общей группой (3.8 против 2.9), при незначительном расширении ДИ и сохранении того же уровня значимости ( $p = 3 \times 10^{-3}$ ). Еще более резко, чем возрастные, выражены гендерные различия в генетической предрасположенности к ИИ. Действительно, значимая ассоциация с ИИ сохраняется у женщин, несмотря на сокращение размеров выборок больных и здоровых примерно до 40%, и не наблюдается у мужчин, составляющих около 60% всех обследованных. По-видимому, в наблюдаемой ассоциации ИИ с SNP –174G>C без разделения индивидов по полу и возрасту доминирует вклад женщин старше 60 лет.

Наши данные о влиянии SNP –174G>C гена *IL6* на подверженность ИИ согласуются с результатами некоторых работ, выполненных в других этнических группах европеоидов: так, показана ассоциация аллеля *IL6\**–174G с развитием ИИ у белых североамериканцев [9] и итальянцев [10]. Сравнение частот аллелей и генотипов SNP –174G>C, наблюдаемое в нашей работе, с данными [9, 10] свидетельствует о существовании межэтнических различий. Например, в контрольных группах частота генотипа *IL6\**–174G/G составляет 25% у итальянцев, 31% у русских и 40% у североамериканцев. Вероятно, с этим связаны противоречивые результаты о роли этого полиморфизма в развитии ИИ, полученные в разных исследованиях [9–14].

Ассоциацию полиморфизма –174G>C гена *IL6* с развитием сердечно-сосудистых заболеваний у этнических русских анализировали ранее в случае инфаркта миокарда (ИМ) [31] и острого коронарного синдрома (ОКС) [32], но не ИИ. Ассоциации отдельных аллелей и генотипов ни с предрасположенностью к ИМ, ни с неблагоприятным исходом при ОКС не наблюдали. При этом частоты генотипов полиморфного участка –174G>C, полученные в настоящей работе в контрольной группе, совпадали с частотами генотипов у больных ОКС [32], а также у больных ИМ и в контрольной группе (наши неопубликованные данные для выборки, исследованной в [31]). В то же время, в обоих случаях [31, 32] выявлены сочетания аллелей и генотипов гена *IL6* и других генов воспаления, которые значимо ассоциированы с заболеванием. Нами обнаружен протективный эффект носительства аллеля *IL6\**–174C в сочетании с аллелями *CCR5\**d (rs333) и *LT\**4\*252G (rs909253) при развитии ИМ [31], а у больных ОКС выявлена ассоциация неблагоприятного исхода с совместным носительством генотипа –174G/G гена *IL6* и генотипов –1082G/A и –1082A/A гена *IL10* [32]. Сопоставление этих данных с результатами настоящей работы свидетельствует об однонаправленном влиянии полиморфных вариантов SNP –174G>C гена *IL6* на развитие сердечно-сосудистых заболеваний: G – аллель риска и C – протективный аллель, которое, однако, более отчетливо проявляется при ИИ, чем при ишемической болезни сердца.

Полученные нами данные о вкладе вариантов –174G>C гена *IL6* в предрасположенность к ИИ, скорее всего, отражают влияние этого полиморфизма на экспрессию гена *IL6*. Действительно, показана ассоциация носительства генотипа *IL6\**–174G/G с более высоким, а аллеля *IL6\**–174C – с более низким уровнем IL-6 в плазме крови [33–35], хотя в ряде аналогичных работ различия не достигали уровня значимости. Эти результаты хорошо согласуются с современными представлениями о чрезвычайно важной роли IL-6 в развитии атеросклеротического поражения сосудов головного мозга как основной причины ИИ. Повышенные уровни IL-6 обнаруживают в атеросклеротических бляшках [4]. Высокий уровень IL-6 в плазме крови ассоциирован с нестабильными бляшками в сонной артерии [5]. Повышение продукции IL-6 усиливает атерогенез, вызывая нарушение взаимодействия гладкомышечных клеток с лейкоцитами, что в свою очередь приводит к накоплению внеклеточного матрикса, усилению миграции лейкоцитов в очаг поражения и дальнейшему изменению уровня медиаторов воспаления [36].

