

На правах рукописи

АГАПКИНА ЮЛИЯ ВАЛЕНТИНОВНА

**ПОЛИМОРФНЫЕ МАРКЕРЫ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К НЕБЛАГОПРИЯТНОМУ ИСХОДУ У БОЛЬНЫХ,
ПЕРЕНЕСШИХ ОСТРЫЙ КОРОНАРНЫЙ СИНДРОМ.**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»).

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор

Носиков Валерий Вячеславович

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук,
профессор, Московская
медицинская академия им.
И.М.Сеченова, г. Москва

Асанов Алий Юрьевич

доктор биологических наук,
доцент, Институт общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН,
г. Москва.

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

Ведущая организация

Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта (ИМБ РАН), г.Москва

Защита состоится « » января 2011 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика».

Реферат разослан « » декабря 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Т. Л. Воюшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной инвалидности и смертности в экономически развитых странах, при этом на долю ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда приходится примерно две трети случаев смерти от сердечно-сосудистых заболеваний.

К настоящему моменту описано большое количество факторов, определяющих повышенную вероятность неблагоприятного исхода после эпизода обострения ишемической болезни сердца (ИБС). Однако, выявление среди всех больных тех, у кого риск таких осложнений максимален, все еще остается до конца не решенной задачей. Влияние факторов гемостаза, воспаления, липидов крови, глюкозы и веществ, участвующих в ее метаболизме, изучалось во многих научных работах. Большинство авторов отмечают их взаимосвязь с развитием неблагоприятного исхода у больных ИБС.

В то же время, роль генетических факторов в развитии обострений ИБС изучена недостаточно. При этом следует отметить, что исследования, проведенные на парах сиблингов, показали значительно более высокую конкордантность развития ИБС и его осложнений у однояйцевых близнецов, чем у разнояйцевых близнецов, а также при семейной отягощенности (De Faire and Pedersen, 1994). Эти данные позволяют уверенно говорить о существенной роли генетической предрасположенности в развитии атеросклероза и производных от него осложнений.

В развитии осложнений ИБС ключевую роль играют процессы, объединяемые сегодня термином «атеротромбоз» (Балуда, 1980; Фермилен, 1986). При этом нарушения в системах гемостаза и липидного обмена могут усугубляться генетическими особенностями, влияющими на структуру и скорость формирования этих процессов. Гены, кодирующие эти факторы, можно рассматривать в качестве кандидатов для изучения наследственной предрасположенности к осложнениям ИБС (Pratt, 1999). Носительство определенных аллельных вариантов этих генов может быть связано с повышенным риском развития заболевания и/или его осложнений.

Установление ассоциации гена с заболеванием и последующая оценка индивидуального генетического риска имеют важное значение для разработки дифференцированного подхода к профилактике и лечению данной патологии и ее осложнений в зависимости от наследственной предрасположенности конкретного

пациента. Подобные исследования позволяют точнее и надежнее оценивать генетический риск развития заболевания и прогнозировать его течение.

Цель и задачи работы. Целью данной работы было изучение ассоциации полиморфных маркеров генов-кандидатов с неблагоприятным исходом у больных, перенесших острый коронарный синдром. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить аллели и генотипы полиморфных маркеров генов, кодирующих липазу липопротеинов (*LPL*), аполипопротеин Е (*APOE*), аполипопротеин В (*APOB*), фибриноген (*FGB*) и белок С (*PROC*).
2. Провести сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров данных генов-кандидатов в исследованной выборке больных для выявления вклада генетических факторов в развитие различных типов неблагоприятного исхода у больных, перенесших острый коронарный синдром.
3. Изучить ассоциацию факторов риска с неблагоприятными исходами.

Научная новизна работы. В данной работе впервые исследована ассоциация полиморфных маркеров *Ser447Ter* и *T(-93)G* гена *LPL*, *T(-219)G* гена *APOE*, *C(-516)T* гена *APOB*, *G(-455)A* гена *FGB* и *C(-1654)T* гена *PROC* с развитием острого коронарного синдрома.

Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе больных, перенесших эпизод обострения ИБС. Установлено, что носительство генотипов *CT* и *TT* полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC*, которые ассоциированы с меньшим уровнем белка С, ответственного за антикоагулянтную активность системы гемостаза, независимо связано с наступлением таких неблагоприятных исходов как нефатальный и фатальный инфаркт миокарда (ИМ), нефатальный и фатальный инсульт, нестабильная стенокардия (НС), потребовавшая госпитализации, внезапная коронарная смерть и смерть от других причин.

Практическая ценность работы. Выявление ассоциации полиморфных маркеров генов с развитием острого коронарного синдрома (ОКС) открывает новые перспективы в выделении групп пациентов с высоким риском развития патологии. Полученные данные об ассоциации полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* с развитием неблагоприятного исхода в группе больных, перенесших эпизод обострения ИБС, позволяют внедрить генетическое тестирование больных ИБС для

выделения лиц, имеющих максимальную предрасположенность к развитию неблагоприятных исходов, и указывают на возможное направление разработки новых лекарственных средств.

