

ВКЛАД ГЕНОВ PAI-1 (ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА) И LDLR (ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНА НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ) В КОМПЛЕКС ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ПРИВОДЯЩИХ К ИНФАРКТУ МИОКАРДА

Генетическая предрасположенность к острому инфаркту миокарда (ИМ) исследована по полиморфным вариантам генов PAI-1 (ингибитора активатора плазминогена) и LDLR (гена рецептора липопротеина низкой плотности). Разработаны усовершенствованные методы молекулярно-генетического анализа. Показано, что наличие генотипа 4G/4G гена PAI-1 и аллелей с 8 TA-повторами гена LDLR является фактором 2-3-х кратного увеличения риска развития ИМ. Проведено сравнение частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в разных странах Европы, показано, что генотип 4G/4G гена PAI-1 является наиболее информативным для определения генетической предрасположенности к ИМ.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, генные полиморфизмы, 4G/5G гена PAI-1, TA-повторы гена LDLR, популяционные частоты в странах Европы.

Генетична схильність до гострого інфаркту міокарда (ІМ) досліджена за поліморфним варіантів генів PAI-1 (інгібітора активатора плазміногену) і LDLR (гена рецептора ліпопротеїна низької щільності). Розроблено вдосконалені методи молекулярно-генетичного аналізу. Показано, що наявність генотипу 4G/4G гена PAI-1 і алелів з 8 TA-повторами гена LDLR є фактором 2-3-х кратного збільшення ризику розвитку ІМ. Проведено порівняння частот генотипів ризику ІМ з рівнями цього захворювання в різних країнах Європи, показано, що генотип 4G/4G гена PAI-1 є найбільш інформативним для визначення генетичної схильності до ІМ.

Ключові слова: інфаркт міокарда, генні поліморфізми, 4G/5G гена PAI-1, TA-повтори гена LDLR, популяційні частоти в країнах Європи.

Genetic predisposition to myocardial infarction (MI) is investigated using polymorphisms 4G/5G of PAI-1 gene and TA-repeats of LDLR gene. The new improved methods of molecular-genetic analysis were elaborated and used. It was shown that 4G/4G genotype of PAI-1 gene and alleles with 8 TA-repeats of LDLR gene are risk factors of 2-3 times increase of MI. The comparison of MI predisposition genotypes frequencies with the levels of this disease in different countries of Europe was performed. We revealed statistically significant positive correlation between the frequencies of MI morbidity and 4G/4G genotype. The obtained data allows conclusion that genotype 4G/4G of PAI-1 gene is the most informative for evaluation of genetic predisposition to MI.

Key words: myocardial infarction, gene polymorphisms, 4G/5G of PAI-1 gene, 8 TA-repeats of LDLR gene, population frequencies in European countries.

Артериальный тромбоз и его клинические проявления являются главной причиной смерти в развитом мире. Тромбозирование артериальных сосудов играет большую роль в патогенезе наиболее частых и опасных заболеваний человека. Смертность от ИБС и ишемической болезни мозга составляет 40-45 %. Частота тромбозов артерий сердца при ИМ составляет 85-70 %

Атеротромбозы являются результатом воздействия на организм комплекса экологических и генетических факторов. Наиболее известными средовыми факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) являются курение, избыточная масса тела, гиподинамия и др. Среди генетических факторов наиболее важной является система гемостаза и антигемостаза [1; 2].

В норме вероятность события, приводящего к развитию тромбофилий, и как следствие этого, сердечно-сосудистых заболеваний, определяется смещением систем гемостаза и антигемостаза в сторону преобладания одной из этих систем над другой. При воздействии же неблагоприятных факторов внешней среды, нарушение равновесия между системами может проявиться в виде тромбоза. Мутации и полиморфные варианты генов систем гемостаза и антигемостаза определяют, насколько сильным должно быть внешнее воздействие, чтобы произошло тромбообразование.

