

На правах рукописи

БАЛАЦКИЙ АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ

**АССОЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ С
РАЗВИТИЕМ ИНФАРКТА МИОКАРДА У ЛИЦ БЕЗ РАННЕ
ВЕРИФИЦИРОВАННОЙ СТЕНОКАРДИИ НАПРЯЖЕНИЯ И С КРИТЕРИЯМИ
НЕСТАБИЛЬНОСТИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК**

14.01.05 – Кардиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2014

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научные руководители:

д.м.н., профессор

Сергей Анатольевич Бойцов

к.м.н., доцент

Лариса Михайловна Самоходская

Официальные оппоненты:

профессор кафедры терапии,
кардиологии и функциональной
диагностики с курсом нефрологии
ФГБУ «Учебно-научный медицинский
центр» Управления делами Президента
Российской Федерации (г. Москва),
доктор медицинских наук, профессор

Дмитрий Александрович Затейщиков

профессор кафедры внутренних
болезней, кардиологии и клинической
фармакологии Факультета повышения
квалификации медицинских работников
ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов» (г. Москва),
доктор медицинских наук, доцент

Олег Валерьевич Аверков

Ведущая организация: ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России (г. Москва)

Защита диссертации состоится «24» декабря 2014г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.016.01 при ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России по адресу: 101990, г. Москва, Петроверигский пер., д.10, стр.3.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале ФГБУ «ГНИЦ профилактической медицины» Минздрава России (101990, г. Москва, Петроверигский пер., д.10, стр.3) и на сайте www.gnicpm.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2014г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Киселева Наталия Васильевна

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.

АГ – артериальная гипертензия	eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота
АТФ – аденозинтрифосфат	
АСБ – атеросклеротическая бляшка	GISSI-2 – исследование итальянской группы по изучению выживаемости при инфаркте миокарда
ДИ – доверительный интервал	
ГХС – гиперхолестеринемия	
ИБС – ишемическая болезнь сердца	MMP2 – ген матриксной металлопротеиназы 2
ИМ – инфаркт миокарда	MMP9 – ген матриксной металлопротеиназы 9
ИМТ – индекс массы тела	
КЭАЭ – каротидная эндартерэктомия	
ММП – матриксная металлопротеиназа	PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа
МТ – масса тела	
ОШ – отношение шансов	PLAU – ген урокиназного активатора плазминогена
ПДРФ - полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	PLAUR – ген рецептора урокиназного активатора плазминогена
ПЦР – полимеразная цепная реакция	
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания	tPA – тканевой активатор плазминогена
УЗИ – ультразвуковое исследование	uPA урокиназный активатор плазминогена
ФР – фактор риска	uPAR – рецептор урокиназного активатора плазминогена
ЭКГ – электрокардиограмма	
СХ37 – коннексин 37	UTR – нетранслируемый регион

Обозначения аминокислот

Arg – аргинин	Glu – глутаминовая кислота	Pro – пролин
Asp – аспарагиновая кислота	K – лизин	Q – глутамин
D – аспарагиновая кислота	L – лейцин	R – аргинин
E – глутаминовая кислота	Leu – лейцин	S – серин
Gln – глутамин	Lys – лизин	Ser – серин
	P – пролин	

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. ИМ является важной медико-социальной проблемой. В настоящее время он стал одной из ведущих причин инвалидизации и смертности во всем мире. В Российской Федерации в 2011 г. зарегистрировано 181,4 тыс. случаев ИМ, из которых 83,8% составил первичный ИМ, а 16,2% - повторный. Смертность от ИМ особенно высока среди мужчин трудоспособного возраста (Ощепкова Е.В. и др. 2013). Хорошо известно, что смертность от сердечно-сосудистых заболеваний может быть снижена. В этом процессе основную роль играет борьба с ФР, а также применение современных лекарственных препаратов, доказавших влияние на прогноз заболевания (Кутишенко Н.П. и др. 2011). Многие практически здоровые лица, не имеющие стенокардии и других клинических проявлений ИБС, тем не менее, нуждаются в проведении профилактических мероприятий, поскольку у них в коронарном русле могут иметь место небольшие, гемодинамически незначимые, но нестабильные и склонные к разрыву АСБ, внезапно приводящие к развитию ИМ.

Оценить процент пациентов, перенесших ИМ без предшествующей клиники стенокардии, по данным литературы сложно, однако, вероятно, он достаточно высок. В исследовании GISSI-2 только у 33,2% пациентов, перенесших ИМ в возрасте <50 лет, ранее была диагностирована стенокардия (Mocchetti T. et al. 1997). Недостаточно информации о механизмах развития ИМ у пациентов без стенокардии. Можно предположить, что такой ИМ возникает в результате атеротромбоза на месте нестабильной, но гемодинамически не значимой АСБ, однако прямых данных, подтверждающих это, нет. Известно, что АСБ, вызывающие ИМ, чаще всего являются неокклюзирующими и сужают просвет артерии в среднем на 48% (Ambrose J.A. et al. 1988), соответственно, каких-либо признаков ишемии миокарда при такой степени стеноза зачастую не отмечается. Бессимптомный нестабильный атеросклероз – частое и опасное явление. Показано, что нестабильные АСБ встречаются у 77% асимптомных пациентов с гемодинамически значимым каротидным атеросклерозом (Шишкина В.С. и др. 2013). Но если нестабильные каротидные АСБ могут быть обнаружены при

помощи ультразвукового исследования, то для визуализации нестабильности коронарных АСБ требуется применение инвазивных методов. В связи с этим необходим поиск маркеров для скринингового выявления нестабильных АСБ и диагностики склонности к развитию ИМ у практически здоровых лиц.

