

*На правах рукописи*



**ПУШКОВ АЛЕКСАНДР АЛЕКСЕЕВИЧ**

**ПОЛИМОРФНЫЕ МАРКЕРЫ РЯДА ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И  
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К НЕБЛАГОПРИЯТНОМУ  
ТЕЧЕНИЮ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ  
ОСТРЫЙ КОРОНАРНЫЙ СИНДРОМ.**

**03.01.03 – молекулярная биология**

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

**Москва – 2011**

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  
ФГУП «ГосНИИ генетика», г. Москва

Носиков Валерий Вячеславович

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор  
Институт молекулярной генетики  
РАН, г. Москва

Сломинский Петр Андреевич

Доктор медицинских наук,  
ФГУ НИИ физико-химической  
медицины ФМБА, г. Москва

Явелов Игорь Семенович

**Ведущая организация**

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

Защита состоится «    » декабря 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, д. 1.

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

Реферат разослан «    » ноября 2011 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Т. Л. Воюшина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) — полигенное, многофакторное заболевание, являющееся наиболее частой причиной смерти среди мужчин старше 45 лет и женщин старше 65 лет во многих странах Европы, в том числе и в России. Больной, перенесший обострение ИБС, попадает в группу высокого риска повторения эпизода обострения. Предотвращение этих заболеваний представляет одну из основных задач, как практической медицины, так и медицинской науки (Оганов и соавт., 2008).

Известно, что сердечно-сосудистые патологии – многофакторные заболевания с многочисленными звеньями патогенеза. Для таких заболеваний характерен сложный механизм формирования фенотипа, в основе которого лежит взаимодействие генетических факторов с факторами внешней среды. При этом для каждого конкретного заболевания можно выделить группу, так называемых, генов-кандидатов, продукты которых могут быть прямо или косвенно вовлечены в развитие данной патологии (Goldbourt et al., 1994).

Генетическую предрасположенность к тому или иному заболеванию чаще всего изучают по принципу “случай-контроль”. Однако для многих исследований этого типа достаточно сложно бывает подобрать правильную контрольную группу, поскольку, во-первых, невозможно бывает выявить доклинические формы проявления заболевания, а во-вторых, учитывать всех умерших к моменту начала обследования. Этим недостатком лишены так называемые проспективные исследования, в которых осуществляется длительное наблюдение за большими группами лиц, входящих в группу риска, с регистрацией «конечных точек» исхода заболевания.

Поскольку нарушения функции системы гемостаза, приводящие к тромбообразованию, являются важным звеном в формировании патогенеза ишемической болезни сердца (Сидоренко и соавт., 2008), гены, кодирующие белковые компоненты этой системы, можно рассматривать как гены-кандидаты, ассоциированные с обострением ИБС, и эти гены совершенно необходимо включать в проспективные исследования.

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 (Gibbons et al., 2004).

**Цель и задачи работы.** Целью данной работы было изучение ассоциации полиморфных маркеров генов-кандидатов, продукты которых являются белковыми

компонентами системы гемостаза, 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 факторы свертывания крови V (*F5*) и VII (*F7*), белок С (*PROC*), тромбомодулин (*THBD*) и ингибитор активатора плазминогена типа 1 (*PLANHI*).
2. Провести сравнительный анализ времени дожития до конечных точек у больных, перенесших острый коронарный синдром, - носителей различных генотипов полиморфных маркеров выбранных генов-кандидатов для выявления вклада генетических факторов в развитие неблагоприятных исходов.

### **Научная новизна работы.**

- В данной работе впервые исследована ассоциация полиморфных маркеров *Arg506Gln* и *G5393A* гена *F5*, *Arg353Gln* гена *F7*, *C(-2676)T* гена *PROC*, *Ala455Val* гена *THBD* и *4G(-675)5G* гена *PLANHI* с развитием острого коронарного синдрома.
- Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе женщин, перенесших острый коронарный синдром. Установлено, что носительство генотипов *GA* и *AA* полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* независимо связано с наступлением таких неблагоприятных исходов как нефатальный и фатальный инфаркт миокарда (ИМ), а также нефатальный и фатальный инсульт.
- Обнаружена сочетанная ассоциация комбинации генотипов полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* и *Ala455Val* гена *THBD* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе женщин, перенесших острый коронарный синдром.

**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 полиморфных маркеров *G5393A* гена *F5*, *Arg353Gln* гена *F7* и *Ala455Val* гена *THBD* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе женщин, 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 «ГосНИИ генетика» 26 октября 2011 г. Материалы работы были представлены на X-ой ежегодной

международной молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗЫ «Биохимическая физика» (г. Москва, Россия, 8-10 ноября 2010 г.); 79-ом съезде Европейского Атеросклеротического общества (г. Гетеборг, Швеция, 26-29 июня 2011); II-ой международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (г. Донецк, Украина, 19-22 сентября 2011 г).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, включая 3 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 127 страницах машинописного текста и содержат 8 таблиц и 15 рисунков. В работе процитированы 185 зарубежных и 23 отечественных литературных источника.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1.1. Формирование групп больных. Характеристика и критерии включения.