Апробация работы. Диссертационная работа была апробирована на заседании Секции молекулярной биологии Ученого Совета ФГУП «ГосНИИгенетика» 10 ноября 2010 г. Результаты настоящей работы докладывались на IV-ой международной конференции «Перспективное прогнозирование в биологии» (о. Санторин, Греция, 21 – 23 сентября 2008 г.); на Российском национальном конгрессе кардиологов «Повышение качества и доступности кардиологической помощи» (г. Москва, Россия, 07 – 09 октября 2008 г.), Российском национальном конгрессе кардиологов «Кардиология: реалии и перспективы» (г. Москва, Россия, 06 – 08 октября 2009 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, включая 2 статьи, а также материалы конференций.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 122 страницах машинописного текста и содержат 20 таблиц и 10 рисунков. В работе процитированы 201 зарубежный и 42 отечественных литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование ассоциации полиморфных маркеров ряда генов-кандидатов с острым коронарным синдромом (ОКС).

В исследовании приняло участие 16 медицинских центров из семи городов России (Москва, Казань, Пермь, Челябинск, Ставрополь, Ростов-на-Дону, Санкт-Петербург), исследование проводилось с декабря 2006 г. по июль 2010 г. В исследование включены больные (всего 1145 человек), поступившие в стационар в связи с развитием ОКС. Больные, у которых в результате ОКС несформировался ИМ с зубцом Q, должны были поступить в стационар не позднее 72 ч от момента начала заболевания и иметь хотя бы один из следующих дополнительных критериев:

- депрессия сегмента ST крайней мере на 1 мм в двух соседних отведениях;
- инверсия зубца T не менее 3 мм;
- транзиторный подъем сегмента ST;
- повышение уровня кардиоспецифических ферментов в крови (сердечная фосфокиназа креатинина, тропонины).

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью системы NCBI в сети Интернет (www.ncbi.nlm.nih.gov). Использовали следующие разделы: MapView (построение генетической карты), dbSNP (информация о полиморфных маркерах). Для подбора праймеров и рестриктаз использовали пакет программ Invitrogen Vector NTI Advance 10 (версия Education).

Таблица 1.

Характеристика группы больных, перенесших острый коронарный синдром.

Показатель	Группа больных
Пол (М/Ж)	717 / 428
Конечные точки	411
Возраст, лет*	61,6 ± 10,2
Курящие	467
Нестабильная стенокардия/инфаркт миокарда без зубца Q	663
Инфаркт миокарда с зубцом Q	550
Рецидив инфаркта во время госпитализации	21
Эпизоды тяжелой ишемии во время госпитализации	158
Новые ишемические изменения на электрокардиограмме во время госпитализации	46

* Средний возраст ± стандартное отклонение.

Идентификация аллелей полиморфных маркеров проводилась с использованием полимеразной цепной реакции, последующего расщепления фрагментов ДНК рестриктазами, а так же с использованием метода ПЦР в реальном времени и электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 8%-ном полиакриламидном геле или 2%-ном агарозном геле.

1.1. Исследование ассоциации полиморфного маркера *Ser447Ter* гена *LPL* с ОКС.

Известно, что повышенное содержание триглицеридов в плазме крови (свыше 2,25 мМ или 0,2 г/л) ассоциировано с ускоренным развитием атеросклероза и прочих сердечно-сосудистых патологий. Ген, кодирующий липазу липопротеинов, которая осуществляет гидролиз триглицеридов в составе хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), а также способствует увеличению уровня холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), может быть функционально вовлечен в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний. Это предположение подтверждается рядом исследований, указывающих на связь между низкой активностью данного фермента в крови и ранним развитием сосудистых нарушений (Henderson et al., 1999).

Таблица 2.

Частота генотипов полиморфного маркера *Ser447Ter* гена *LPL*.

Генотип	Количество человек	Распределение частот	χ^2	p
<i>Ser/Ser</i>	975	0,85	6,825	0,066
<i>Ser/Ter</i>	169	0,15		
<i>Ter/Ter</i>	1	0,001		
Всего	1145	100		

Липаза липопротеинов – это гликопротеин, состоящий из двух доменов. N-концевой домен обладает каталитической активностью и содержит участок связывания кофактора - аполипопротеина СII, тогда как С-концевой домен фермента отвечает за связывание субстрата. Для осуществления липолитической активности липаза липопротеинов образует гомодимер, в котором С-концевой домен одной субъединицы взаимодействует с N-концевым доменом другой субъединицы (Wong et al., 1997).

Ген липазы липопротеинов (*LPL*) расположен на хромосоме 8p22, состоит из 10 экзонов и кодирует предшественник фермента длиной 474 аминокислот. Полиморфный маркер *Ser447Ter* находится в экзоне 9. Наличие аллеля *447Ter* приводит к потере двух С-концевых аминокислот и связано с повышением каталитической активности липазы липопротеинов и, как следствие, к 8%-ному снижению среднего уровня триглицеридов в плазме крови (Rip et al., 2006). Недавний масштабный мета-анализ 89 исследований (Talmud et al., 2007) выявил общую защитную роль носительства аллеля *Ter447* гена *LPL* по отношению к раннему развитию ИБС ($OR = 0,84$).

Исследование французских ученых показало, что у носителей аллеля *447Ter* как среди пациентов, так и здоровых доноров (614 и 733 человек) понижено содержание триглицеридов и ЛПОНП (Jemaа et al., 1995). В японском исследовании пациентов с ишемическим инсультом и здоровых доноров показало, что носительство генотипа *447Ter* понижает риск развития ишемических инсультов более чем в 2 раза (Shimo-Nakanishi et al., 2001).