Цель исследования. Изучение ассоциации молекулярно-генетических факторов и традиционных факторов сердечно-сосудистого риска со стабильностью АСБ и развитием ИМ у лиц без верифицированной стенокардии напряжения.

Задачи исследования

1. Исследовать частоту молекулярно-генетических факторов, потенциально влияющих на стабильность АСБ, и традиционных факторов сердечно-сосудистого риска в группе пациентов, перенесших ИМ без верифицированной стенокардии напряжения и в группе пациентов, перенесших ИМ на фоне других проявлений ИБС.

2. Исследовать ассоциацию сочетаний молекулярно-генетических факторов, потенциально влияющих на стабильность АСБ, и традиционных ФР с развитием ИМ у лиц без верифицированной стенокардии напряжения.

3. Исследовать частоту молекулярно-генетических факторов, потенциально влияющих на стабильность АСБ, в группе пациентов с каротидным атеросклерозом и взаимосвязь этих факторов с морфологическими параметрами АСБ.

4. Изучить взаимосвязь традиционных ФР с морфологическими параметрами АСБ.

5. Изучить взаимосвязь сочетаний молекулярно-генетических факторов, потенциально влияющих на стабильность АСБ, и традиционных ФР с морфологическими параметрами АСБ.

Научная новизна. Впервые показана связь носительства аллельных вариантов генов CX37 и NOS3 с развитием ИМ у мужчин в возрасте до 55 лет без верифицированной стенокардии напряжения.

Впервые продемонстрирована ассоциация сочетания генотипа MMP2 (-1306)CC и нормальной массы тела с развитием ИМ у мужчин в возрасте до 55 лет без верифицированной стенокардии напряжения.

Впервые продемонстрирована связь носительства аллельных вариантов гена PLAУ с типом развившейся АСБ (атероматозная или фиброзная).

Впервые продемонстрирована связь носительства аллельных вариантов гена PLAUR с истончением фиброзной капсулы АСБ.

Практическая значимость работы. Результаты настоящей работы могут быть использованы для дальнейших исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов атерогенеза и поиск мишеней для новых лекарственных средств. Полученные данные позволяют выявлять практически здоровых мужчин в возрасте <55 лет, имеющих предрасположенность к развитию ИМ без предшествующих признаков ИБС. С этой целью возможно применение двухступенчатого алгоритма диагностики: определение полиморфизма генов CX37 и NOS3 с последующим (при необходимости) определением полиморфизма гена MMP2 и его оценки в сочетании с учетом наличия ожирения. Также результаты работы указывают на потенциальные ФР развития нестабильных АСБ в сонных артериях: определение полиморфизма генов PLAУ и PLAUR с учетом наличия ожирения может быть использовано для выявления нестабильных АСБ и стратификации риска.

Внедрение. Результаты исследования были использованы для подготовки методического пособия. «Определение индивидуального генетического риска развития сердечно-сосудистых заболеваний» (Самоходская Л.М. и др., 2010), а также при выполнении государственного контракта № 16.512.11.2262 «Разработка методов выявления молекулярных мишеней для дифференциальной диагностики стабильных и нестабильных атеросклеротических поражений человека». Получен патент № 2469096: «Способ определения наследственной предрасположенности к развитию инфаркта миокарда у лиц без клинических проявлений ишемической болезни сердца».

Апробация диссертации прошла 24 сентября 2013 г. на совместном

заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, лаборатории генных и клеточных технологий и лаборатории постгеномных методов исследования Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 20 печатных работ в отечественной и зарубежной печати, в т.ч. 6 статей – в журналах, включенных в перечень ВАК РФ и один патент на изобретение.

Основные положения, выносимые на защиту

– У мужчин в возрасте <55 лет с развитием ИМ без верифицированной стенокардии напряжения или на фоне других проявлений ИБС ассоциировано сочетание различных аллельных вариантов генов CX37 и NOS3, кодирующих белки (коннексин-37 и eNOS), потенциально связанные с адгезией, миграцией и пролиферацией клеточных элементов АСБ.

– У мужчин в возрасте <55 лет, не являющихся носителями значимых комбинаций генотипов CX37 и NOS3, при нормальной МТ фактором, ассоциированным с развитием ИМ без верифицированной стенокардии напряжения, является вариант (-1306)CC гена MMP2, кодирующего матриксную металлопротеиназу-2, вовлеченную в процессы протеолиза в АСБ. Прочие традиционные ФР не взаимосвязаны с характером развития ИМ.

– Полиморфизм Pro141Leu гена PLAУ, кодирующего uPA, который стимулирует процессы фибринолиза и миграции клеток в АСБ, ассоциирован с морфологией АСБ, предопределяя возникновение фиброзных (тип Vc) или атероматозных (тип Va) АСБ, а полиморфизм T(-516)C гена PLAUR взаимосвязан с толщиной капсулы АСБ.

– Нормальная МТ ассоциирована с развитием АСБ с истонченной капсулой (<65 мкм), однако имеет значение только при наличии варианта (-516) TT гена PLAUR, кодирующего uPAR, который усиливает протеолитическое действие uPA. Прочие традиционные ФР не ассоциированы с морфологией АСБ.