Другая причина, по которой носительство генотипа *IL6\**–174G/G может быть фактором риска ИИ, – роль IL-6 в качестве основного медиато-

ра синтеза фибриногена в острой фазе, эффект которого реализуется через взаимодействие факторов транскрипции с IL-6-чувствительными элементами промоторов генов фибриногена [17, 18]. С помощью алгоритма APSampler мы оценили возможный совместный вклад полиморфных участков  $-174G>C$  *IL6*,  $4266A>G$  *FGA* и  $-249C>T$  *FGB* в развитие ИИ (см. табл. 4) и выявили протективные сочетания  $IL6^*-174C/C + FGA^* 4266A$  и  $IL6^*-174C/C + FGB^*-249C$ , которые несколько более значимо, чем один протективный генотип  $IL6^*-174C/C$ , ассоциированы с ИИ и практически не влияют на величину ОШ. В то же время, носительство в сочетании с аллелем предрасположенности  $IL6^*-174G$  тех же распространенных аллелей или генотипов *FGA* либо *FGB*, порознь или совместно, приводит к последовательному повышению значения *p* от 0.0019 для одного аллеля  $IL6^*-174G$  до 0.031 у сочетания  $IL6^*-174G + FGB^*-249C/C + FGA^* 4266A$ . Параллельно наблюдается уменьшение величины ОШ от 2.9 до 1.6. Эти результаты могут служить аргументом в пользу существования эпистатического взаимодействия между генами *IL6*, *FGA* и *FGB*, в котором гены *FGA* и *FGB* выступают как гены-модификаторы эффекта гена *IL6* [37]. Как упоминалось выше, не выявлено ассоциации различных полиморфных участков генов *IL6*, *FGA*, *FGB* и *FGG*, а также их сочетаний с развитием ИИ у белых североамериканцев [20]. Однако в эту работу не вошли полиморфные участки  $-174G>C$  гена *IL6* и  $-249C>T$  гена *FGB*.

На основании данных, приведенных в табл. 4, можно предположить, что носительство аллелей  $FGB^*-249C$  и  $FGA^* 4266A$  “ослабляет” эффект аллеля  $IL6^*-174G$  и служит протективным фактором, защищающим от подверженности ИИ. Ранее [28] мы уже наблюдали протективный вклад  $FGB^*-249C$  в сочетании с протективным генотипом  $APOE^*-491T/T$ , который в этом случае проявлялся более весомо, чем в случае сочетания с протективным генотипом  $IL6^*-174C/C$ , приводя к двукратному уменьшению значений ОШ и *p*.

Уровень фибриногена является на 20–50% наследуемым признаком [38]. Исходя из представлений, что полиморфные участки в гене *IL6* влияют на продукцию IL-6, а этот цитокин регулирует синтез фибриногена в острой фазе воспаления [16–18], можно ожидать, что аллельный полиморфизм гена *IL-6* влияет на уровень циркулирующего фибриногена. В связи с этим мы сравнивали уровни фибриногена в плазме крови носителей различных генотипов полиморфного участка  $-174G>C$  гена *IL6*, но не выявили значимых различий.

Мы не наблюдали также влияния полиморфизма  $-249C>T$  *FGB* на уровень фибриногена. Вместе с тем, ранее в той же выборке больных ИИ

мы обнаружили ассоциацию носительства аллеля  $T$  другого полиморфного участка  $-148C>T$  гена *FGB* (rs1800787) с более высоким уровнем фибриногена [29]. Аналогичные результаты получены во многих работах для различных этнических групп европеоидов, в части из которых вместо SNP  $-148C>T$  анализировали  $-455G>A$  у европеоидов находящийся с ним в жестком неравновесном сцеплении ( $D' = 1$ ). В качестве примера можно привести работу [39], в которой у 1811 участников Framingham Heart Study анализировали структуру неравновесного сцепления в кластере генов фибриногена и уровень фибриногена. В полном соответствии с результатами популяционных исследований находятся данные, полученные в работе [19], в которой анализировали транскрипцию гена *FGB* в опытах *in vitro* на культурах клеток гепатомы человека и показали, что из шести полиморфизмов промоторной области, в том числе и  $-249C>T$ , на активность промотора влияет только SNP  $-148C>T$ . Оказалось, что SNP  $-148C>T$  расположен рядом с сайтом связывания фактора транскрипции HNF-3 и влияет на его активность, чем и объясняются полученные результаты [19].

Анализируемый нами SNP  $4266A>G$  (Thr312Ala) *FGA* расположен в кодирующей области гена, поэтому наблюдавшееся отсутствие его влияния на уровень фибриногена представляется закономерным и согласуется с результатами других работ (например, [40]). В то же время, замена остатка треонина на аланин в положении 312 полипептидной цепи *FGA* приводит к изменению свойств фибриногена и образованию более жесткого плотного тромба, что влияет на стабильность последнего и вероятность эмболии [41]. Разумно предположить, что этот полиморфизм гена *FGA* влияет на атеротромбоз, и этим, вероятно, обусловлена наблюдаемая нами его ассоциация с ИИ в составе сочетаний.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о весомом вкладе гена *IL6* в формирование генетической предрасположенности этнических русских к ИИ, а гены *FGA* и *FGB* вступают как гены-модификаторы. Для окончательного вывода эти результаты должны быть воспроизведены в независимом исследовании.