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 2004 г. по август 2010 г. В исследование включены больные (всего 1145 человек), поступившие в стационар в связи с развитием ОКС (Табл. 1). Больные, у которых в результате ОКС не сформировался инфаркт миокарда 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, тропонина).

Идентификацию аллелей полиморфных маркеров проводили с помощью гибридизационно-флуоресцентного анализа (TaqMan® анализ)

**Таблица 1.**

Характеристика группы больных, перенесших острый коронарный синдром.

Показатель	Группа больных
Пол (М/Ж)	717 / 428
Конечные точки	452
Возраст, лет*	61,36 ± 11,70
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.

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

#### 1.2.1. Исследование ассоциации полиморфного маркера *Arg506Gln* гена *F5* с ОКС.

Фактор свертывания крови V является независимым от витамина K гликопротеином и играет ключевую роль в коагуляционном каскаде. Активация фактора V происходит за счет его специфического расщепления тромбином с образованием фактора Va (Mann and Kalafatis, 2003), активность которого ингибируется в свою очередь за счет ограниченного протеолиза тяжелой цепи фактора Va активированным белком C, выполняющим роль антикоагулянта (Dahlbäck and Villoutreix, 2005). Протеолиз фактора Va начинается с расщепления по остатку Arg в положении 506, затем по остаткам Arg в положениях 306 и 679. Инактивация наступает после расщепления по остатку Arg в положении 306 (на этой стадии утрачивается до 90% активности), при этом белок S, выступающий в роли кофактора активированного белка C, значительно ускоряет скорость данной реакции (Norstrom et al., 2003). Таким образом, какие либо изменения в области этих участков расщепления, происходящие в том числе и на генетическом уровне, могут играть ключевую роль в регуляции процессов гемостаза.

Ген фактора V расположен на хромосоме 1q23. В настоящее время в гене фактора V обнаружен целый ряд функционально значимых полиморфных маркеров.

Как было показано в ряде работ, причиной устойчивости к действию активированного белка С может быть однонуклеотидный полиморфизм *G/A* в положении 1691 в гене *F5* (Bertina et al., 1994). Данному полиморфному маркеру, получившему название “Лейденовская мутация”, соответствует аминокислотная замена Arg→Gln в положении 506 полипептидной цепи. Частота данной мутации составляет от 1 до 7% в европейской популяции. Около 95% пациентов с устойчивостью к действию активированного белка С – это носители “Лейденовской мутации” (Tsongalis and Rezuке, 1997), однако, согласно недавно проведенным исследованиям, в европейской популяции имеется достаточно большой процент людей, устойчивых к действию активированного белка С, у которых данная мутация не выявлена (Tosetto et al., 2004).

Накоплено большое количество данных по ассоциации “Лейденовской мутации” с венозными тромбозами (Tans et al., 2003). Однако работ, посвященных ассоциации данного полиморфного маркера с развитием артериальных тромбозов и других сердечно-сосудистых патологий, имеется значительно меньшее количество, а их результаты носят противоречивый характер (Ridker et al., 1995; Mannucci et al., 2010).

Кроме того, большинство работ до настоящего времени проводилось с использованием подхода «случай-контроль», который имеет определенные ограничения при формировании контрольных групп пациентов. Таким образом, основываясь на имеющихся результатах, можно сделать вывод о необходимости проведения длительного проспективного исследования для выяснения индивидуальной роли данного полиморфного маркера в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

Нами были определены частоты генотипов полиморфного маркера *Arg506Gln* гена *F5* у всех пациентов (Табл. 2).

**Таблица 2.**

Частоты генотипов полиморфного маркера *Arg506Gln* гена *F5* у больных, перенесших ОКС.

Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>Arg/Arg</i>	1069	93,4
<i>Arg/Gln</i>	76	6,6
<i>Gln/Gln</i>	0	0
Всего	1145	100

Частоты аллелей в изучаемой нами группе больных были близки к частотам, наблюдаемым у европейцев. Среди исследуемых пациентов нами не было обнаружено ни одного носителя «Лейденовской мутации» в гомозиготной форме. Проведенный

нами анализ выживаемости пациентов показал, что риск развития неблагоприятного исхода после перенесенного острого коронарного синдрома не зависит от генотипов полиморфного маркера *Arg506Gln* гена *F5*. Эти результаты можно объяснить малым числом пациентов, носителей аллеля *Gln*, и отсутствием пациентов с генотипом *Gln/Gln*. Можно предположить, что носители данного генотипа не попали в нашу выборку по причине наступления неблагоприятного исхода еще до начала исследования. У тех же носителей «Лейденовской» мутации, которые были включены в наше исследование, развитие неблагоприятных исходов связано с другими патофизиологическими механизмами.

### 1.2.2. Исследование ассоциации полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* с ОКС.

Полиморфный маркер *G5393A* (rs7542281) расположен в интроне 3 гена *F5*. Ранее была показана ассоциация данного полиморфного маркера с неблагоприятным течением ИБС на популяции финнов (Auro et al., 2007).

Частоты генотипов полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* были определены нами у всех пациентов (Табл. 3). Ассоциации с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенесших ОКС, обнаружено не было.