В российских популяциях проведено несколько исследований ассоциации различных вариантов гена *LPL* (полиморфизмы *HindIII* и *PvuII*) с сосудистыми поражениями мозга (Костомаров и соавт., 2008) и сердца (Малыгина и соавт., 2002). Однако ассоциация полиморфных маркеров *Ser447Ter* и *Asn291Ser* гена *LPL* с сосудистыми патологиями в русской популяции ранее исследована не была.

В нашей работе при исследовании распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *Ser447Ter* гена *LPL* с ОКС статистически достоверных различий получено не было (Табл. 2). Кривые выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *Ser447Ter* гена *LPL* также существенно не различались (Рис. 1).

Таким образом, полиморфный маркер *Ser447Ter* гена *LPL* по результатам проведенного нами исследования не ассоциирован с развитием неблагоприятного исхода у больных, перенесших ОКС.

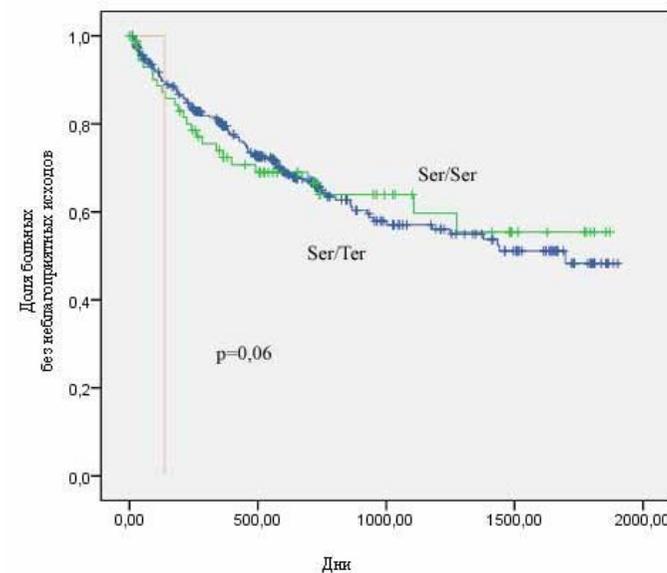


Рис. 1. Кривая выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *Ser447Ter* гена *LPL*.

1.2. Исследование ассоциации полиморфных маркеров *G(-93)T* гена *LPL* с ОКС.

Полиморфизм *T/G* находится в положении -107 от точки инициации транскрипции гена *LPL* (8p22). Исходное обозначение этого полиморфизма было *G(-93)T*. Частоты генотипов полиморфного маркера *G(-93)T* гена *LPL* составили: *GG* – 2%, *TT* – 95% и *GT* – 3%. Соответственно, распределение аллелей гена *LPL* было следующим: аллель *G* встречался в 3,5% случаев, аллель *T* – в 96,5%. Из-за малого числа больных – носителей генотипа *GG* и *GT*, они были объединены в одну группу сравнения с генотипом *TT* (Табл. 3).

Ассоциации с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенесших ОКС, обнаружено не было, возможно из-за низкой частоты аллеля *G* в русской популяции.

Таблица 3.

Частота генотипов полиморфного маркера *G(-93)T* гена *LPL*.

Генотип	Количество человек	Распределение частот	χ^2	<i>p</i>
<i>GG</i>	4	0,02	н/д	н/д
<i>GT</i>	6	0,03		
<i>TT</i>	192	0,95		
Всего	202	100		

1.3. Исследование ассоциации полиморфного маркера *T(-219)G* гена *APOE* с ОКС.

Аполипопротеин Е (АроЕ) играет ключевую роль в транспорте липидов. Он присутствует в обоих липопротеинах, содержащих ароВ – ЛПОНП и липопротеинах низкой плотности (ЛПНП), а так же в антиатерогенном липопротеине ЛПВП (Miettinen, 1991).

Основная функция АроЕ – участие в доставке холестерина тканям от мест его синтеза или всасывания в составе липопротеинов. Эта функция осуществляется благодаря взаимодействию данного апобелка с рецепторами ЛПНП, расположенными на мембранах гепатоцитов и клеток периферических тканей. Гепатоциты имеют также специфические рецепторы ароЕ, связанные с захватом остаточных хиломикрон и ЛПОНП, а также ЛПВП, в которых ароЕ является важным белковым компонентом. С ЛПВП ароЕ может переноситься на хиломикроны и после образования остаточных хиломикрон удалять их из циркуляции путем взаимодействия с рецепторами АроЕ. АроЕ взаимодействует с рецепторами только после воздействия липазы липопротеинов на липопротеины и удаления аполипопротеина С, который маскирует участки распознавания рецепторов.

В промоторной области гена *APOE* (19cen-q13.2) расположены три полиморфных маркера: *A(-491)T*, *C(-427)T* и *G(-219)T*, положение которых указано от начала инициации транскрипции (Artiga et al., 1998). Как было показано в этой работе, функционально важным является только один из них – полиморфный маркер *G(-219)T*.