Авторы благодарят И.Е. Сердюк за участие в сборе коллекции крови больных ИИ и контрольной группы, а также М.Г. Парфенова за участие в генотипировании.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Москвы (Государственный контракт № 8/3-280н-10).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M. 2008. Stroke. *Lancet*. **10**, 1612–1623.
- www.neuro-med.ru
- Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. 2003. Эпидемиология инсульта в России. *Инсульт*. **8**, 4–9.
- Schieffer B., Schieffer E., Hilfiker-Kleiner D., Hilfiker A., Kovanen P.T., Kaartinen M., Nussberger J., Harringer W., Drexler H. 2000. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. **101**, 1372–1378.
- Yamagami H., Kitagawa K., Nagai Y., Hougaku H., Sakaguchi M., Kuwabara K., Kondo K., Masuyama T., Matsumoto M., Hori M. 2004. Higher levels of interleukin-6 are associated with lower echogenicity of carotid artery plaques. *Stroke*. **35**, 677–681.
- Suzuki S., Tanaka K., Suzuki N. 2009. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*. **29**, 464–479.
- Rothwell P.M. 2000. Carotid artery disease and the risk of ischaemic stroke and coronary vascular events. *Cerebrovasc Dis*. **10**, 21–33.
- Tso A.R., Merino J.G., Warach S. 2007. Interleukin-6 174G/C polymorphism and ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. **38**, 3070–3075.
- Jenny N.S., Tracy R.P., Ogg M.S., Luong le A., Kuller L.H., Arnold A.M., Sharrett A.R., Humphries S.E. 2002. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the –174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **22**, 2066–2071.
- Flex A., Gaetani E., Papaleo P., Straface G., Proia A.S., Pecorini G., Tondi P., Pola P., Pola R. 2004. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke*. **35**, 2270–2275.
- Acalovschi D., Wiest T., Hartmann M., Farahmi M., Mansmann U., Auffarth G.U., Grau A.J., Green F.R., Grond-Ginsbach C., Schwaninger M. 2003. Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke. *Stroke*. **34**, 1864–1869.
- Balding J., Livingstone W.J., Pittock S.J., Mynett-Johnson L., Ahern T., Hodgson A., Smith O.P. 2004. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Irish J. Med. Sci*. **4**, 200–203.
- Chamorro A., Revilla M., Obach V., Vargas M., Planas A.M. 2005. The –174G/C polymorphism of the interleukin 6 gene is a hallmark of lacunar stroke and not other ischemic stroke phenotypes. *Cerebrovasc. Dis*. **19**, 91–95.
- Lalouschek W., Schillinger M., Hsieh K., Endler G., Greisenegger S., Marculescu R., Lang W., Wagner O., Cheng S., Mannhalter C. 2006. Polymorphisms of the inflammatory system and risk of ischemic cerebrovascular events. *Clin. Chem. Lab. Med*. **44**, 918–923.
- McCull B.W., Allan S.M., Rothwell N.J. 2009. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke. *Neuroscience*. **158**, 1049–1061.
- Fuller G.M., Zhang Z. 2001. Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **936**, 469–447.
- Duan H.O., Simpson-Haidaris P.J. 2003. Functional analysis of interleukin 6 response elements (IL-6REs) on the human gamma-fibrinogen promoter: binding of hepatic Stat3 correlates negatively with transactivation potential of type II IL-6REs. *J. Biol. Chem*. **278**, 41270–41281.
- Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. **265**, 621–636.
- Verschuur M., De Jong M., Felida L., De Maat M.P., Vos H.L. 2005. A hepatocyte nuclear factor-3 site in the fibrinogen beta promoter is important for interleukin 6-induced expression, and its activity is influenced by the adjacent –148C/T polymorphism. *J. Biol. Chem*. **280**, 16763–16771.
- Carty C.L., Heagerty P., Heckbert S.R., Jarvik G.P., Lange L.A., Cushman M., Tracy R.P., Reiner A.P. 2010. Interaction between fibrinogen and IL-6 genetic variants and associations with cardiovascular disease risk in the Cardiovascular Health Study. *Ann. Hum. Genet*. **74**, 1–10.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Ed. Nolan C. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- DeMichele A., Martin A.M., Mick R., Gor P., Wray L., Klein-Cabral M., Athanasiadis G., Colligan T., Stadtmayer E., Weber B. 2003. Interleukin-6 –174G>C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res*. **63**, 8051–8056.
- Carter A.M., Catto A.J., Grant P.J. 1999. Association of the alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation. *Circulation*. **1199**, 2423–2426.
- Hooft F.M., von Bahr S.J., Silveira A., Iliadou A., Eriksson P., Hamsten A. 1999. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **19**, 3063–3070.
- <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>
- <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>
- Favorov A.V., Andreevskii T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. 2005. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics*. **171**, 2113–2121.
- Парфенов М.Г., Титов Б.В., Судомоина М.А., Мартынов М.Ю., Фаворов А.В., Оchs M.F., Гусев Е.И., Фаворова О.О. 2009. Комплексный анализ генетической предрасположенности к ишемическому инсульту у русских. *Молекуляр. биология*. **43**, 937–945.
- Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Сердюк И.Е., Парфенов М.Г., Колесникова Т.И., Ясаманова А.Н., Никонова А.А., Судомоина М.А., Фаворова О.О. 2008. Полиморфизм гена β-фибриногена, уровень фибриногена и показатели тромбоцитарного гемостаза у больных с ишемическим инсультом. *Журн. неврологии и психиатрии. Инсульт*. **23**, 10–14.