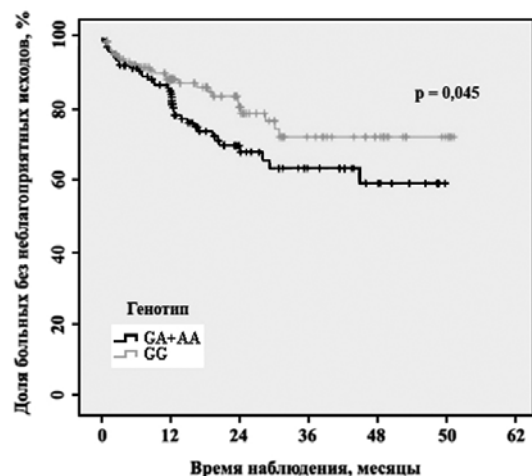
Таблица 3.

Частота генотипов полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* у больных, перенесших ОКС.

Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>GG</i>	576	50,4
<i>GA</i>	480	41,9
<i>AA</i>	89	7,8
Всего	1145	100

При проведении проспективных исследований с использованием «конечных точек» необходимо учитывать влияние полового диморфизма на патогенез развития заболевания (Silander et al., 2008). Так, в проведенном нами ранее проспективном исследовании, была выявлена ассоциация полиморфного маркера *C(-1654)T* гена *PROC* с неблагоприятными исходами в группе больных, перенесших острый коронарный синдром, при этом более сильная ассоциация наблюдалась в группе мужчин (Агапкина и соавт., 2010).

Принимая во внимание данные результаты, дальнейшее исследование ассоциации полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* с риском развития НИ проводили с разделением пациентов на группы по половому признаку.



**Рис. 1.** График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у женщин носителей генотипов *GG* и *GA+AA* полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

Анализ времени дожития до конечной точки у носителей различных генотипов полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* показал, что в группе женщин носителей генотипов *GA* и *AA* за период наблюдения чаще наблюдался неблагоприятный исход (фатальный и нефатальный ИМ, фатальный и нефатальный инсульт), чем в группе гомозиготных носителей аллеля *G*. Время дожития до конечной точки составило 42,7 месяцев (95% CI 38,0-47,5) против 49,5 месяцев (95% CI 45,1-53,9) ( $\chi^2 = 4.15$   $p = 0.045$ ) (Рис. 1). В группе мужчин данной ассоциации обнаружено не было, у носителей разных генотипов частоты развития неблагоприятных исходов не отличались.

Таким образом, полученные нами данные об ассоциации полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* с риском развития НИ в группе женщин, перенесших ОКС, согласуются с данными европейских исследований и подтверждают важную роль полового диморфизма в патогенезе развития ИБС, а также свидетельствуют в пользу необходимости внедрения генетического тестирования больных ИБС для выявления лиц, имеющих максимальную предрасположенность к развитию неблагоприятных исходов.

### 1.2.3. Исследование ассоциации полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* с ОКС.

Фактор VII (проконвертин) представляет собой гликопротеин, зависимый от витамина К. Активная форма фактора VII – это сериновая протеаза, первый фермент в каскаде свёртывания крови по «внутреннему пути» (Долгов и Свиринов, 2005). Активация данного пути играет ключевую роль в процессе гемостаза, в связи с чем,

повышенная концентрация фактора VII может способствовать развитию тромботических событий (Зубаиров и соавт., 2000), при этом на концентрацию фактора VII в крови влияют как генетические факторы, так и приобретённые состояния.

Ген *F7*, кодирующий фактор свертывания VII, расположен на хромосоме 13q34. Проведены обширные исследования по выяснению роли гена *F7* в патогенезе ИБС. Обнаружена ассоциация нескольких полиморфных маркеров гена *F7* с уровнем фактора VII в плазме крови. Из них наиболее изучен полиморфный маркер *G/A* в положении 10976 (*rs6046*), которому соответствует аминокислотный полиморфизм *Arg/Gln* в положении 353 полипептидной цепи. Этот полиморфный маркер расположен в области, кодирующей каталитический домен фактора VII, и, по некоторым данным, у носителей аллеля *Gln* ниже риск развития неблагоприятного течения ИБС. Тем не менее, проведенные на различных популяциях исследования возможной ассоциации данного полиморфного маркера с сердечно-сосудистыми заболеваниями носят противоречивый характер. Так, Джирелли с соавт. (2000) было обнаружено, что аллель *Gln* ассоциирован с уменьшением риска развития ИМ. В китайской популяции при сравнении группы больных ИБС с контрольной группой ассоциация данного полиморфного маркера с ИБС не была обнаружена, в том числе и при разбиении групп по половому признаку. Частота аллеля *Gln* была выше в группе больных ИБС по сравнению с группой больных с ИБС и ИМ (Xu et al., 2003). Однако, при исследовании небольшой выборки пожилых пациентов с ИБС и контрольной здоровой группы было показано, что уровень фактора VII в плазме крови достоверно различался между двумя группами. При этом он был значительно ниже у носителей аллеля *Gln* (Lu et al., 2005). Среди 139 семей с ИБС в анамнезе, проживающих на территории Индии, пониженный уровень фактора VII в плазме крови положительно коррелировал с носительством аллеля *Gln* (Shanker et al., 2009) Такие же данные были получены среди новорожденных детей в нескольких популяциях, проживающих в Сингапуре (Quek et al., 2006).