Проведенный анализ выживаемости пациентов показал, что риск развития неблагоприятного исхода после перенесенного острого коронарного синдрома не зависит от генотипов полиморфного маркера *G(-219)T* гена *APOE* (Табл. 4 и рис. 2).

Таблица 4.

Частота генотипов полиморфного маркера *G(-219)T* гена *APOE*.

Генотип	Количество человек	Распределение частот	χ^2	<i>p</i>
<i>GG</i>	36	0,03	1,541	0,463
<i>GT</i>	1039	0,91		
<i>TT</i>	70	0,06		
Всего	1145	100		

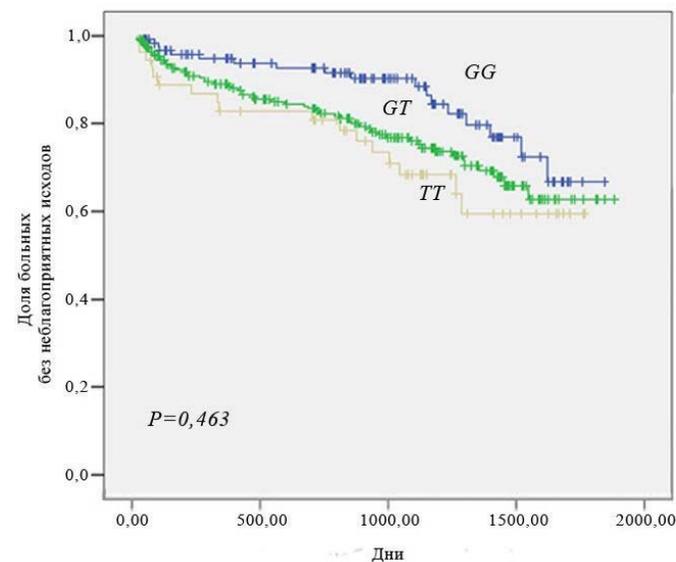


Рис. 2. Кривая выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *G(-219)T* гена *APOE*.

1.4. Исследование ассоциации полиморфного маркера *C(-516)T* гена *APOB* с ОКС.

Аполипопротеин В (АроВ) - один из основных белков, входящих в состав ЛПОНП и ЛПНП. Он является компонентом всех классов липопротеинов, с которыми связывают развитие атеросклероза, причем повышенная концентрация АроВ в плазме крови – это фактор риска ИБС и развития атеросклероза у лиц с ожирением (Lamarche et al., 1996). Аполипопротеин В необходим для синтеза и секреции хиломикрон и ЛПОНП и является основным лигандом для рецептора ЛПНП. Помимо этого, он принимает участие в транспорте холестерина и триглицеридов в составе липопротеинов.

В ряде мета-анализов было обнаружено, что наследственно определяемый уровень липидов ухудшает прогноз и риск прогрессирования ИБС в 1,5 раза (Shiffman et al., 2007), и сопоставим со значимостью таких факторов, как курение, возраст и пол. Вполне естественно, что в качестве потенциального гена-кандидата, определяющих состояние сердечно-сосудистой системы, может рассматриваться и ген аполипопротеина В (*APOB*). Ряд авторов высказывал предположение, что именно ген *APOB* может рассматриваться в качестве одного из предполагаемых маркеров развития ИБС и ее осложнений (Cumming et al., 1993; Перова и соавт., 1995).

Аполипопротеин В – один из наиболее важных структурных апобелков частиц хиломикрон и ЛПОНП. Он также играет важную роль в сборке и секреции частиц хиломикрон из тонкой кишки и ЛПОНП из печени, а также является лигандом для рецепторов, связывающих ЛПНП, таким образом опосредуя поступление холестерина внутрь клеток (Olofsson et al., 1987). Аполипопротеин В - участник сборки и секреции частиц транспортных липидов – липопротеинов (ЛП), содержащих триглицериды (ТГ), и холестерина как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Его роль также незаменима во внутрисосудистом транспорте и опосредованной рецептором элиминации различных классов липопротеинов.

Центральная роль, которую играет *APOB* в транспорте липидов, позволяет высказать предположение, что одной из основных причин различий в уровне липидов у разных индивидов, может быть именно носительство определенных аллельных вариантов гена *APOB*. В настоящее время известно более 80 полиморфных маркеров гена *APOB*, из них наиболее изучены *XbaI*, *EcoRI* и *I/D*. Однако, данные по влиянию этих полиморфных маркеров на липидные показатели и развитие ИБС противоречивы.

Нами для исследования был выбран сравнительно недавно обнаруженный полиморфный маркер *C/T* гена *APOB* в положении –516. На культуре клеток было показано, что фрагмент ДНК, содержащий аллель *T*, обеспечивает более высокий уровень экспрессии (на 30 – 40%) по сравнению с фрагментом ДНК, содержащим аллель *C* (van 't Hoof et al., 1999). Выяснилось также, что аллель *T* полиморфного маркера *C(-516)T* гена *APOB* находится почти в полном неравновесии по сцеплению с аллелем *D* полиморфного маркера *I/D* гена *APOB*.