До настоящего времени предотвращение артериальной тромботической болезни состояло из модификации традиционных факторов риска развития и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются в значительной степени экологическими (средовыми). Приблизительно половина всех тромботических событий происходит у пациентов без таких факторов риска, и эпидемиологические исследования демонстрируют, что они являются недостаточными для объяснения полной вариации степени и риска атеротромбоза [3; 4].

Исследования показали, что наследственные факторы риска вносят существенный вклад в развитие коронарной болезни сердца и инсульта. Таким образом, в период расшифровки человеческого генома, исследователи уделяют внимание молекулярной генетике тромбоза и атеросклероза с целью улучшения понимания патофизиологии артериального тромбоза. Идентифицирован диапазон определенных генов, способствующих риску развития заболевания. Большинство их отлично от тех, которые вовлечены в венозный тромбоз, поскольку эти две патологии имеют фундаментальные биологические различия.

Полиморфизм 4G/5G гена PAI-1 (ингибитора активатора плазминогена 1, одного из основных компонентов тромболитической плазминоген-плазминовой системы) широко изучается в связи с риском развития острой сосудисто-коронарной патологии, венозного тромбоза, эклампсии и других сосудистых расстройств.

Показано, что уровень PAI-1 в плазме крови ассоциирован с полиморфизмом в области промотора гена PAI-1, представляющего собой однонуклеотидную делецию/инсерцию гуанина (4G/5G). Люди, гомозиготные по 4G аллелю, обладают более высоким уровнем содержания PAI-1 в плазме, а гомозиготные по 5G аллелю, более низким. Механизм, лежащий в основе аллельных различий в уровне синтеза PAI-1, был установлен после обнаружения того, что оба аллеля могут связываться с активатором транскрипции гена, тогда как аллель 5G также имеет сайт связывания с транскрипционным репрессором. Отсутствие действия репрессора и обеспечивает более высокий уровень транскрипции гена PAI-1 с аллелем 4G [5].

В норме в крови находится неактивный предшественник плазмينا плазминоген. Активаторов плазминогена в организме достаточно много. Одним

из основных компонентов антисвертывающей системы крови является ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) [10]. Этот белок регулирует тканевый и урокиназный активаторы плазминогена. PAI-1, обеспечивает до 60 % общей ингибиторной активности в отношении активатора плазминогена в плазме и тем самым играет важную роль в регуляции фибринолиза. Повышение уровня PAI-1 связано с увеличением риска тромбозов [6].

Развитие сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического характера также напрямую зависит также от роста концентрации холестерина, обусловленного недостаточной скоростью удаления липопротеина низкой плотности (ЛНПД) из плазмы крови. Избыток ЛНПД – один из основных факторов риска атеросклероза. Около 70 % ЛНПД удаляется из крови в печени с помощью высокоспецифичных рецепторов. Рецептор ЛНПД человека кодируется геном LDLR, находящимся на 19-ой хромосоме. Ген рецептора общей протяженностью 45 т.п.н. состоит из 18 экзонов и 17 интронов [7].

В гене LDLR выявлено несколько полиморфных сайтов – различных вариантов последовательности, как точечных нуклеотидных замен, так и микросателлитных повторов, которые могут иметь функциональную значимость в отношении активности кодируемого белка. Одним из потенциально информативных ДНК-маркеров такого рода может оказаться полиморфизм микросателлитных TA-повторов, расположенных в 18 экзоне гена, который кодирует участок цитоплазматического домена белка, не играющий решающей роли в связывании липопротеинов. Поэтому изменения нуклеотидной последовательности в нем не проявляются как мутации, приводящие к развитию тяжелой гиперхолестеринемии. Однако по данным литературы один из аллелей этого полиморфизма достоверно чаще встречается у лиц, имеющих избыточный вес вследствие нарушения обмена холестерина [8].

Для того чтобы установить возможную ассоциацию аллелей полиморфизма с предрасположенностью к ИМ необходимо было изучить их частоту в группах пациентов с соответствующей патологией и сравнить их с данными, полученными для контрольной группы.