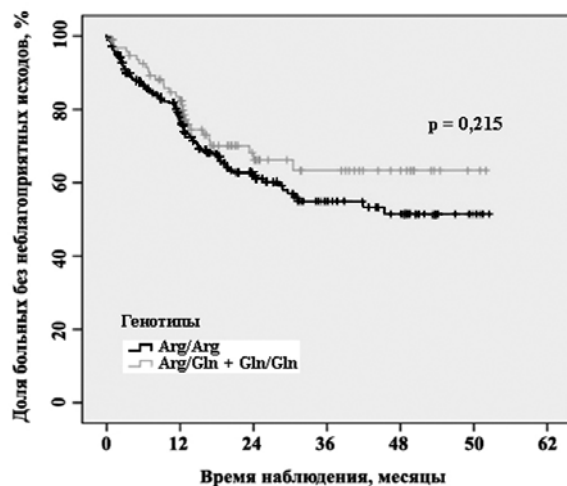
Частоты генотипов полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* были определены нами у всех пациентов (Табл. 4). Ассоциации с развитием неблагоприятных исходов у больных, перенесших ОКС, обнаружено не было. Принимая во внимание половой диморфизм подверженности ИБС, дальнейшее исследование проводили с разделением пациентов на группы по половому признаку. При этом в группе женщин нами была выявлена тенденция к увеличению числа неблагоприятных исходов у носителей генотипа *Arg/Arg* полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* ( $p = 0,215$ ) (Рис. 2). В группе мужчин подобной тенденции не наблюдалось, у носителей разных генотипов частоты развития неблагоприятных исходов не отличались. Эти данные подтверждают полученные ранее результаты об ассоциации аллеля *Gln* полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* с пониженным риском развития неблагоприятного течения ИБС (Girelli et al., 2000; Lane et al., 1996).

Возможно, у носителей аллеля *Gln* понижен уровень удельной активности фактора VII в плазме крови, а также имеет место некоторое снижение его секреции, что было обнаружено в ряде исследований (Ghaddar et al., 1998; Kathiresan et al., 2006).

**Таблица 4.**

Частота генотипов полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* у больных, перенесших ОКС.

Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>Arg/Arg</i>	887	77,5
<i>Arg/Gln</i>	238	20,8
<i>Gln/Gln</i>	19	1,7
Всего	1145	100



**Рис. 2.** График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у женщин носителей генотипов *Arg/Arg* и *Arg/Gln+Gln/Gln* полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

#### 1.2.4. Исследование ассоциации полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* с ОКС.

Тромбомодулин - интегральный гликопротеин мембран клеток, участвующий в связывании тромбина. Тромбомодулин является ключевым звеном серии реакций, регулирующих направление и скорость процессов гемостаза (Dittman and Majerus, 1990).

Ген тромбомодулина расположен на хромосоме 20p11.2. Обнаружена ассоциация нескольких полиморфных маркеров гена *THBD* с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из них является полиморфный маркер *C/T* в положении 1578 (rs1042579), которому соответствует аминокислотный полиморфизм *Ala/Val* в положении 455 полипептидной цепи. Данные об ассоциации этого полиморфного маркера с развитием ИБС, имеющиеся в настоящее время, неоднозначны (Wu et al., 2001; Сидоренко и соавт., 2006). Ряд исследований, проведенных по типу случай-контроль, выявили ассоциацию аллеля *Val* с ИМ, в том числе и его манифестацией в раннем возрасте, при этом генетическая составляющая вносила наибольший вклад в случае пациентов-курильщиков, а также в группе афроамериканцев (Konstantoulas et al., 2004).

Однако функциональное значение данного полиморфизма остается не до конца ясным, поскольку он не влияет на уровень тромбомодулина в плазме крови, что было показано в исследованиях в условиях *in vivo* (Nakabayashi et al., 1999). Возможно, наличие остатков аланина или валина в положении 455 полипептидной цепи молекулы тромбомодулина, в домене EGF-6, непосредственно связывающем тромбин, приводит к различиям в пространственной ориентации последнего на поверхности эндотелия, что в свою очередь изменяет скорость активации белка С (Aleksic et al., 2003; Yang et al., 2003).

Нами были определены частоты генотипов полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* у всех пациентов (Табл. 5).