В условиях *in vitro* было показано, что наличие генотипа *TT* данного полиморфного маркера коррелирует с повышенным синтезом частиц, содержащих ApoB в клетках печени (Ferdinand et al., 1999). В последующем, в клинических исследованиях была показана ассоциация аллеля *T* с более высокими уровнями атерогенных липидных фракций (Paulweber et al., 1991), коронарной болезнью сердца (Ferdinand et al., 1999) и атеросклеротическим поражением сонных артерий (Sposito et al., 2004).

Ван'т Хоофт и соавт. (1999) обнаружили ассоциацию полиморфного маркера *C(-516)T* гена *APOB*, расположенного в промоторной области гена, с повышенной базальной транскрипцией гена и повышенным уровнем ЛПНП. У здоровых гомозиготных носителей аллеля *T* отмечалось увеличение содержания холестерина ЛПНП на 12% в сравнении с здоровыми гомозиготными носителями аллеля *C*. В этой работе было показано влияние этого полиморфного маркера не только на изменение уровня липидов в сыворотке крови, но и на уровень заболеваемости ИБС. Частота аллеля *T* оказалась выше у молодых больных, перенесших ИМ, в сравнении со здоровыми добровольцами контрольной группы.

Спозито и соавт. (2004) обследовали 326 больных с низким риском сердечнососудистых заболеваний (больные без артериальной гипертензии и сахарного диабета). У гомозиготных носителей аллеля *T* был обнаружен более высокий уровень ApoB и ЛПНП в плазме по сравнению с гетерозиготными носителями. Все эти данные говорят о том, что полиморфный маркер *C(-516)T* гена *APOB* ассоциирован с концентрацией атерогенных липопротеинов в сыворотке крови. Несмотря на ожидания, полиморфный маркер *C(-516)T* гена *APOB* не показал ассоциации с выживаемостью больных, перенесших обострение ИБС (Табл. 5 и рис. 3).

Таблица 5.

Частота генотипов полиморфного маркера *C(-516)T* гена *APOB*.

Генотип	Количество человек	Распределение частот	χ^2	<i>p</i>
<i>CC</i>	630	0,55	0,059	0,971
<i>CT</i>	404	0,35		
<i>TT</i>	111	0,10		
Всего	1145	100		

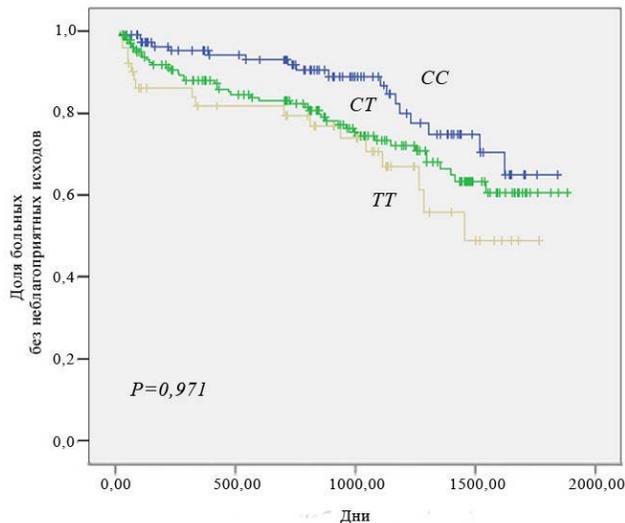


Рис. 3. Кривая выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *C(-516)T* гена *APOB*.

1.5. Исследование ассоциации полиморфного маркера *G(-455)A* гена *FGB* с ОКС.

Фибриноген является независимым фактором риска развития ИБС (Lee, 1993; Heinrich, 1994; Ernst, 1990) и ИМ (Ma, 1999). Возможно, это объясняется участием фибриногена в регуляции вязкости крови и влиянии на скорость кровотока, особенно в стенозированных участках артерий (Wong, 1996.). Кроме того, фибриноген может влиять на накопление внеклеточных липидов в фиброзных бляшках (Smith, 1994), а так же участвует в процессе агрегации тромбоцитов, взаимодействуя с гликопротеидами IIb/IIIa мембраны активированных тромбоцитов. Уровень фибриногена в крови влияет на способность тромбоцитов к агрегации (Landolfi, 1991).

Низкий уровень фибриногена ассоциируется с низким коронарным риском, даже если содержание общего холестерина или холестерина в составе ЛПНП при этом высокое. Содержание фибриногена увеличивается при воспалительных процессах, это чувствительный маркер воспаления и некроза тканей.

На уровень этого белка влияют возраст, беременность, прием пероральных контрацептивов, менопауза, ожирение. Курение, инфекции, АГ и СД ассоциированы с повышением уровня фибриногена, в то время как физическая активность, умеренное употребление алкоголя, употребление рыбы в пищу, напротив, снижают уровень этого

белка (Folsom et al., 1993). Уровень фибриногена влияет на агрегацию тромбоцитов, вязкость крови и повреждение эндотелиальных клеток, как раз тех механизмах, которые играют существенную роль в развитии атеросклероза, артериального и венозного тромбозов (Libby et al., 2001; Ross et al., 2001).

Уровень фибриногена выше у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в сравнении с больными без заболевания (Stec et al., 2000), так же как и у больных с обострением ИБС, чем у больных со стабильным течением заболевания (Панченко и др., 1999). По данным российского популяционного исследования высокий уровень фибриногена ассоциируется с тенденцией к повышению заболеваемости ИМ (Ратникова и др., 2010). Известно, что повышение уровня фибриногена в плазме ассоциируется с увеличением риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, о чем свидетельствуют результаты крупных мета-анализов (Ernst et al., 1993; Maresca et al., 1999). Повышение уровня фибриногена свидетельствует о высоком риске повторного ИМ и смерти у больных, перенесших ИМ.

