

Следует ли учитывать полиморфизм С-реактивного белка при оценке сердечно-сосудистых рисков?

**Вельков В.В., кандидат биологических наук,
ЗАО «ДИАКОН»,
Проспект Науки 5, г. Пушкино,
Московская обл., 142290, РФ**

Общепринято, что С-реактивный белок (СРБ) - весьма эффективный предиктор сердечно-сосудистых нарушений, дающий важную диагностическую информацию как при всех уровнях холестерина, связанного с липопротеинами низкой плотности, так и при всех уровнях метаболического синдрома (1-12). Базовые уровни СРБ у лиц, не имеющих острых заболеваний, полагаются воспроизводимыми (11). Долгое время, механизмы, которые обуславливали бы индивидуальные базовые уровни СРБ, были неизвестны, хотя существовали указания, что базовые уровни СРБ в существенной степени зависят от индивидуальных генетических особенностей (13). В связи с этим возникают, по крайней мере, два принципиальных вопроса: не являются ли повышенные из-за генетических особенностей уровни СРБ причиной развития некоторых патологий? А если нет, не приводят ли генетически обусловленное повышение или понижение уровней СРБ к некорректной интерпретации результатов определения hsСРБ?

Проблема усугубляется еще и тем, что минимальный острофазный ответ не обязательно означает, что воспаление действительно имеет место. Небольшое повышение СРБ не является специфическим указанием именно на воспалительный процесс. В частности, повышенный базовый уровень СРБ может наблюдаться при: diabetes mellitus, уремии, гипертензии, повышенной физической нагрузке, низкой физической активности, нарушениях сна, хронической усталости, высоком или низком потреблении алкоголя, депрессии, приеме оральных гормональных контрацептивов, заместительной гормональной терапии, в третьем триместре беременности, при старении (см. обзоры 14-15). И неудивительно, что в последнее время с одной стороны диагностическая ценность определения hsСРБ некоторыми специалистами ставится под сомнение (16-17), а с другой стороны, широким фронтом идут исследования механизмов влияния генетических особенностей СРБ (его генетического полиморфизма) на базовые уровни его концентрации в плазме крови.

Ген СРБ имеет полиморфизм, с которым связаны разные базовые уровни СРБ.

У человека ген СРБ расположен на хромосоме 1q23 в эволюционно законсервированной области, кодирующей белки, критические для выживания, в частности, белки иммунной системы и белки, ответственные за межклеточные взаимодействия (18). Ген СРБ имеет два экзона и один интрон и, как это было установлено на основе первых популяционных молекулярно-генетических исследований, (анализировали ген СРБ у 250 лиц), у гена СРБ есть нуклеотидный полиморфизм внутри 3' некодирующей области; оказалось, с этим полиморфизмом связаны значения уровней hsСРБ (19). В другом исследовании было найдено, что полиморфизм внутри интрона (ген СРБ был изучен у 546 лиц) так же сильно связан с уровнем СРБ (20). Но имеет ли это отношение к коронарным патологиям?

Генетический полиморфизм СРБ не связан с сердечно-сосудистыми проблемами.

У 2397 лиц, (у 1063 были сердечно-сосудистые проблемы, а у остальных 1334 сердечно-сосудистых заболеваний ранее не наблюдалось) изучали связь между полиморфизмом гена СРБ и уровнями СРБ плазме. В частности, проводили поиск связи уровней СРБ в плазме с разными его аллелями (замена 1059G-->C во втором экзоне и T-->A в интроне). Мутация 1059G > C является синонимической и меняет кодон CTC на CTG. Оба кодируют лейцин. Такие синонимичные замены, хоть и не меняют аминокислотной последовательности белков, но могут влиять на скорость их синтеза (трансляции). Мутация в интроне расположена на расстоянии в 29 нп от 5' интрон/экзон сайта сплайсинга, Оказалось, что мутации в интроне T-->A приводят к повышению hsСРБ. И, более того, указанная закономерность наблюдалась как у группы с сердечно-сосудистыми проблемами, так и у контрольной группы. Авторы делают важный вывод, что генетический полиморфизм обуславливает базовый уровень СРБ *независимо* от традиционных факторов сердечно-сосудистого риска (21). Не обнаружено связи между