– Вариант (-516) TT гена PLAUR является общим фактором, ассоциированным как с развитием ИМ без верифицированной стенокардии напряжения, так и с истончением капсулы АСБ.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 145 страницах компьютерной верстки, состоит из введения, четырех глав, включающих: обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение; выводов, практических рекомендаций, списка обозначений и сокращений и списка литературы, состоящего из 20 отечественных и 155 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 32 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В ходе одномоментного исследования был обследован 221 человек: пациенты, перенесшие ИМ (n=171), мужского пола, медиана возраста 48,0 (45,0; 53,0) лет) и пациенты с каротидным атеросклерозом (n=50), 32 мужчины и 18 женщин, медиана возраста 71 (63; 73) год)

Критерии включения в группу больных, перенесших ИМ.

– Клинически, лабораторно и инструментально подтвержденный диагноз ИМ (по критериям в соответствии с Национальными рекомендациями по диагностике и лечению больных острым ИМ с подъемом сегмента ST ЭКГ).

– Возраст <55 лет.

– Мужской пол.

Критерии исключения: нарушение толерантности к глюкозе и сахарный диабет.

Для решения поставленных задач были сформированы 2 подгруппы обследованных: пациенты, перенесшие ИМ без ранее верифицированной стенокардии напряжений (n=117) и пациенты, перенесшие ИМ на фоне других проявлений ИБС (n=54).

Критерии включения в группу пациентов с каротидным атеросклерозом.

– Стеноз сонной артерии $\geq 70\%$ и более по данным цветового доплеровского картирования.

– Перенесенная по поводу указанного стеноза КЭАЭ.

Для решения поставленных задач пациенты с каротидным атеросклерозом были разделены на подгруппы двумя способами: в зависимости от макроскопических характеристик АСБ и в зависимости от ее микроскопических

параметров. При разделении по макроскопическим параметрам были выделены 2 группы: пациенты с макроскопически нестабильными (атероматозными, тип Va по классификации Американской ассоциации сердца) АСБ (n=29) и пациенты с макроскопически стабильными (фиброзными, тип Vc) АСБ (n=21). При разделении по микроскопическим параметрам были выделены пациенты с нестабильными (толщина капсулы <65 мкм) АСБ (n=29) и пациенты со стабильными (толщина капсулы ≥ 65 мкм) АСБ (n=21).

У всех пациентов по данным историй болезни изучали жалобы и анамнез (с учетом наличия АГ и статуса курения), данных физикального (рост, вес, ИМТ), лабораторного (включая маркеры повреждения миокарда) и инструментального (записи ЭКГ, данные эхокардиографии, результаты нагрузочных проб) обследований. У пациентов с каротидным атеросклерозом также проводилось ультразвуковое исследование высокого разрешения. ДНК у всех пациентов выделяли из венозной крови; генотипирование проводили, используя ПЦР с анализом ПДРФ и ПЦР в реальном времени. У пациентов с каротидным атеросклерозом осуществлялся забор материала после операции КЭАЭ, макроскопическая оценка АСБ и определение ее типа в соответствии с классификацией Американской ассоциации сердца, а также изготовление и окраска гистологических срезов АСБ с последующей световой микроскопией и измерением толщины капсулы АСБ.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0. Уровень значимости для всех проверяемых гипотез был принят как $p < 0,05$. Нормальность распределения исследуемых признаков проверялась при помощи критерия Шапиро-Уилка. Данные представлялись как среднее \pm стандартное отклонение в случае нормального распределения. При отклонении распределения от нормального данные представлялись как медиана (интерквартильный размах). Гипотеза о равенстве средних в сравниваемых группах исследовалась с помощью t-критерия Стьюдента для равных дисперсий. Гипотезу о равенстве медиан проверяли при помощи критерия Манна-Уитни. При сравнении медиан в трех выборках

применяли критерий Краскела-Уоллиса. Гипотезу о связи между качественными признаками в таблицах сопряженности 2x2 и 2x3 проверяли при помощи критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, а при его неприменимости – при помощи двустороннего точного теста Фишера. В работе также представлены отношения шансов (ОШ) возникновения тех или иных признаков. Шансом в каждой группе называлась вероятность наличия исследуемого признака к вероятности его отсутствия. Для построения 95%-доверительных интервалов (ДИ) и точечной оценки ОШ применялась модель однофакторной бинарной логистической регрессии. Достоверность моделей оценивалась с помощью метода максимального правдоподобия. Следует отметить, что ОШ является статистически значимым, если 95% ДИ для отношения шансов не включает единицу. Многофакторный анализ включенных в исследование генов проводился при помощи модели многофакторной логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Результаты исследования группы пациентов с ИМ. Выборки пациентов с ИМ на фоне ИБС и ИМ без стенокардии сравнивали по частоте основных ФР развития ССЗ. Результаты сравнения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика пациентов, пренесших ИМ.

Показатель	Пациенты с ИМ без стенокардии (n=117)	Пациенты с ИМ на фоне ИБС (n=54)	p
Возраст начала заболевания, лет	47,0 (44,0; 52,0)	50,5 (46,0; 54,0)	0,02
Курение, %	52,1 (n=61)	63,0 (n=34)	0,25
Ожирение, %	26,5 (n=31)	31,5 (n=17)	0,62
ИМТ, кг/м ²	27,4 (25,1; 30,3)	28,4 (25,7; 31,2)	0,13
АГ, %	59,8 (n=70)	51,9 (n=28)	0,42
ГХС, %	26,5 (n=31)	38,9 (n=21)	0,14

По частоте основных ФР развития ССЗ, за исключением возраста, исследуемые выборки не различались. Разница в возрасте, по всей видимости, может быть следствием принципа формирования подгрупп, т.к. при развитии ИМ на фоне ИБС, т.е. при наличии более крупных и стабильных АСБ, атерогенез протекает медленнее, и для развития ИМ требуется большее время.