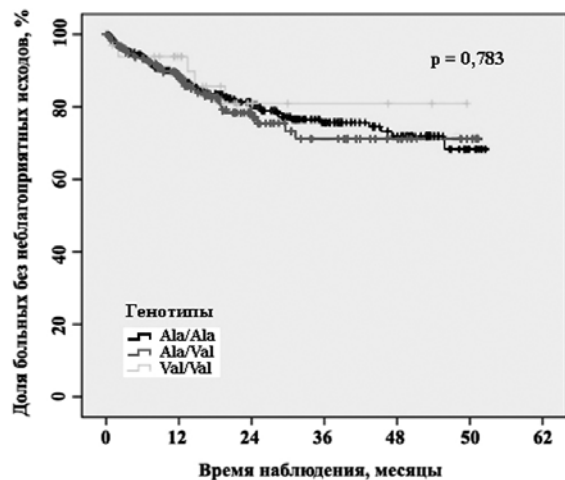
**Таблица 5.**

Частоты генотипов полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* у больных, перенесших ОКС.

Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>Ala/Ala</i>	740	64,6
<i>Ala/Val</i>	365	31,9
<i>Val/Val</i>	40	3,5
Всего	1145	100

Проведенный анализ выживаемости пациентов показал, что риск развития неблагоприятного исхода после перенесенного острого коронарного синдрома не зависит от генотипов полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD*. Кривые выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* существенно не различались (Рис. 3). При разделении пациентов на группы по половому признаку, в группе женщин наблюдалась слабая тенденция к увеличению числа НИ у носителей аллеля *Val*.

Полученные нами данные об отсутствии статистически значимой ассоциации генотипов полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* с риском развития НИ согласуются с данными, полученными в ряде европейских проспективных исследований (Augo et al., 2007). Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что полиморфный маркер *Ala455Val* гена *THBD* не имеет индивидуального прогностического значения в оценке риска развития неблагоприятных исходов у больных, перенесших обострение ИБС. Для проведения дальнейших исследований наиболее целесообразен комплексный подход с использованием комбинации генотипов других полиморфных маркеров гена *THBD*.



**Рис.3.** График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей различных генотипов полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

#### 1.2.5. Исследование сочетанной ассоциации полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* и полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* с ОКС.

Важную прогностическую роль в проспективных исследованиях с использованием «конечных точек» может играть изучение совместного влияния комбинации генотипов нескольких полиморфных маркеров. Данный подход широко применяется как в современных зарубежных исследованиях (Augo et al., 2007), так и в России. Наши последние данные, полученные в результате длительного проспективного исследования на группе больных, перенесших обострение ИБС, выявили значительную сочетанную ассоциацию комбинаций генотипов полиморфных

маркеров генов, продукты которых участвуют в регуляции воспаления, с развитием НИ (Благодатских и соавт., 2011).

Основываясь на этих данных, в проведенном нами многоцентровом проспективном исследовании был применен комплексный подход с использованием комбинаций генотипов исследуемых полиморфных маркеров. Поскольку тенденция к изменению числа НИ в зависимости от генотипов как полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7*, так и полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* наблюдалась нами только в группе женщин, дальнейшее исследование проводили, учитывая эти результаты. Исследовалось две группы женщин. В первую были включены носители генотипов *Ala/Val* и *Val/Val* полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* и генотипа *Arg/Arg* полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7*, во вторую группу носители генотипа *Ala/Ala* полиморфного маркера *Ala455Val* гена *THBD* и генотипов *Arg/Gln* и *Gln/Gln* полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* (Табл. 6).

**Таблица 6.**

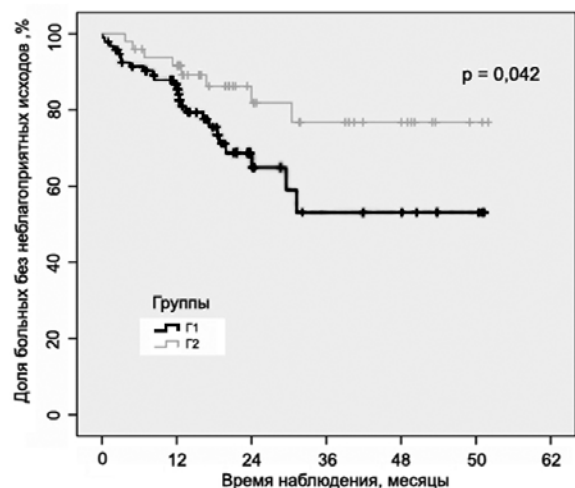
Характеристика групп больных, перенесших острый коронарный синдром, при исследовании совместного влияния полиморфных маркеров генов *THBD* и *F7*

( $\chi^2 = 4,15, p = 0,042$ ).

Название группы	Генотипы полиморфных маркеров		Число пациентов	Время дожития, месяцы (95% CI)
	<i>Ala455Val</i> гена <i>THBD</i>	<i>Arg353Gln</i> гена <i>F7</i>		
Г1	<i>Ala/Val</i> <i>Val/Val</i>	<i>Arg/Arg</i>	95	40.5 (33,5-47,6)
Г2	<i>Ala/Ala</i>	<i>Arg/Gln</i> <i>Gln/Gln</i>	50	51.6 (45.0-58.1)

В первой группе чаще наблюдался неблагоприятный исход (нефатальный и фатальный инфаркт миокарда, нефатальный и фатальный инсульт) по сравнению со второй группой. Время дожития до конечной точки в первой группе составило 40.5 месяцев (95% CI 33,5-47,6) против 51.6 месяцев (95% CI 45.0-58.1) во второй группе ( $\chi^2 = 4.15, p = 0.042$ ) (Рис. 4).