полиморфизмом гена СРБ болезнью Альцгеймера (22). Похоже, так же что полиморфизм гена СРБ, меняющий уровень СРБ не связан с возникновением патофизиологии тромбоза вен (venous thromboembolism). Показано, отсутствие связи между аллелями гена СРБ (нуклеотидными заменами 1059G-->C в экзоне и T-->A в интроне) и риском тромбоза вен (23).. При исследовании 779 пациентов, перенесших ангиопластику, у 343 из которых имели место рестенозы, оказалось, что риск рестенозов не связан с аллелями +1059G -> C в экзоне и T -> A в интроне гена СРБ (24).

Обнаруженный недавно новый аллель гена СРБ +1444C->T, как оказалось, так же связан с изменением базовой концентрации СРБ в плазме. Но будут ли эти аллели по-разному влиять на степень индукции СРБ при воспалительном ответе? Исследование проводили при periodontal therapy, которая вызывала промежуточный воспалительный ответ. Уровни СРБ и интерлейкина -6 измерялись у 55 пациентов (страдающих периодонтитом) в разные промежутки времени после интенсивного лечения (на 1 и 7 день). Показано, что гомозиготы по аллелю +1444T имели более высокие уровни СРБ (в первый день - 21.10+/-4.81 мг/л, на седьмой 7, 4.89+/-0.74 мг/л). А гетерозиготные пациенты с аллелем 1444TC имели следующие уровни СРБ: в первый день - 12.37+/-1.61 мг/л, а на седьмой - 3.08+/-2.00 мг/л. Существенно, что уровни эти *не зависели* от общепринятых факторов риска сердечнососудистых заболеваний. «Следует ли учитывать генетический полиморфизм СРБ при оценке сердечнососудистых рисков?» - спрашивают авторы? (25). «Да» - отвечают на этот вопрос исследователи, которые секвенировали участки промоторной зоны (длиной 1,156 пн) гена СРБ у 287 здоровых людей. Был найден полиморфизм в участке (-412)CACGTG(-407) (E-box1), ответственном за связывание с регуляторным фактором транскрипции. Другой участок промотора (-394)CACTTG(-389) (E-box 2) поддерживал связывание транскрипционного фактора только в присутствии аллеля -390 T. Комбинация аллелей (-409G/-390T) давала наибольшую промоторную активность, как это было показано транскрипцией *in vitro*, а наименьшую промоторную активность давала комбинация аллелей (-409A/-390T). Более того, оказалось, что эти закономерности отражаются и *in vivo* на уровнях СРБ в плазме индивидов, несущих соответствующие аллели. Индивиды с аллелями -409G/-390T имели самый высокий уровень СРБ (10.9+/-2.25 мкг/мл), а с аллелями -409A/-390T самый низкий (5.01+/-1.56 мкг/мл). Эта разница была обнаружена у не курящих, и не была связана ни с полом, ни с возрастом, ни с расовой принадлежностью. Авторы заключают, что генетический полиморфизм промоторной зоны гена СРБ, существенно влияющий на базовый уровень СРБ в плазме, следует принимать во внимание когда риски оцениваются с помощью hsСРБ и полагают необходимым разработку стратифицировать здоровых людей на группы согласно их высокому или низкому риску по отношению к воспалительным заболеваниям (26).

Однако, несмотря, вроде бы, на неоднократно показанное отсутствие связи между различными базовыми уровнями СРБ, определяемыми его разными аллелями, и кардиоваскулярным риском, ситуация в целом отнюдь не однозначна.

Генетический полиморфизм СРБ связан с кардиоваскулярными проблемами.

Как оказалось, другая мутация в промоторе гена СРБ -286 оказалась сильно связанной с повышенными уровнями СРБ и преимущественно у лиц с сердечнососудистыми заболеваниями. Однако никакой разницы по частотам этого аллеля у пост-инфарктных пациентов и контрольной группой найдено не было. Может быть, с риском инфарктов и с риском не тяжелых коронарных проблем связаны другие, еще не обнаруженные мутации в других участках гена СРБ? (27).