Материалы и методы

Анализировали генотипы и аллели полиморфизмов 4G/5G гена PAI-1 и (TA)_n гена LDLR. В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов крови (или экстрагированную из пятен капиллярной крови, взятой из пальца, и высушенной на специальных бланках, что намного дешевле, чем в случае выделения ДНК из цельной крови).

Полиморфизм гена PAI-1 оценивали разработанным нами методом (рис. 1), позволяющим определять аллели полиморфизма, представляющие собой однонуклеотидную делецию/инсерцию гуанина 4G/5G, напрямую, по разнице в размере фрагмента ДНК, составляющей 1 нуклеотид [9]. Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и автомати-

ческого капиллярного электрофореза состоит в том, что для анализа образцов ДНК в продукт ПЦР вводят флуоресцентную метку в процессе амплификации (рис. 1). Для этой цели синтезирован меченый вариант

прямого праймера PAI-1F, имеющий молекулу «репортера» 6-FAM на 3' конце:

PAI-1F – CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-FAM

PAI-1R – CCAACAGAGGACTCTTGGTCT

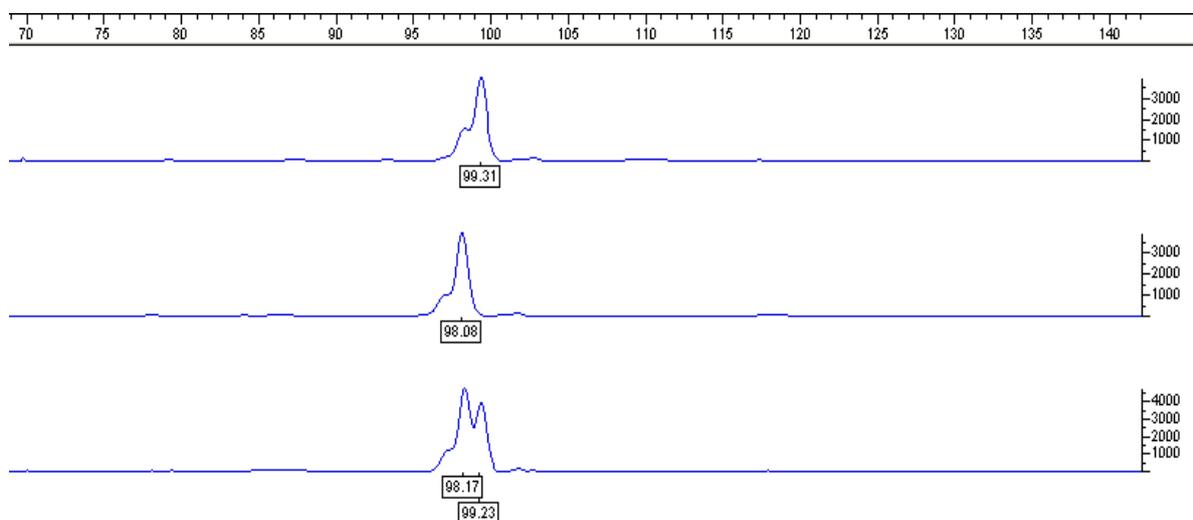


Рис. 1. Варианты генотипа по полиморфизму 4G/5G гена PAI-1, идентифицированные в ходе проведения исследования: 1 – аллели 5/5, 2 – аллели 4/4, 3 – аллели 4/5

Продукты ПЦР анализируются с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310. Обработку данных и определение аллелей выполняют с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN (Applied Biosystems).

Для анализа аллелей полиморфизма (TA)_n повторов в 18 экзоне гена LDLR амплификацию проводят с праймерами, фланкирующими участок ДНК, содержащий TA-повторы. Продукты ПЦР анализируют с помощью автоматического капиллярного электро-

фореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (рис. 2).