Для проведения генетического анализа были выбраны полиморфные маркеры, потенциально связанные с интенсивностью протеолитических процессов в межклеточном матриксе АСБ и миграцией клеточных элементов АСБ: C(-1306)T (rs243865) гена MMP2, C(-1562)T (rs3918242) и A855G (Gln279Arg, rs17576) гена MMP9, Pro141Leu (C7240T, rs2227564) и C/T 3'-UTR (rs4065) гена PLAUR, Lys220Arg (A659G, rs2302524) гена PLAUR, (-675)4G/5G (rs1799768) гена PAI-1, Pro319Ser (C1019T, rs17643910) гена CX37 и Glu298Asp (G894T, rs1799983) гена NOS3. В таблице 2 представлены данные о статистически значимых различиях между подгруппами, полученные в ходе генетического анализа группы пациентов с ИМ.

Таблица 2 – Статистически значимые различия частоты генотипов и аллелей различных полиморфизмов по подгруппам в группе пациентов с ИМ.

Поли-морфизм	Генотип/аллель	ИМ без стенокардии, % (n) (n=32)	ИМ на фоне ИБС, % (n) (n=18)	p для критерия χ^2 Фишера	ОШ (95% ДИ)
T(-516)C (rs344781) PLAUR	ТТ	55,6 (65)	37,0 (20)	0,04	2,13 (1,10-4,12)
	ТС	38,5 (45)	48,1 (26)		0,67 (0,35-1,29)
	СС	6,0 (7)	14,8 (8)		0,37 (0,13-1,07)
	Аллель Т	74,8	61,1	0,01	
	Аллель С	25,2	38,9		

Продолжение таблицы 2

Поли-морфизм	Генотип/ аллель	ИМ без стенокардии, % (n) (n=32)	ИМ на фоне ИБС, % (n) (n=18)	р для критерия χ^2 Фишера	ОШ (95% ДИ)
Pro319Ser (C1019T, rs17643910) CX37	PP	21,4 (25)	46,3 (25)	<0,01	0,32 (0,16-0,63)
	PS	35,9 (42)	46,3 (25)		0,65 (0,34-1,25)
	SS	42,7 (50)	7,4 (4)		9,33 (3,16-27,53)
	Аллель P	39,3	69,4	<0,01	
	Аллель S	60,7	30,6		
Glu298Asp (G894T, rs1799983) NOS3	EE	53,0 (62)	29,6 (16)	<0,01	2,68 (1,35-5,33)
	ED	44,4 (52)	57,4 (31)		0,59 (0,31-1,14)
	DD	2,6 (3)	13,0 (7)		0,18 (0,04-0,71)
	Аллель E	75,2	58,3	<0,01	
	Аллель D	24,8	41,7		

Наиболее значимая ассоциация с развитием ИМ у лиц без стенокардии была показана, для вариантов TT гена PLAUR, SS (Ser/Ser) гена CX37 и EE (Glu/Glu) гена NOS3. Для определения взаимного влияния данных полиморфизмов был проведен многофакторный анализ при помощи модели многофакторной логистической регрессии. Результаты анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты многофакторного анализа генетической предрасположенности к развитию ИМ у лиц без верифицированной стенокардии.

Генотип	Статистика Вальда	р для статистики Вальда	ОШ (95% ДИ)	р для модели логистической регрессии
PLAUR (-516)TT	2,40	0,12	1,76 (0,85-3,66)	<0,01
CX37 319SS	15,15	<0,01	8,83 (2,93-26,67)	
NOS3 298EE	5,70	0,02	2,45 (1,17-5,18)	

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для развития ИМ имеют значение только два генетических фактора: полиморфизм Pro319Ser гена CX37 и полиморфизм Glu298Asp гена NOS3, причем первый играет большую роль. Генотип 319SS усиливает АТФ-зависимую адгезию моноцитов к эндотелию, а генотип 298DD снижает активность NO-синтазы, возможно, уменьшая миграцию клеточных элементов АСБ. На рисунке 1, показывающем долю пациентов, перенесших ИМ без ранее верифицированной стенокардии, графически отражена значимость различных комбинаций генотипов. Розовым цветом показаны комбинации, ассоциированные с развитием ИМ без верифицированной стенокардии напряжения, голубым – комбинации, значимые для развития ИМ на фоне других проявлений ИБС, серым – комбинации, не имеющие значения.

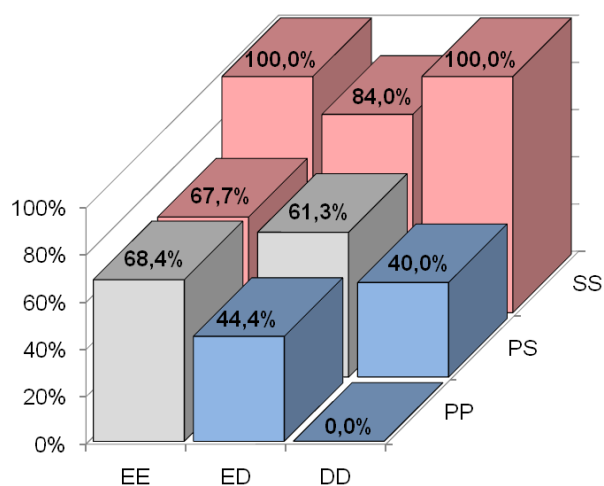


Рисунок 1 – Доля пациентов, перенесших ИМ без стенокардии напряжения, от общего числа пациентов с данным сочетанием генотипов.