Действительно, похоже, связь между некоторыми мутациями в гене СРБ и предрасположенностью к коронарным заболеваниям все же есть. Но она весьма не простая. Исследовались представители этнической популяции Хан (Han) в Китае. Аллели СРБ имели следующие мутации: в промоторной зоне -717A ->G и в структурном гене +2147A ->G. В исследованной группе 619 пациентов (мужчины) имели сердечнососудистые заболевания, контрольная группа - 615 здоровых мужчин среднего возраста. Частота аллеля -717A>G была достоверно выше у больных, но не у здоровых. Однако, что оказалось неожиданным, связи обнаруженной корреляции с уровнями СРБ в плазме не было. В целом, однако, сделан вывод, что -717A аллель гена СРБ вызывает предрасположенность китайской популяции Хан к кардиоваскулярным заболеваниям (28).

В результате длительных и широкомасштабных исследований (а наблюдали 3790 лиц, возраст которых в начале наблюдения был от 7 до 15 лет) была выявлена связь между полиморфизмом промоторной области гена СРБ, уровнем СРБ в плазме и кардиоваскулярным риском. У лиц с кардиоваскулярными проблемами обнаружены аллели, сильно связанные с повышенными уровнями СРБ. В целом обнаружен 31 полиморфный аллель, мутационные замены в этих аллелях не изменяли аминокислотной последовательности СРБ. Все мутантные варианты были сгруппированы в 4 категории, которые были соотнесены с самым низким (lowest), низким,

высоким и самым высоким . (highest) уровнями СРБ. Среднее значение СРБ составляло 3.1 мг/л., самый низкий уровень был 1.5 мг/л, самый высокий – 4.6. мг/л. Обнаружены этнические различия во влиянии различных аллелей СРБ в позициях 790, 1440, и 2667 на его уровни в плазме. Алели 790А, 1440С, и 2667С были связаны с пониженным СРБ, но только у евроамериканцев, но не у афроамериканцев. По мнению авторов, в данный момент, вопрос, является ли повышение СРБ маркером сердечнососудистых заболеваний или их казуативным агентом четкого ответа не имеет. Не дает его и данное исследование, но, по мнению авторов, оно может все же свидетельствовать в пользу того, что СРБ – казуативный агент. Мутационные замены в промоторе изменяют уровни СРБ на протяжении всей жизни *независимо* от других факторов, коррелирующих с повышенным СРБ, (в особенности, независимо от индекса массы тела). Полагается, что если СРБ казуативный агент сердечнососудистых заболеваний, то его аллели, связанные с повышенным СРБ, должны быть также связаны с повышенным риском сердечнососудистых заболеваний. В данное время, средний возраст исследованной когорты 42 года и поэтому количество зарегистрированных сердечнососудистых эпизодов, которые в ней произошли, еще не достаточно, чтобы дать окончательный ответ (29). В пользу того, что СРБ - казуативный агент говорит и то, что одна из мутаций в его промоторе, повышающая уровень СРБ, связана с диабетом 2 типа (type 2 diabetes mellitus) в популяции американских индейцев Пима (30). А при исследовании группы в 586 человек было обнаружено, что *пониженный* базовый уровень СРБ (2.05 и 1.27 мг/л контроль - 2.82 мг/л) был связан с двумя мутациями в его гене и приводил, в итоге, к предрасположенности к системной красной волчанке (systemic lupus erythematosus). (31).

Однако на базовый уровень СРБ может влиять полиморфизм не только его собственного гена.

Генетический полиморфизм в других генах влияет на базовые уровни СРБ

Как известно, статины и ингибиторы адсорбции холестерина также понижают и концентрации СРБ. Один из существенных факторов, обеспечивающих поддержание гомеостаза стерина – это генетический полиморфизм аполипопротеина Е (АпоЕ). Взаимосвязь между уровнями СРБ и полиморфизмом гена АпоЕ обнаружилась при исследовании 739 лиц с заболеваниями коронарных артерий и 570 лиц без таковых. Оказалось, что вне зависимости от наличия коронарных заболеваний, уровни СРБ были выше у лиц, гомозиготных по аллелю apoE3/3, чем у индивидов с вариантами apoE3/4 или apoE4/4. Это означает, что уровни СРБ связаны с генетическим полиморфизмом гена АпоЕ. Полагается, что при сердечнососудистых заболеваниях предикторные характеристики СРБ могут зависеть от полиморфизма АпоЕ (32). Но насколько реально для обеспечения корректной интерпретации результатов hsСРБ проводить молекулярно-генетический анализ полиморфизма не только гена СРБ, но гена АпоЕ ?