Ген *FGB*, кодирующий β -цепь фибриногена, несомненно может рассматриваться в качестве одного из важных генов-кандидатов, так как фибриноген служит субстратом для тромбина, и в результате его протеолитического расщепления образуется фибриновый сгусток. Фибриноген играет важную роль и в процессе агрегации тромбоцитов, то есть он относится к одному из основных факторов, обуславливающих вязкость плазмы крови (Meade et al., 1986).

В промоторной области гена *FGB* в положении -455 обнаружен однонуклеотидный полиморфизм G/A. Существенно то, что полиморфный маркер *G(-455)A* гена *FGB* ассоциирован с уровнем фибриногена в плазме крови, а наличие аллеля *A* в положении -455 определяет повышенный уровень транскрипции гена *FGB* (van 't Hooft et al., 1999).

В нашей работе полиморфный маркер *A(-455)G* гена *FGB* не показал ассоциации с выживаемостью больных, перенесших обострение ИБС. У больных – носителей разных генотипов этого полиморфного маркера, частоты развития неблагоприятного исхода не различались (Табл. 6 и рис. 4).

Таблица 6.

Частота генотипов полиморфного маркера *A(-455)G* гена *FGB*.

Генотип	Количество человек	Распределение частот	χ^2	<i>p</i>
<i>AA</i>	105	0,09	1,287	0,525
<i>AG</i>	343	0,30		
<i>GG</i>	697	0,61		
Всего	1145	100		

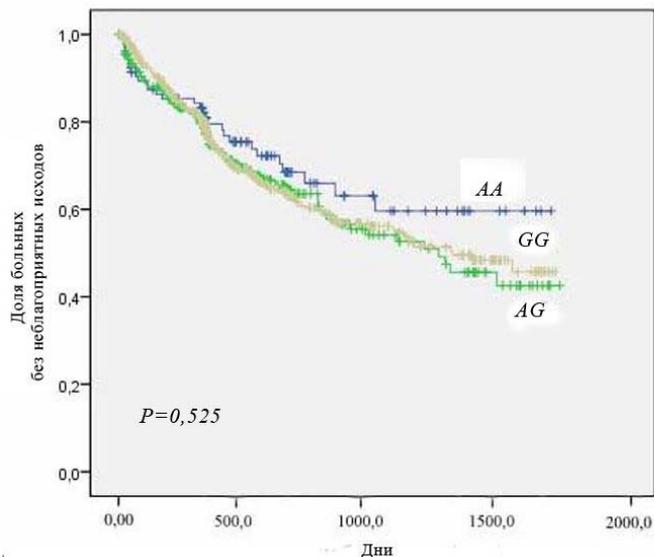


Рис. 4. Кривая выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *G(-455)A* гена *FGB*.

Полученные нами результаты работы вступают в определенное противоречие с нашими предыдущими данными (Затейщиков и соавт., 2004; Затейщиков, 2005), в которых было показано, что полиморфный маркер *G(-455)A* гена *FGB* ассоциирован с развитием ишемического инсульта у русских, с риском инсульта и его частотой у больных гипертонией или у курильщиков. По всей видимости, такие результаты были получены из-за относительно небольшой выборки и непродолжительного времени наблюдения за больными, что еще раз подтверждает актуальность настоящей работы, где использована большая группа пациентов с длительным сроком наблюдения.

1.6. Исследование ассоциации полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* с ОКС.

Белок С является предшественником сериновой протеиназы. Активированный белок С выполняет функции антикоагулянта. Он инактивирует факторы свертывания Va и VIIIa путем их ограниченного протеолиза и таким образом подавляет образование тромбов и воспалительные реакции. Важная роль белка С в регуляции гемостаза подтверждается множеством клинических наблюдений, свидетельствующих

о том, что наследственный дефицит белка С ведет к развитию тромбозов различной степени тяжести уже в молодом возрасте.

Также показано, что белок С вызывает увеличение концентрации тканевого активатора плазминогена, за счет нейтрализации его ингибитора. Таким образом, под действием белка С происходит сдвиг равновесия между тканевым активатором плазминогена и ингибитором активатора плазминогена типа 1 в сторону активатора, что приводит к увеличению фибринолитической активности крови (Сидоркина, 2001). Кроме того, активированный белок С участвует в регуляции воспалительного процесса, ингибируя продукцию цитокинов макрофагами (Miyama, 1999). Таким образом, белок С играет важную роль в регуляции гемостаза.

Отмечено, что активность белка С может различаться даже в пределах одной семьи. Это может быть связано, в том числе, и с уровнем экспрессии гена. По всей видимости, предшествующие участку инициации транскрипции полиморфные маркеры ассоциированы с уровнем экспрессии данного гена, уровнем белка С в плазме крови и вследствие этого со скоростью развития сердечно-сосудистых патологий.