В работе наблюдается взаимосвязь сочетания полиморфных маркеров с характером развития ИМ: комбинации генотипов SS+EE, SS+ED, PS+EE и SS+DD ассоциированы с развитием ИМ у лиц без стенокардии, ОШ для данной подгруппы составляет 4,41 (95%ДИ 2,16-8,99). Комбинации PP+DD, PP+ED и PS+DD напротив, ассоциированы с более стабильным течением ИБС: ОШ развития ИМ без стенокардии у лиц с данными комбинациями генотипов составляет 0,20 (95%ДИ 0,09-0,43). Комбинации генотипов PP+EE и PS+ED

значимостью не обладают, поэтому в данной подгруппе пациентов с ИМ было проведен дополнительный анализ для выявления факторов ассоциированных с развитием ИМ без ранее верифицированной стенокардии. Клиническая характеристика этих пациентов приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Клиническая характеристика выборок пациентов, перенесших ИМ и обладающих незначимой комбинацией вариантов генов CX37 и NOS3.

Показатель	Пациенты с ИМ без стенокардии (n=32)	Пациенты с ИМ на фоне ИБС (n=18)	p
Возраст начала заболевания, лет	48,5 (47,0; 54,0)	48,0 (44,5; 53,5)	0,36
Курение, %	59,4 (n=19)	72,2 (n=13)	0,55
Ожирение, %	15,6 (n=5)	50,0 (n=9)	0,02
ИМТ, кг/м ²	26,7 (24,2; 28,5)	29,7 (27,4; 32,7)	<0,01
АГ, %	56,3 (n=18)	55,6 (n=10)	0,40
ГХС, %	12,5 (n=4)	33,3 (n=6)	0,16

Таким образом, ожирение в три раза чаще встречается у пациентов, перенесших ИМ на фоне других проявлений ИБС при отсутствии значимых комбинаций вариантов генов CX37 и NOS3. (ОШ=0,18; 95%ДИ 0,05-0,70). Генетический анализ показал, что вторым значимым фактором развития ИМ без верифицированной стенокардии в данной группе был полиморфизм C(-1306)T (rs243865) гена MMP2 (таблица 5). Различия в частоте прочих полиморфных маркеров были статистически незначимыми.

Таблица 5 – Частоты генотипов и аллелей полиморфизма C(-1306)T (rs243865) гена MMP2 в подгруппе пациентов с ИМ, обладающих незначимой комбинацией вариантов генов CX37 и NOS3.

Генотип/ аллель	ИМ без стенокардии, % (n) (n=32)	ИМ на фоне ИБС, % (n) (n=18)	p для критерия χ^2 Фишера	ОШ (95% ДИ)
СС	71,9 (23)	38,9 (7)	0,046	4,02 (1,18-13,62)
СТ	28,1 (9)	55,6 (10)		0,31 (0,09-1,05)
ТТ	0,0 (0)	5,6 (1)		-
Аллель С	85,9	66,7	0,044	
Аллель Т	14,1	33,3		

Многофакторный анализ показал, что ожирение и генотип (-1306)СС, связанный с усиленным протеолизом межклеточного матрикса, были независимыми факторами, ассоциированными с характером развития ИМ при отсутствии значимых комбинаций вариантов генов CX37 и NOS3, однако единственным значимым сочетанием этих признаков было наличие генотипа (-1306)СС при нормальной МТ: в этом случае ОШ развития ИМ без ранее верифицированной стенокардии составлял 6,43 (95%ДИ 1,55-26,67).

Таким образом, алгоритм определения склонности к тому или иному характеру развития ИМ можно разделить на две стадии. На первой стадии проводится определение генотипов полиморфизма Pro319Ser гена CX37 и полиморфизма Glu298Asp гена NOS3: пациенты с генотипами SS+EE, SS+ED, PS+EE и SS+DD должны в дальнейшем наблюдаться с учетом их склонности к развитию ИМ без других проявлений ИБС, тогда как при выявлении генотипов PP+DD, PP+ED и PS+DD ИБС с большей вероятностью будет протекать более стабильно и ИМ не будет ее манифестацией. В случае выявления комбинации генотипов PP+EE или PS+ED необходим второй этап оценки с определением генотипа полиморфизма C(-1306)T (rs243865) гена MMP2 и учетом наличия

ожирения (ИМТ \geq 30 кг/м²). Нормальная МТ и носительство генотипа (-1306)СС ассоциированы с развитием ИМ без стенокардии напряжения, носительство аллели (-1306)Т и ожирение – с манифестацией ИБС другими ее проявлениями. В случае нормальной МТ при носительстве аллели (-1306)Т, а также в случае ожирения при наличии (-1306)СС прогноз затруднен. Однако в настоящей работе были выявлены всего 24 человека с подобным сочетанием факторов, что позволило охарактеризовать 86% всей выборки.

Результаты исследования группы пациентов, перенесших КЭАЭ.

Пациенты подразделялись на подгруппы в зависимости от макроскопических и микроскопических характеристик АСБ. В таблицах 6 и 7 приведена клиническая характеристика обследованных групп.

Таблица 6 – Характеристика пациентов, перенесших КЭАЭ, по группам в зависимости от макроскопических параметров АСБ.