Уровень СРБ зависит и от генетического полиморфизма гена интерлейкина 1В. Синтез СРБ индуцируется, как известно, интерлейкинами IL-6 и IL-16. У 338 здоровых доноров измеряли уровни СРБ и определяли нуклеотидный полиморфизм генов IL-6 и IL-1, который оказался следующих типов: IL1A(C/T)-889, IL1B(C/T)-511, IL1B(C/T) + 3954, IL6(G/C)-174 и ILRN. Показано, что повышенный уровень СРБ связан аллелем IL1B + 3954.(33). Эти данные были подтверждены, когда у 160 пациентов с коронарными заболеваниями определяли связь между уровнями СРБ и пятью полиморфными локусами гена IL-1: IL-1B(-511), IL-1B(+3954), variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism в интроне 2 гена IL-1RN - IL-1RN(VNTR)], IL-6(-174) и IL-6(-572). Показано, что аллели IL-1B(+3954)Т, [IL-1RN(VNTR)*2] коррелировали с повышенным и пониженным уровнями СРБ соответственно. При этом такие факторы, как курение, индекс массы тела и общий холестерин и диабеты положительно коррелировали с СРБ. После статической обработки сделан вывод, что именно аллель IL-1B(+3954)Т у пациентов с сердечнососудистыми заболеваниями связан повышенным СРБ (34). LT-alpha (LTA) – противовоспалительный цитокин, который играет важную роль в патогенезе атеросклероза у мышей. Показана связь между повышенным уровнем СРБ и аллелем LTA A252G (35).

Полиморфизм белков может быть вызван не только мутациями в соответствующих им генах, но и пост-трансляционной модификацией, например, гликозилированием. и др. Полиморфизм также может быть вызван и различными конформационными формами белковых молекул, образование которых, как правило, зависит от их взаимодействия с лигандами.

Конформационный полиморфизм СРБ.

СРБ, выделяемый из сыворотки с помощью афинной хроматографии, принято называть нативным СРБ. За последние несколько десятилетий биохимические и физиологические характеристики СРБ изучались именно на нативном СРБ. В растворе нативный СРБ состоит из пяти ассоциированных идентичных субъединиц молекулярной массой в 23 кДа каждая и может быть отнесен к пентраксинам. Каждая из субъединиц имеет сайт связывания с фосфохолином

(основной гидрофобный компонент мембран). Структурный анализ и применение моноклональных антител показали, что все пять сайтов связывания с фосфохолином расположены на одной поверхности пентамера (B face'). На другой стороне пентамера (A face') расположены сайты связывания с лигандами C1q комплемента. С СРБ связываются так же и другие лиганды, как, например, фосфорилэтиленмоноамин, поликатионы, хроматин и гистоны, а так же фибронектин (36, 37). Связываясь с разными лигандами СРБ выполняет разные функции (38).

Еще в 1983 г было сообщено об обнаружении новой формы СРБ при обработке его препаратов ЭДТА-мочевинной. «Новый» вариант СРБ имел более быструю подвижность при электрофорезе и пониженную растворимость по сравнению с нативным СРБ. «Новая» форма СРБ ускоряла агрегацию тромбоцитов и секрецию серотонина, модулировала метаболизм арахидоновой кислоты, стимулировала высвобождение интерлейкина и др. Этот «новый» СРБ, названный «нео-СРБ» имеет антигенные детерминанты, отличные от тех, которые имеет нативный СРБ и состоит из свободных мономеров, а не из пентамеров. Другое название этой формы СРБ – мСРБ (мономерный). С помощью моноклональных антител антигены неоСРБ были обнаружены на поверхности человеческих периферийных лимфоцитов крови, на поверхности киллерных клеток, на В клетках и др. (39-41). Недавно функциональность мСРБ была подтверждена весьма детально. Как известно, концентрации СРБ резко возрастают при воспалительном ответе, вызывая коронарные заболевания за счет прямой активации эндотелиальных клеток. Показано, что для этого процесса необходим переход от нативного пентамерного СРБ в его мономерную форму (мСРБ). В культуре эндотелиальных клеток артерий человека именно мСРБ вызывает быстрое повышение концентраций компонентов воспалительного ответа, таких как, моноцитный хемоаттрактантный белок-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), интерлейкин-8 и др. Нативный СРБ такого эффекта не давал. Полагается, что для индукции провоспалительного процесса необходим переход пентамерной формы СРБ в мономерную (42).