30. Ples M.M. 2008. What can genome-wide association studies tell us about the genetics of common disease? *PLoS Genetics*. **4**, 33.
31. Судомоина М.А., Сухина Т.С., Барсова Р.М., Фаворов А.В., Шахнович Р.М., Титов Б.В., Матвеева Н.А., Рыбалкин И.Н., Власик Т.Н., Ochs M.F., Руда М.Я., Фаворова О.О. 2010. Комплексный анализ ассоциации полиморфизма генов воспаления с инфарктом миокарда. *Молекуляр. биология*. **44**, 463–471.
32. Благодатских К.А., Евдокимова М.А., Агапкина Ю.В., Никитин А.Г., Бровкин А.Н., Пушков А.А., Благодатских Е.Г., Кудряшова О.Ю., Осмоловская В.С., Минушкина Л.О., Кочкина М.С., Селезнева Н.Д., Данковцева Е.Н., Чумакова О.С., Бакланова Т.Н., Талызин П.А., Резниченко Н.Е., Донецкая О.П., Терещенко С.Н., Красильникова Е.С., Джаиани Н.А., Акатова Е.В., Глезер М.Г., Галявич А.С., Закирова В.Б., Казиолова Н.А., Тимофеева И.В., Ягода А.В., Боева О.И., Хоролец Е.В., Шлык С.В., Волкова Э.Г., Маргарян М.П., Гузь И.О., Константинов В.О., Тимофеева Н.В., Сидоренко Б.А., Затейшиков Д.А., Носиков В.В. 2010. Полиморфные маркеры G(-174)C гена *IL6* и G(-1082)A гена *IL10* и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром. *Молекуляр. биология*. **44**, 839–846.
33. Berković M.S., Jokić M., Marout J., Radosević S., Zjacić-Rotković V., Kapitanović S. 2007. IL-6-174 C/G polymorphism in the gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). *Exp. Mol. Pathol.* **83**, 474–479.
34. Fishman D., Faulds G., Jeffery R., Mohamed-Ali V., Yudkin J.S., Humphries S., Woo P. 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1369–1376.
35. Walston J.D., Fallin M.D., Cushman M., Lange L., Psaty B., Jenny N., Browner W., Tracy R., Durda P., Reiner A. 2007. IL-6 gene variation is associated with IL-6 and C-reactive protein levels but not cardiovascular outcomes in the cardiovascular health study. *Hum. Genet.* **122**, 485–494.
36. Loppnow H., Zhang L., Buerke M., Lautenschläger M., Chen L., Frister A., Schlitt A., Luther T., Song N., Hofmann B., Rose-John S., Silber R.E., Müller-Werdan U., Werdan K. 2011. Statins potentially reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J. Cell Mol. Med.* **15**, 994–1004.
37. Cordell H.J. 2002. Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2463–2468.
38. De Maat M.P., Verschuur M. 2005. Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited. *Curr. Opin. Hematol.* **12**, 377–383.
39. Kathiresan S., Yang Q., Larson M.G., Camargo A.L., Tofler G.H., Hirschhorn J.N., Gabriel S.B., O'Donnell C.J. 2006. Common genetic variation in five thrombosis genes and relations to plasma hemostatic protein level and cardiovascular disease risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1405–1412.
40. Jood K., Danielson J., Ladenvall C., Blomstrand C., Jern C. 2008. Fibrinogen gene variation and ischemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 897–904.
41. Standeven K.F., Grant P.J., Carter A.M., Scheiner T., Weisel J.W., Ariens R.A.S. 2003. Functional analysis of the fibrinogen A $\alpha$  Thr312Ala polymorphism. Effects on fibrin structure and function. *Circulation.* **107**, 2326–2330.