Показатель	Макроскопически нестабильная АСБ (n=29)	Макроскопически стабильная АСБ (n=21)	Р
Возраст начала заболевания, лет	69,0 (60,0; 72,0)	71,0 (60,0; 73,0)	0,03
Мужской пол, %	62,1 (n=18)	66,7% (n=14)	0,97
Курение, %	34,5 (n=10)	47,6 (n=10)	0,52
Ожирение, %	41,4 (n=12)	38,1 (n=8)	0,95
ИМТ, кг/м ²	28,7 (26,6; 31,7)	30,2 (27,1; 34,9)	0,89
АГ, %	93,1 (n=27)	100,0 (n=21)	0,62
ГХС, %	27,6 (n=8)	19,1 (n=4)	0,72
Нарушение углеводного обмена	37,9 (n=11)	9,52% (n=2)	0,05

Таблица 7 – Характеристика пациентов, перенесших КЭАЭ, по группам в зависимости от толщины капсулы АСБ.

Показатель	Капсула АСБ <65 мкм (n=21)	Капсула АСБ ≥65 мкм (n=29)	р
Возраст начала заболевания, лет	71,0 (65,0; 74,0)	71,0 (60,0; 73,0)	0,50
Мужской пол, %	71,4% (n=15)	58,6% (n=17)	0,53
Курение, %	52,4 (n=11)	31,0 (n=9)	0,22
Ожирение, %	19,1 (n=4)	55,2 (n=16)	0,02
ИМТ, кг/м ²	27,3 (26,4; 29,3)	30,2 (27,1; 34,9)	0,03
АГ, %	90,5 (n=19)	100,0 (n=29)	0,33
ГХС, %	33,3 (n=7)	17,2 (n=5)	0,33
Нарушение углеводного обмена	23,8 (n=5)	27,6 (n=8)	0,98

Таким образом, при разделении пациентов по макроскопическим параметрам АСБ пациенты с более плотными бляшками были старше. Однако возраст не был связан с толщиной капсулы АСБ, тогда как другой фактор риска – ожирение – демонстрировал тенденции, сходные с таковыми у пациентов с ИМ незначимыми комбинациями вариантов генов CX37 и NOS3. Нестабильные АСБ с капсулой <65 мкм встречались у 20,0% пациентов с ожирением и у 56,7% - при отсутствии ожирения – ОШ=0,19 (95%ДИ 0,05-0,73). У пациентов с ожирением медиана толщины капсулы АСБ составила 166,2 (76,3; 390,7) мкм, тогда как у пациентов без ожирения медиана составила 60,5 (40,0; 241,9) мкм. Статистическая значимость данных различий была на уровне тенденции (p=0,06). В таблицах 8 и 9 представлены статистически значимые различия между подгруппами имеющими разные макроскопические характеристики АСБ, полученные в ходе генетического анализа группы пациентов, перенесших КЭАЭ.

Таблица 8 – Частота генотипов и аллелей полиморфизма Pro141Leu (C7240T, rs2227564) гена PLAУ у пациентов, перенесших КЭАЭ, в зависимости от макроскопических характеристик АСБ.

Генотип/ аллель	Макроскопич. нестабильная АСБ, % (n) (n=29)	Макроскопич. стабильная АСБ, % (n) (n=21)	р для критерия χ^2 Фишера	ОШ (95% ДИ)
PP	72,4 (21)	38,1 (8)	0,01	4,27 (1,29-14,16)
PL	24,1 (7)	28,6 (6)		0,80 (0,22-2,84)
LL	3,4 (1)	33,3 (7)		0,07 (0,01-0,64)
Аллель P	84,5	52,4	<0,01	
Аллель L	15,5	47,6		

Таблица 9 – Частота генотипов и аллелей полиморфизма T(-516)C (rs344781) гена PLAUR у пациентов, перенесших КЭАЭ, в зависимости от толщины капсулы АСБ.

Генотип/ аллель	Капсула АСБ <65 мкм, % (n) (n=21)	Капсула АСБ \geq 65 мкм, % (n) (n=29)	р для кр. χ^2 Фишера	ОШ (95% ДИ)
ТТ	71,4 (25)	44,8 (13)	0,10	3,08 (0,93-10,18)
ТС	19,0 (4)	48,3 (14)		0,25 (0,07-0,93)
СС	9,5 (2)	6,9 (2)		1,42 (0,18-10,99)
Аллель Т	81,0	69,0	0,26	
Аллель С	19,0	31,0		

Единственным фактором, ассоциированным со стабильностью АСБ, определяемой макроскопически, является полиморфизм Pro141Leu гена PLAУ. В подгруппе пациентов с макроскопически стабильными АСБ аллельные частоты не отличаются, тогда как в группе пациентов с нестабильными АСБ аллель Р встречается чаще (84,5%, рисунок 3.10). Данная аллель снижает гидрофобность крингл-домена uРА, что, возможно, приводит к уменьшению ее сродства к межклеточному матриксу. С толщиной капсулы АСБ, как и в случае с ИМ,

ассоциирован полиморфизм T(-516)C гена PLAUR. Аллель T, связанная с повышенным уровнем экспрессии uPAR, предопределяет развитие АСБ с истонченной капсулой. Из-за небольшого размера выборки в однофакторном анализе не была показана значимость генотипа TT, однако при многофакторном анализе он играл существенную роль. Полиморфизм T(-516)C и масса тела были независимыми факторами, ассоциированными с толщиной капсулы АСБ, однако при анализе их сочетаний только генотип TT при нормальной массе тела был связан с развитием АСБ с истонченной капсулой – ОШ=10,16; 95%ДИ (2,57-40,16).