Пентамерные, кольцеобразные формы СРБ, как говорилось, были открыты при использовании лигандов связанных с мембранами и в присутствии кальция. Однако *in vitro* в отсутствие кальция на отрицательно заряженных мембранах было обнаружено, что СРБ – это стабильный мономер, сходный с глобулинами. Были обнаружены и фибриллы, состоящие из мономеров СРБ. Свежие препараты СРБ образуют короткие однонитевые фибриллы, но после нескольких дней хранения, препараты СРБ образуют длинные пучки фибриллярных структур. При определенных условиях эти структуры могут переходить друг в друга (43)

Происходят ли такие конформационные *in vitro*, что их вызывает и какие функции выполняют различные конформационные формы и с какими (пато)физиологическими состояниями они связаны? Насколько перспективной может оказаться разработка методов определения СРБ, основанных на применении моноклональных антител против различных эпитопов различных конформационных форм СРБ? Ответ на этот вопрос зависит от результатов будущих исследований.

Разумеется, высокий полиморфизм конформационных форм СРБ сильно усложняет проблему рационального измерения уровней СРБ и корректной интерпретации их результатов. Эта проблема может значительно усложниться наличием полиморфизма СРБ, вызванного его пост-трансляционной модификацией.

Полиморфизм СРБ, вызванный его ковалентной модификацией.

Ковалентная модификация СРБ была показана в 2003 г. Оказалось, может быть двух типов – гликозилирование и укорочение аминокислотной последовательности с С и N и конца. Для исследований исследовали препараты СРБ, выделенные из сыворотки больных с промежуточным воспалительным ответом, страдавших: системной красной волчанкой, острым лимфобластным лейкозом (acute lymphoblastic leukaemia ALL), туберкулезом, висцеральным лейшманиозом (visceral leishmaniasis - VL), синдромом Кушинга, остеогенной саркомой (osteogenic sarcoma). Индуцированный уровень СРБ в индивидуальных препаратах составлял 22–342 мкг/мл, что соответствовало повышению его базовой концентрации (0,5 мкг/мл) в 42-684 раз. Гликозилирование было убедительно показано с помощью набора (Digoxigenin kits), обработкой нейраминидазой и связыванием с лектинами. В гликозилированных остатках с помощью газожидкостной хроматографии, масс-спектропии и флюорометрии было показано присутствие сиаловой кислоты, глюкозы, галактозы и маннозы. В препаратах СРБ, полученных из сыворотки пациентов с синдромом Кушинга и остеогенной саркомой, обнаружено отсутствие двух пептидных фрагментов, одного, длиной в 6 аминокислот, с N-конца, другого, длиной в 3 аминокислоты с C-конца. Как показало компьютерное моделирование, отсутствие этих пептидов практически не затронуло важные функциональные участки молекулы СРБ. Полагается, что утрата двух концевых

пептидов стимулирует гликозилирование СРБ (44). Функциональное значение гликозилирования СРБ, которое происходит при разных патологических процессах, пока не выяснено.

Заключение: что означает полиморфизм СРБ для лабораторной клинической диагностики?

С точки зрения проблем лабораторной диагностики, факт наличия у СРБ высокого полиморфизма вызывает ряд весьма принципиальных вопросов:

- какие именно препараты СРБ используются для получения антител, применяемых для иммунологического определения СРБ:

- пентамерные или мономерные?
- из сыворотки здоровых доноров?
- из сыворотки пациентов с острофазным ответом?
- из сыворотки пациентов, несущих мутации в гене СРБ?