Полученные нами результаты в группе женщин, перенесших обострение ИБС, подтверждают целесообразность использования такого подхода. Меньшее время дожития до конечной точки и увеличение числа неблагоприятных исходов у пациентов первой группы, возможно, связаны как с более высоким уровнем активности фактора VII у носителей генотипа *Arg/Arg* гена *F7*, так и с влиянием аллеля *Val* гена *THBD* на скорость активации белка С. Носительство аллеля *Gln* гена *F7* и генотипа *Ala/Ala* гена *THBD* приводят, в свою очередь, к статистически достоверному уменьшению числа НИ во второй группе.



**Рис. 4.** График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у женщин носителей различных генотипов полиморфных маркеров *Ala455Val* гена *THBD* и *Arg353Gln* гена *F7*, в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

#### 1.2.6. Исследование ассоциации полиморфного маркера *C(-2676)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 его наследственный дефицит ведет к развитию тромбозов различной степени тяжести уже в молодом возрасте (Folsom et al., 2002).

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, а так же оказывает цитопротективный эффект (Mosnier et al., 2007). Эти данные подтверждают исключительно важную роль белка С в регуляции гемостаза.

В промоторной области, кодирующего белок С гена *PROC*, расположенного на хромосоме 2q13–q14, обнаружено несколько полиморфных маркеров: *C(-1654)T*, *A(-1641)G*, *A(-1476)T* и *C(-2676)T*. Данных об ассоциации этих полиморфных маркеров

гена *PROC* с развитием ИБС в литературе совсем немного. Впервые они были изучены Спеком и соавт. в 1995 году, при этом все исследования за последние 10 лет проводились по принципу «случай-контроль» на выборках сравнительно небольшого объема (Aiach et al., 1999; Mahmoodi et al., 2008). Минорный аллель *C* полиморфного маркера *C(-2676)T*, как было показано в недавно проведенном крупном исследовании, был ассоциирован с пониженным уровнем белка С, однако при этом не влиял на неблагоприятное течение ИБС в группе исследуемых пациентов (Reiner et al., 2008).

Принимая во внимание полученные нами ранее результаты об ассоциации полиморфного маркера *C(-1654)T*, расположенного в промоторной области гена *PROC*, с повышенным риском развития неблагоприятного исхода в группе больных, перенесших эпизод обострения ИБС (Агапкина и соавт., 2010), для изучения ассоциации гена *PROC* с развитием неблагоприятных исходов нами был выбран другой полиморфный маркер этого гена — *C(-2676)T*.

Нами были определены частоты генотипов полиморфного маркера *C(-2676)T* гена *PROC* у всех пациентов (Табл. 7).

**Таблица 7.**

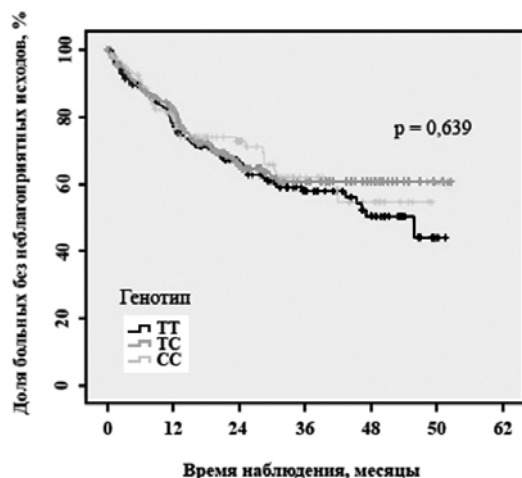
Частоты генотипов полиморфного маркера *C(-2676)T* гена *PROC* у больных, перенесших ОКС.

Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>TT</i>	430	37,6
<i>TC</i>	517	45,1
<i>CC</i>	198	17,3
Всего	1145	100

Проведенный анализ выживаемости пациентов показал, что риск развития неблагоприятного исхода после перенесенного острого коронарного синдрома не зависит от генотипов полиморфного маркера *C(-2676)* гена *PROC*. Кривые выживаемости больных с различными генотипами полиморфного маркера *C(-2676)* гена *PROC* существенно не различались (рис. 5).

Эти данные свидетельствуют о том, что полиморфный маркер *C(-2676)T* гена *PROC* не ассоциирован с развитием неблагоприятного исхода у больных, перенесших ОКС.





**Рис.5.** График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей различных генотипов полиморфного маркера *C(-2676)* гена *PROC* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

### 1.2.7. Исследование ассоциации полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANHI* с ОКС.

Ингибитор активатора плазминогена типа 1 (PAI-1) является главным физиологическим ингибитором активатора плазминогена тканевого типа (t-PA). Биологическая система активатор плазминогена/плазмин является фибринолитической системой, основная функция которой - запуск защитных механизмов, предотвращающих образование тромба. Активность этой системы зависит от уровня специфичной протеазы, плазмина, который образуется из неактивного предшественника плазминогена под действием его активаторов. Активация плазминогена, в свою очередь, регулируется посредством присутствующих в плазме крови специфичных ингибиторов активатора плазминогена. Наиболее значимым из таких ингибиторов является ингибитор активатора плазминогена типа 1 (Yamamoto et al., 2005). PAI-1 секретируется в кровь эндотелием сосудов и является ингибитором t-PA и урокиназы. Принято считать, что повышенная концентрация PAI-1 ассоциирована с неблагоприятным течением атеротромбоза (Sobel et al., 2003).