В промоторной области кодирующего белок С гена *PROC*, расположенного на хромосоме 2q13-q14, обнаружено несколько полиморфных маркеров: *C(-1654)T*, *A(-1641)G* и *A(-1476)T*. Данных об этих полиморфных маркерах гена *PROC* в литературе совсем немного. Впервые они были изучены Спеком и соавт. в 1995 году. В работе была изучена ассоциация полиморфных маркеров *C(-1654)T*, *A(-1641)G* и *A(-1476)T* гена *PROC* с уровнем белка С, а также с риском венозных тромбозов.

В другом крупном исследовании, проведенном по принципу «случай»–«контроль», изучалась ассоциация венозных тромбозов с полиморфными маркерами *C(-1654)T* и *A(-1641)G* гена *PROC*. Гаплотип *CG* оказался связанным с более высоким риском тромбозов, в то время как носители гаплотипа *TA* имели пониженный риск у молодых лиц (в возрасте моложе 45 лет) (Aiach et al., 1999).

Махмуди и соавт. в 2008 году обследовали 552 пациента из 84 неродственных семей. У 39% больных, принявших участие в исследовании, отмечался дефицит белка С. Выяснилось, что риск тромбоза артерии у больных до 55 лет с дефицитом этого белка повышен в 6,9 раз в сравнении с людьми без этого дефекта.

Определение нами частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* также показало, что распределение частот генотипов этого гена в нашей группе больных (*CC* – 33,9%, *CT* – 51,3%, *TT* – 10,6%) существенно отличается от распределения в контрольных европейских популяциях (База данных dbSNP) и не

соответствует равновесию Харди-Вайнберга (Табл. 7). По всей видимости, это связано с тем, что нашу группу больных нельзя рассматривать как случайную выборку, фактически в ней собраны индивиды, изначально предрасположенные к развитию ССЗ. К тому же следует отметить, что в эту группу не вошла значительная часть индивидов со сходным типом предрасположенности к ССЗ и близкого возраста, умерших до времени формирования выборки.

Анализ времени дожития до конечной точки у носителей различных генотипов полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* показал, что носители генотипов *TT* и *CT* за период наблюдения чаще имели неблагоприятный исход, чем гомозиготные носители аллеля *C* (Рис. 5). Время дожития до конечной точки составило $2,19 \pm 0,18$ г. против $2,46 \pm 0,16$ г. ($\chi^2 = 6,8, p = 0,031$).

Таблица 7.

Частота генотипов полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC*.

Генотип	Количество человек	Распределение частот	χ^2	<i>p</i>
<i>CC</i>	407	0,36	6,8	0,031
<i>CT</i>	612	0,53		
<i>TT</i>	126	0,11		
Всего	1145	100		

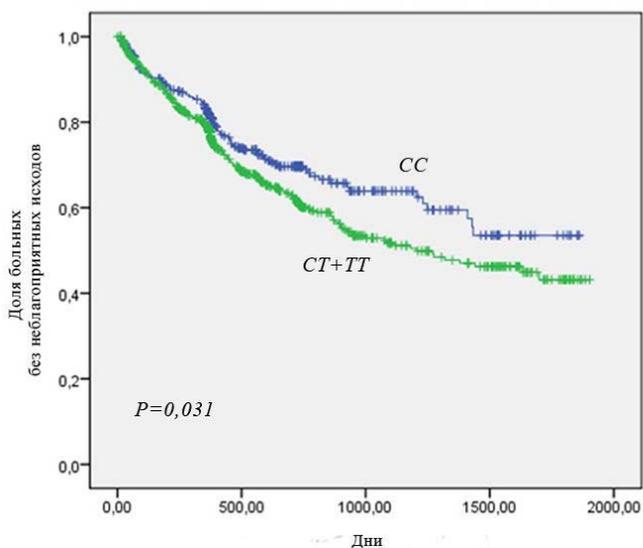


Рис.5. Кривая выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC*.

Результаты нашей работы вступают в некоторое противоречие с данными работы (Spek et al., 1995), в которой показано, что гаплотип *CC/GG/TT* полиморфных маркеров *C(-1654)T*, *A(-1641)G* и *A(-1476)T* гена *PROC* ассоциирован с более низким уровнем белка *C* в плазме крови и, как следствие, с повышенным риском развития венозных тромбозов. По всей видимости, это противоречие может быть объяснено тем, что два других полиморфных маркера – *A(-1641)G* и *A(-1476)T*, использованные в работе, не сцеплены с маркером *C(-1654)T* и, следовательно, в ассоциативных исследованиях должны рассматриваться независимо.

Как показано на рисунке 6, у мужчин, имеющих генотип *CC*, выявлена более сильная ассоциация с положительным клиническим исходом после эпизода обострения ИБС, по сравнению с женщинами, имеющими генотип *CC*. Для других генотипов, использованных в работе, даже после разделения больных на группы мужчин и женщин, связи между генотипами полиморфных маркеров и дожитием до конечной точки выявлено не было.