Действительно, можно ли применять для определения hsСРБ антитела, полученные к острофазному СРБ?

В целом же, что касается генетического полиморфизма СРБ, то похоже, что именно мутационные особенности гена СРБ обуславливают как повышенные, так и пониженные значения его базовых уровней, которые, в свою очередь, являются казуативными агентами различных патологий. Тот факт, что повышенный уровень hsСРБ, видимо, это не кардиомаркер, а казуативный агент коронарных заболеваний, не только не уменьшает его диагностическую ценность, но и открывает перспективы поиска специфических препаратов, направленных на понижение повышенного базового уровня СРБ.

Ближайшие годы, несомненно, принесут не только новые, может быть, весьма неожиданные открытия, связанные с полиморфизмом СРБ но и, не исключено, создадут также и непредвиденные проблемы. Как говорит английская поговорка: Problems arise to be solved. Будем надеяться именно на это.

Литература.

1. Шевченко ОП, Белки острой фазы воспаления. Лаборатория, 1996, 1.
2. Долгов В В, Щетинович К А Лукичева Т И Прудник И М Методические аспекты определения индивидуальных белков. Учебно-методическое пособие. Лабсистемс
3. Долгов В В Шевченко О П Лабораторная диагностика нарушений обмена белков, Учебное пособие, Москва, РМАПО, КЛД, 2002, 67 с.
4. Фомин В В, Козловская ЛВ С-реактивный белок и его значение в кардиологической практике Журнал доказательной медицины для практикующих врачей 2003, т5 , N 5
5. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med 1997;336:973–979.
6. Koenig W, Sund M, Frohlich M, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. Circulation 1999; 99:237–242.
7. Pate VB, Robbins MA, Topol EJ, C-reactive protein: A 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease Cleveland Clinic Journal of Medicine 2001 88, 6 521-534
- 8.. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. N Engl J Med 2002;347:1557–1565.
- 9.. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events. Circulation 2003; 107:391–397.
10. Pepys MB, Hirschfield GM, C-reactive protein: a critical update, J. Clin. Invest 2003. 111:1805–1812

- 11.. Pepys MB CRP or not CRP? That Is the Question *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, June 1, 2005; 25(6): 1091 - 1094.
12. Rifai N, High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Useful Marker for Cardiovascular Disease Risk Prediction and the Metabolic Syndrome *Clin. Chem.*, March 1, 2005; 51(3): 504 - 505.
13. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001; 154 :681–689.
- 14.. Kushner I, C-reactive protein elevation can be caused by conditions other than inflammation and may reflect biologic aging. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2001, v. 68, N6, 535-537.
- 15.. Verma S, Szmitko PE, Ridker PM C-reactive protein comes of age., *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* (2005) 2, 29-36
16. Levinson S S, Miller J J Elin R J Poor Predictive Value of High-Sensitivity C-Reactive Protein Indicates Need for Reassessment *Clinical Chemistry* 50, No. 10, 2004 1733 – 1735
17. Levinson S S., Brief review and critical examination of the use of hs-CRP for cardiac risk assessment with the conclusion that it is premature to use this test. *Clinica Chimica Acta* 356 (2005), 1 – 8.
18. Watson ML, Kinsmore SF, Johnston GI, et al. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med* 1990;172:263–272.
19. Brull DJ, Serrano N, Zito F, et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23: 2063–2069
20. Szalai AJ, McCrory MA, Cooper GS, Wu J, Kimberly RP. Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun* 2002 ;3:14–19.
21. Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RY. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):139-145
22. Flexa A, Pola R, Serricchio M, Gaetani E, Proi AS, Giorgio AD, Papaleo P, Bernabei R, Pola P Polymorphisms of the Macrophage Inhibitory Factor and C-Reactive Protein Genes in Subjects with Alzheimer's Dementia, *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004;18:261–264
23. Zee RY, Hegener HH, Cook NR, Ridker PM. C-reactive protein gene polymorphisms and the risk of venous thromboembolism: a haplotype-based analysis. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(8): 1240-1243.
24. Zee RY, Hegener HH, Fernandez-Cruz A, Lindpaintner K.C-reactive protein gene polymorphisms and the incidence of post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis*. 2004;176(2):393-396.
25. D'Aiuto F, Casas JP, Shah T, Humphries SE, Hingorani AD, Tonetti MS. C-reactive protein (+1444C>T) polymorphism influences CRP response following a moderate inflammatory stimulus. : *Atherosclerosis*. 2005;179(2):413-417.
26. Szalai AJ, Wu J, Lange EM, McCrory MA, Langefeld CD, Williams A, Zakharkin SO, George V, Allison DB, Cooper GS, Xie F, Fan Z, Edberg JC, Kimberly RP. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J Mol Med*. 2005; 83(6):440-447.
27. Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, Ericsson CG, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P.A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):193-198.
28. Chen J, Zhao J, Huang J, Su S, Qiang B, Gu D. -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study. *J Mol Med*. 2005;83 (1):72-78
29. Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M, Liu K, Williams OD, Iribarren C, Lewis EC, Fornage M, Boerwinkle E, Gross M, Jaquish C, Nickerson DA, Myers RM, Siscovick DS,