В гене *PLANHI*, кодирующем PAI-1, обнаружен полиморфный маркер *4G/5G* в положении -675 (rs1799762). Данный полиморфный маркер расположен в промоторной области гена в районе участка связывания белка — активатора транскрипции и, по некоторым данным, у носителей аллеля *4G* повышен риск

развития сердечно-сосудистых заболеваний (Loew et al., 2006). К настоящему моменту проведены достаточно обширные исследования по выяснению роли гена *PLANHI* в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний в различных популяциях. Однако, данные об ассоциации полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANHI* с риском развития ИБС являются крайне противоречивыми (Затейщиков и соавт., 2002).

Частоты генотипов полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANHI* были определены у всех пациентов (Табл. 8). Частоты аллелей в изучаемой нами группе больных были близки к частотам, наблюдаемым у европейцев (Rossaak et al., 2000).

Проведенный анализ выживаемости пациентов показал, что риск развития неблагоприятного исхода после перенесенного острого коронарного синдрома не зависит от генотипов полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANHI* ( $p = 0,604$ ) (Рис. 6). При разделении нами исследуемой выборки на мужчин и женщин ассоциация с неблагоприятными исходами также не была обнаружена.

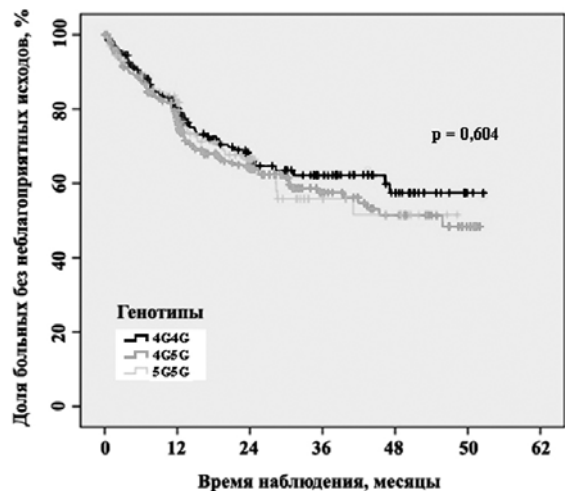
**Таблица 8.**

Частоты генотипов полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANHI* у больных, перенесших обострение ИБС.

Генотип	Число пациентов	Частота, %
<i>4G4G</i>	378	33
<i>4G5G</i>	550	48
<i>5G5G</i>	217	19
Всего	1145	100

По данным, полученным разными исследователями, уровень PAI-1 примерно на 25% выше у носителей генотипа *4G/4G*, по сравнению с носителями генотипа *5G/5G* (Lane and Grant, 2000). В течение последних лет в большинстве исследований обнаружено наличие повышенного уровня PAI-1 в плазме крови у пациентов с ИБС, особенно у лиц, перенесших ИМ (Sabino et al., 2011).

Отсутствие ассоциации генотипов полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANHI* с развитием неблагоприятных исходов в группе больных ИБС, перенесших острый коронарный синдром, согласуется с данными, полученными в крупномасштабных исследованиях последних лет (Koch et al., 2010) и говорит об отсутствии индивидуальной прогностической значимости данного полиморфного маркера.



**Рис. 6.** График Каплана-Майера. Доля неблагоприятных исходов у носителей различных генотипов полиморфного маркера *4G(-675)5G* гена *PLANH1* в зависимости от времени, прошедшего после ОКС.

Работы, обнаружившие ассоциацию данного полиморфного маркера и риска развития ИМ, в основном проводились на небольших группах (Corsetti et al., 2008) и, возможно, полученные ими результаты связаны с недостаточной величиной выборки. Также, можно предположить, что аллель *4G* является фактором риска развития ИМ только в молодом возрасте, в то время как средний возраст пациентов, исследуемых в нашей выборке, был старше 50 лет. Так, впервые ассоциация аллеля *4G* гена *PLANH1* с более высоким риском инфаркта миокарда была выявлена на шведской популяции у молодых мужчин (35 – 45 лет) (Ericsson et al., 1995), и в то же время, на больших группах пожилых пациентов ассоциация не наблюдалась. Об этом свидетельствует также достоверно более низкое число гомозиготных носителей аллеля *4G* среди выживших пациентов, которые перенесли ИМ в возрасте до 35 лет (Rallidis et al., 2010). Кроме того, в нескольких более ранних работах не были обнаружены не только ассоциация данного полиморфного маркера с ИМ, но и его корреляция с уровнем PAI-1 (Doggen et al., 1999).

Таким образом, можно сделать вывод, что данный полиморфный маркер не ассоциирован с выживаемостью больных, перенесших ОКС.