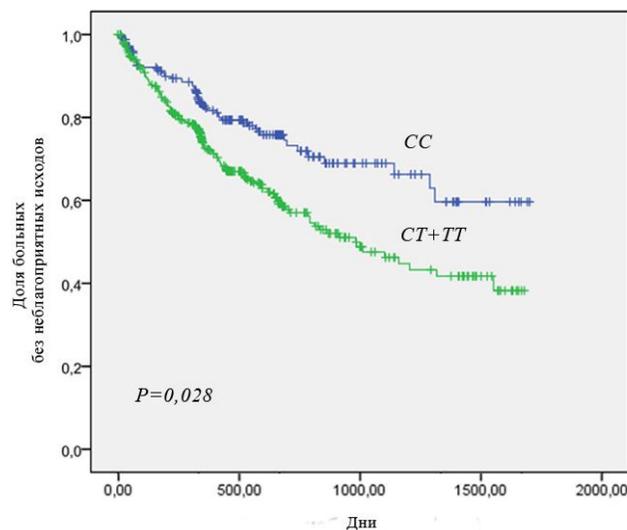


Рис. 6. Кривая выживаемости мужчин с различными генотипами полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC*.

Кроме того, нами было показано, что и в случае «коронарных» неблагоприятных исходов носители генотипов *TT* и *CT* за период наблюдения чаще имели неблагоприятный исход, чем гомозиготные носители аллеля *C* (данные не показаны).

Таким образом, полиморфный маркер *C(-1654)T* гена *PROC* ассоциирован с повышенным риском развития «любого» неблагоприятного исхода в группе больных, перенесших эпизод обострения ИБС, со смертностью, а также риском развития «коронарного» неблагоприятного исхода, что свидетельствует в пользу необходимости внедрения генетического тестирования больных ИБС для выявления лиц, имеющих максимальную предрасположенность к развитию неблагоприятных исходов, и указывает возможное направление разработки новых лекарственных средств.

ВЫВОДЫ.

1. Определены частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров *T(-219)G* гена *APOE*, *C(-516)T* гена *APOB*, *Ser447Ter* и *T(-93)G* гена *LPL*, *G(-455)A* гена *FGB* и *C(-1654)T* гена *PROC* в группе больных, перенесших острый коронарный синдром. Для полиморфных маркеров генов *LPL*, *APOE*, *APOB* и *FGB* показано отсутствие ассоциации с развитием неблагоприятных исходов после эпизода ОКС.
2. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* с неблагоприятными исходами в группе больных, перенесших острый коронарный синдром. Установлено, что носители генотипов *CT* и *TT* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск, в то время как носители генотипа *CC* имеют пониженный риск развития неблагоприятного исхода.
3. Носительство генотипов *CT* и *TT* полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* у больных, перенесших острый коронарный синдром, достоверно ассоциировано с развитием как «любого» неблагоприятного исхода, так и со смертностью и риском развития «коронарного» неблагоприятного исхода.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Закирова, В.Б., Бровкин, А.Н., Галева, З.М., Никитин, А.Г., Галявич, А.С., Агапкина, Ю.В., Евдокимова, М.А., Якунина, Н.Ю., Осмоловская, В.С., Асейчева, О.Ю., Носиков, В.В., Затеищиков, Д.А. (2008) Генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных после острого коронарного синдрома. *Кардиология*, 48(11), 13-18.
2. Агапкина, Ю.В., Никитин, А.Г., Бровкин, А.Н., Пушков, А.А., Евдокимова, М.А., 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., Кательницкая, Л.И., Хоролец, Е.В., Шлык, С.В., Волкова, Э.Г., Маргарян, М.П., Гузь, И.О., Константинов, В.О., Тимофеева, И.В., Сидоренко, Б.А., Затеищиков, Д.А., Носиков, В.В. (2010). Полиморфные маркеры *G(-455)A* гена *FGB* и *C(-1654)T* гена *PROC* и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром. *Молекулярная биология*, 44(4), 613-619.

3. Zateyshchikov, D.A., Brovkin, A.N., Evdokimova, M.A., Nikitin, A.G., Kudrjachova, O.Yu., Minushkina, L.O., Osmolovskaja, V.S., Agapkina, Yu.V., Nosikov, V.V. Promoter polymorphism of protein C gene associated with unfavorable outcomes in patients after acute coronary syndrome: results of multicenter study based on 1143 Russian patients. Abstracts of the Fourth "Biologie Prospective" Santorini Conference "Functional Genomics Variations towards Personalized Health Care", p.A145, Santorini Island, Greece (September 21 - 23, 2008).
4. Евдокимова, М.А., Минушкина, Л.О., Кочкина, М.Ю., Панфилова, Е.Ю., Резниченко, Н.Е., Носиков, В.В., Агапкина, Ю.В., Сидоренко, Б.А., Затеищиков, Д.А. Полиморфизм гена протеина С, но не NT-proBNP ассоциирован с течением ИБС у больных, перенесших острый коронарный синдром. Материалы конференции Российского национального конгресса кардиологов "Повышение качества и доступности кардиологической помощи", стр. 126, Москва, Россия (07 - 09 октября 2008 г.).
5. Бровкин, А.Н., Благодатских, К.А., Минушкина, Л.О., Агапкина, Ю.В., Никитин, А.Г., Затеищиков, Д.А., Носиков, В.В. Генетическая предрасположенность к ишемической болезни сердца: ассоциация генов, продукты которых регулируют синтез холестерина и его метаболизм. Материалы конференции Российского национального конгресса кардиологов "Кардиология: реалии и перспективы", стр. 55, Москва, Россия (06 - 08 октября 2009 г.).