Reiner AP. Polymorphisms within the C-Reactive Protein (CRP) Promoter Region Are Associated with Plasma CRP Levels. *Am J Hum Genet.* 2005; 77 (1):64-77

30.. Wolford JK, Gruber JD , Ossowsk VM, Vozarova B, Tataranni P A, Clifton Bogardus C, and Robert L. Hanson RL A C-reactive protein promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in Pima Indians *Molecular Genetics and Metabolism* 2003 78 136–144

31. Russel A D, Graham SC, Shepherd C, Robertson CA, Whittaker J, Meeks, Powell RJ, Isenberg DA, Walport MJ, Vyse TJ Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus *Human Molecular Genetics*, 2004, Vol. 13, No. 1 137–147

32. Winfried M, Scharnagl H, Hoffmann MM, Boehm BO Winkelmann BR The apolipoprotein E polymorphism is associated with circulating C-reactive protein (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study), *Eur Heart Journal* 2004, 25, 23, 2109-2119

33. Eklund C, Jahan F, Pessi T, Lehtimäki T, Hurme M. Interleukin 1B gene polymorphism is associated with baseline C-reactive protein levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw.* 2003; 14(3):168-171

34. Latkovskis G, Licis N, Kalnins U C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet.* 2004;31(5):207-213

35. Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. LTA 252G allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. *Atherosclerosis.* 2004;176(1):91-94

36. Shrive, A. K., Cheetham, G. M. T., Holden, D., Myles, D. A. A., Turnell, W. G., Volanakis, J. E., Pepys, M. B., Bloomer, A. C. and Greenhough, T. J. (Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat. Struct. Biol.* 1996 3, 346–354

37. Volanakis, J. E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol. Immunol.* 2001 38, 189–197

38. Verma S , Szmitko P E, Yeh ETH C-Reactive Protein Structure Affects Function *Circulation.* 2004;109:1914 –1917

39. Potempa LA, Maldonado BA, Laurent P, Zemel ES Gewurz H: Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol Immunol* 20: 1165-1175, 1983.

40..Potempa LA, Zeller JM, Fiedel BA, Kinoshita CM and Gewurz H: Stimulation of human neutrophils, monocytes, and platelets by modified C-reactive protein (CRP) expressing a neoantigenic specificity. *Inflammation* 12: 391-405, 1988.

41. Potempa LA, Gewurz H, Harris JE and Braun DP: Stimulatory effects of the C-reactive protein subunits on monocyte function, including the release of IL-1. *Protein Biol Fluids* 34: 287-290, 1986.

42. Khreiss T, József L, Potempa LA , Filep JG, Conformational Rearrangement in C-Reactive Protein Is Required for Proinflammatory Actions on Human Endothelial Cells *Circulation.* 2004;109:2016-2022.

43. Hong-Wei Wang, Yi Wu, Yong Chen and Sen-Fang Sui. Polymorphism of structural forms of C-reactive protein. *Int J Molec Med*, 2002, 9: 665-671

44. Das T, Sen A , Kempf T , Pramanik S R, Mandal C, Mandal C Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. *Biochem. J.* (2003) 373, 345–355