Полиморфизм T(-516)C гена PLAUR, связанный с уровнем экспрессии uPAR, является общим фактором, ассоциированным с развитием ИМ без верифицированной стенокардии и АСБ с истонченной капсулой. Из традиционных ФР значимую роль играло ожирение: нормальная МТ ассоциировалась с истончением капсулы АСБ и, в некоторых случаях, с развитием ИМ без ранее верифицированной стенокардии. Данные эффекты могут быть связаны с действием адипокинов, например, лептина и адипонектина, и требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. В исследуемой выборке мужчин в возрасте <55 лет с вероятностью развития инфаркта миокарда при наличии или отсутствии верифицированной стенокардии напряжения был ассоциирован полиморфизм генов CX37 и NOS3:

- комбинации генотипов SS+EE, SS+ED, PS+EE и SS+DD чаще встречаются при инфаркте миокарда без верифицированной стенокардии напряжения
- комбинации генотипов PP+DD, PP+ED и PS+DD чаще встречались в группе пациентов, перенесших ИМ на фоне других проявлений ИБС.

2. В исследуемой выборке мужчин, перенесших инфаркт миокарда в возрасте <55 лет, частота традиционных факторов риска не была ассоциирована с отсутствием верифицированной стенокардии напряжения.

3. В исследуемой выборке мужчин в возрасте <55 лет с нормальной массой тела, не являющихся носителями значимых в отношении вероятности развития инфаркта миокарда комбинаций генотипов CX37 и NOS3, инфаркт миокарда без верифицированной стенокардии напряжения чаще развивался при наличии генотипа MMP2 (-1306)CC.

4. В исследуемой выборке полиморфизм Pro141Leu гена PLAУ был связан с вариантом развития атеросклеротических бляшек в сонных артериях (атероматозные или фиброзные атеросклеротические бляшки), а полиморфизм T(-516)C гена PLAUR ассоциировался с истончением капсулы атеросклеротической бляшки (<65 мкм).

5. В исследуемой выборке нормальная масса тела при наличии варианта полиморфизма (-516) TT гена PLAUR была ассоциирована с более частым обнаружением в сонных артериях атеросклеротических бляшек с тонкой капсулой (<65 мкм). Частота прочих традиционных факторов риска не была связана с морфологией атеросклеротических бляшек.

6. Вариант (-516) TT гена PLAUR является общим фактором, ассоциированным как с развитием инфаркта миокарда без верифицированной стенокардии напряжения, так и с истончением капсулы атеросклеротической бляшки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на изучение роли системы uPA в атерогенезе и дестабилизации АСБ с целью создания в будущем новых лекарственных препаратов.

2. У лиц мужского пола в возрасте <55 лет для выявления склонности к развитию ИМ как манифестации ИБС целесообразно применение двухступенчатого алгоритма диагностики: определение полиморфизма генов CX37 и NOS3 с последующим (при необходимости) определением полиморфизма гена MMP2 и его оценки в сочетании с учетом отсутствия или наличия ожирения.

3. У лиц мужского пола в возрасте <55 лет с нормальной МТ для определения вероятности наличия нестабильных АСБ целесообразно определение полиморфизма генов PLAУ и PLAUR.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Балацкий А.В., Макаревич П.И., Самоходская Л.М., Бочков В.Н. Ассоциация полиморфизма 4G/5G промоторной области гена PAI-1 с ранним развитием ИБС. Сборник лучших докладов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». 2005. Т. 2. С. 225-31.

2. Балацкий А.В., Макаревич П.И., Андреев Е.Ю., Лалаянц М.Р., Самоходская Л.М., Бочков В.Н. Роль полиморфизма генов системы гемостаза в раннем развитии ИБС. I Международная (X Всероссийская) Пироговская студенческая научная медицинская конференция, Москва, 2006 г. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2006. №2. С. 341.

3. Andreenko E.Y., Meshkov A.N., Balatsky A.V., Makarevich P.I., Lalayanc M.R., Malyshev P.P., Bochkov V.N., Samohodskaya L.M., Tkachuk V.A. Role of hemostatic gene polymorphisms in the early development of coronary artery disease. *Atherosclerosis Supplements*. 2006. 7(3). С. 89.

4. Kuznetsova T.Y., Dudanov I.P., Gavrilov D.V, Balatskiy A.V., Makarevich P.I., Parfjonova E.V., Samokhodskaja L.M. Polymorphism Glu298Asp of endothelial nitric oxide synthase gene and its influence on incidence of atherosclerosis in patients with arterial hypertension. *Atherosclerosis Supplements*. 2007. 8(1). С. 55-56.

5. Е.Ю. Андреев, П.И. Макаревич, А.В. Балацкий, М.Р. Лалаянц, А.Н. Мешков, П.П. Малышев, В.В. Кухарчук, Л.М. Самоходская. Роль полиморфизма генов системы гемостаза в раннем развитии ишемической болезни сердца. Молекулярный полиморфизм человека: структурное и функциональное разнообразие биомолекул: Монография. Т. 1/ Под ред. С.Д. Варфоломеева. М.: РУДН, 2007. С. 312-336.