## ВЫВОДЫ.

1. Определены частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров *Arg506Gln* и *G5393A* гена *F5*, *Arg353Gln* гена *F7*, *C(-2676)T* гена *PROC*, *Ala455Val* гена *THBD* и *4G(-675)5G* гена *PLANH1* в группе больных, перенесших острый коронарный синдром.
2. Для полиморфных маркеров *Arg506Gln* гена *F5*, *Arg353Gln* гена *F7*, *C(-2676)T* гена *PROC*, *Ala455Val* гена *THBD* и *4G(-675)5G* гена *PLANH1* показано отсутствие ассоциации с развитием неблагоприятных исходов после эпизода ОКС.
3. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *G5393A* гена *F5* с повышенным риском развития неблагоприятного исхода (фатальный и нефатальный инфаркт миокарда, фатальный и нефатальный инсульт) в группе женщин, перенесших эпизод обострения ИБС.
4. При изучении комбинации генотипов полиморфного маркера *Arg353Gln* гена *F7* и *Ala455Val* гена *THBD* обнаружена их сочетанная ассоциация с повышенным риском развития неблагоприятного исхода (фатальный и нефатальный инфаркт миокарда, фатальный и нефатальный инсульт) в группе женщин, перенесших эпизод обострения ИБС.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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., Казилова, 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., Затеищikov, Д.А., Носиков, В.В. Полиморфные маркеры *G(-455)A* гена *FGF3* и *C(-1654)T* гена *PROC* и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром. *Молекулярная биология*.-2010.-Т. 44, № 4.-С. 613-619
2. **А.А. Пушков**, К.А. Благодатских, А.Г. Никитин, Ю.В. Агапкина, А.Н. Бровкин, Д.А. Чудакова, М.А. Евдокимова, О.Ю. Асейчева, В.С. Осмоловская, Л.О. Минушкина, Т.Н. Бакланова, П.А. Талызин, О.П. Донецкая, С.Н. Терещенко, Н.А. Джаиани, Е.В. Акатова, М.Г. Глезер, А.С. Галявич, В.Б. Закирова, Н.А. Козиолова, А.В. Ягода, О.И. Боева, Е.В. Хоролец, С.В. Шлык, Э.Г. Волкова, М.П. Маргарян, И.О. Гузь, В.О. Константинов, Б.А. Сидоренко, Д.А. Затеищikov, В.В. Носиков. Полиморфные маркеры *Ala455Val* гена *THBD* и *Arg353Gln* гена *F7* и осложнения атеросклероза у больных, перенесших острый коронарный синдром. *Генетика*.-2011, Т. 47, № 10, С. 101–107
3. **А.А. Пушков**, О.В. Разуваева, К.А. Благодатских, А.М. Бурденный, А.Г. Никитин, А.Н. Бровкин, Д.А. Чудакова, М.А. Евдокимова, О.Ю. Асейчева, В.С. Осмоловская, Л.О. Минушкина, Т.Н. Бакланова, П.А. Талызин, О.П. Донецкая, С.Н. Терещенко, Н.А. Джаиани, Е.В. Акатова, М.Г. Глезер, А.С. Галявич, В.Б. Закирова, Н.А. Козиолова, А.В. Ягода, О.И. Боева, Е.В. Хоролец, С.В. Шлык, Э.Г. Волкова, М.П. Маргарян, И.О. Гузь, В.О. Константинов, Б.А. Сидоренко, Д.А. Затеищikov, В.В. Носиков. Полиморфный маркер *4G(-675)5G* гена *PLA2G1B* не ассоциирован с осложнениями атеросклероза у больных, перенесших обострение ишемической болезни сердца. *Медицинская генетика*.-2011.-№.11.-С.-16-21.
4. **А.А. Pushkov**, К. А. Blagodatskikh, А. G. Nikitin, D. A. Zateyshchikov, V. V. Nosikov. Polimorphic markers of *THBD* and *PROC* genes and genetic predisposition to unfavourable outcomes in patients after acute coronary syndrome. 79 EAS Congress. Atherosclerosis Supplements.-2011.-Vol.12, №1.-P. 134-135, Gothenburg, Sweden (26-29 июня 2011 г.).
5. **А.А. Пушков**, К. А. Благодатских, А. Г. Никитин, М. А. Евдокимова, В. С. Осмоловская, Д. А. Затеищikov, В. В. Носиков. Полиморфные маркеры

*Ala455Val* гена *THBD* и *C(-2676)T* гена *PROC* и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших острый коронарный синдром. Материалы X-ой ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗы «Биохимическая физика».-2011.-стр.203-204, г. Москва, Россия, (8-10 ноября 2010 г).

6. **А.А. Пушков**, А.Г. Никитин, В.В. Носиков, Д.А. Затеищikov. Полиморфные маркеры *Ala455Val* гена *THBD* и *Arg353Gln* гена *F7* и генетическая предрасположенность к неблагоприятному течению ишемической болезни сердца у больных, перенесших обострение ИБС. Материалы II международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых.-2011.-Стр. 232-233, г. Донецк, Украина, (19-22 сентября 2011 г).