6. Кузнецова Т.Ю., Гаврилов Д.В., Самоходская Л.М., Балацкий А.В., Макаревич П.И., Парфенова Е.В., Дуданов И.П. Комплексный анализ факторов риска развития ишемической болезни сердца у пациентов с артериальной гипертензией. Материалы Российского национального конгресса кардиологов «Повышение качества и доступности кардиологической помощи». Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2008. Т. 7. № S2. С. 201b-202.

7. Кузнецова Т.Ю., Дуданов И.П., Гаврилов Д.В., Парфенова Е.В., Самоходская Л.М., Балацкий А.В., Макаревич П.И. Хроническая сердечная недостаточность у пациентов с артериальной гипертензией и полиморфизмы Glu298Asp гена эндотелиальной NO синтазы и C242Trp22phox гена NADPH оксидазы. Журнал Сердечная недостаточность. 2007. Т.8. №6(44). С. 274-278.

8. Кузнецова Т.Ю., Гаврилов Д.В., Дуданов И.П., Макаревич П.И., Балацкий А.В., Самоходская Л.М., Парфенова Е.В. Влияние полиморфизмов эндотелиальной NO синтазы и NADPH-оксидазы на развитие осложнений артериальной гипертензии. Кардиология. 2008. №3. С. 27-33.

9. Макаревич П.И., Андреев Е.Ю., Балацкий А.В., Колотвин А.В., Попова Н.О., Яровая Е.Б., Самоходская Л.М., Ткачук В.А. Комбинации аллелей генов NOS3 и CYBA и риск развития эссенциальной артериальной гипертензии у мужчин. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2010. Т.9. №3. С. 4-9.

10. Самоходская Л.М., Андреев Е.Ю., Балацкий А.В., Ершова А.И., Макаревич П.И. Определение индивидуального генетического риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Методическое пособие по молекулярной генетике / Научный редактор академик РАН и РАМН В.А.Ткачук Издательство Московского Университета. М.:2010. 80 с.

11. Балацкий А.В., Андреев Е.Ю., Самоходская Л.М. Полиморфизм гена коннексина-37: новый фактор риска развития инфаркта миокарда. Материалы международной конференции «Современная кардиология: эра инноваций», Томск, 24–25 июня 2010 г. Сибирский медицинский журнал. 2010. Т. 25. №2(1). С. 64-65.

12. Андреевко Е.Ю., Балацкий А.В., Макаревич П.И., Самоходская Л.М. Сочетанное влияние генетических и традиционных факторов риска на развитие ишемической болезни сердца. Материалы российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург, 6-9 июня 2010 г. Клинико-лабораторный консилиум. 2010. №2-3(33-34). С. 146.

13. Балацкий А.В., Андреевко Е.Ю., Самоходская Л.М., Бойцов С.А. Роль полиморфизма гена коннексина-37 в развитии инфаркта миокарда. Материалы российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург, 6-9 июня 2010 г. Клинико-лабораторный консилиум. 2010. №2-3(33-34). С. 149.

14. Андреевко Е. Ю., Самоходская Л. М., Балацкий А. В., Макаревич П. И., Бойцов С. А. Прогностическая значимость носительства аллельных вариантов генов, контролирующих систему гемостаза, и их сочетания с традиционными факторами риска в раннем развитии ишемической болезни сердца. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011. №8. С. 32-39.

15. Балацкий А.В., Самоходская Л.М., Ткачук В.А. Молекулярно-генетические аспекты образования и деградации межклеточного матрикса в процессе атерогенеза / Постгеномные исследования и технологии: Монография, Сост.: Зайцева Е.А., Найдич В.И. Под ред. Варфоломеева С.Д. М.: МАКС Пресс. 2011. С. 509-529.

16. Самоходская Л.М., Балацкий А.В., Садекова О.Н., Таратина О.В. и др. Молекулярно-генетический анализ предрасположенности человека к мультифакторным заболеваниям: Монография / Научный редактор академик РАН и РАМН В.А. Ткачук. М.: Издательство Московского университета. 2011. 388 с.

17. Патент на изобретение № 2469096: «Способ определения наследственной предрасположенности к развитию инфаркта миокарда у лиц без клинических проявлений ишемической болезни сердца». Авторы: Балацкий А.В., Андреевко Е.Ю., Самоходская Л.М., Бойцов С.А., Ткачук В.А. Заявка №2011107170, дата регистрации 28.02.2011, опубликовано 10.12.2012.

18. Bulinskii A.V., Butkovskii O.A., Sadovnichy V.A., Shashkin A.P., Yaskov P.A, Balatskiy A.V., Samokhodskaya L.M., Tkachuk V.A. Statistical Methods of SNP Data Analysis and Applications. Open Journal of Statistics. 2012. 2. С. 73-87.

19. Сагинова Е.А., Галлямов М.Г., Балацкий А.В., Колотвин А.В., Самоходская Л.М., Фомин В.В., Краснова Т.Н., Мухин Н.А. Ремоделирование сердечно-сосудистой системы и формирование хронической болезни почек у больных с метаболическим синдромом и ожирением: роль генов eNOS, субъединицы p22-phox NADPH-оксидазы и MTHFR. Терапевтический архив. 2012. Т.84. № 6. С. 26-31.

20. Балацкий А.В., Андреевко Е.Ю., Самоходская Л.М., Бойцов С.А., Ткачук В.А. Полиморфизм генов эндотелиальной NO-синтазы и коннексина-37 как фактор риска развития инфаркта миокарда у лиц без коронарного анамнеза. Терапевтический архив. 2013. Т. 85. № 9. С. 18-22.