Концентрации общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХСЛПНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ХСЛПВП) в сыворотке крови определяли с использованием стандартных реактивов, затем вычисляли отношение ОХС к ХСЛПВП и ХСЛПНП к ХСЛПВП. Содержание фибриногена (ФГ) определяли турбидиметрически с помощью автоматизированного фотометрического коагулометра.

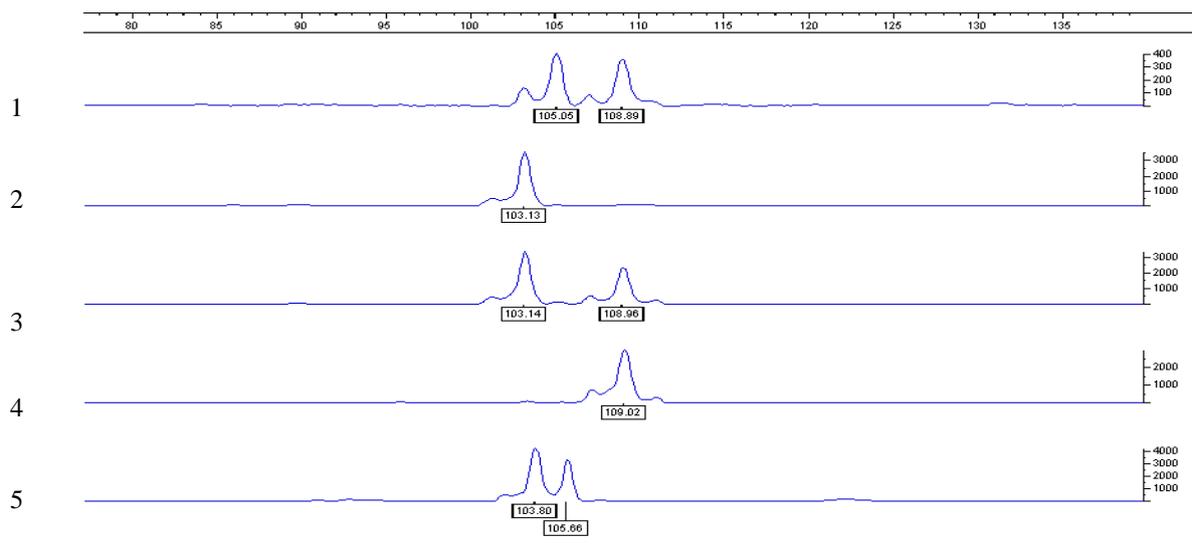


Рис. 2. Варианты генотипов по полиморфизму гена LDLR, идентифицированные в ходе проведения исследования: 1 – аллели 8/10, 2 – 7/7, 3 – 7/10, 4 – 10/10, 5 – 7/8

Использованы данные анамнеза 132 человек с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В исследование включали пациентов ИБС со стабильной

стенокардией и острыми коронарными синдромами. Анализ факторов риска включал: наличие артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа,

избыточной массы тела (гиперстения), тахикардии и курение сигарет. Изучен семейный анамнез (наличие у родственников 1 степени родства инфарктов миокарда, инсультов, смерти от сердечно-сосудистых заболеваний в раннем возрасте).

Результаты и обсуждение

Исследованы аллели гена PAI-1 в группе из 132 человек (264 хромосомы). Распределение генотипов, а также частоты отдельных аллелей полиморфизма 4G/5G гена PAI-1 приведены в табл. 1

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма 4G/5G гена PAI-1

	Генотип			Аллели	
	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G
контрольная группа	43 (28,7 %)	75 (50 %)	32 (21,3 %)	161 (54,1 %)	139 (45,9 %)
пациенты с ИМ	43 (41,2 %)	62 (42,5 %)	25 (16,3 %)	100 (62,5 %)	60 (37,5 %)

Сравнительный анализ частот аллелей полиморфизма 4G/5G гена PAI-1 среди пациентов и в контрольной группе, свидетельствует о том, что генотип 4G/4G гена PAI-1, частота которого в популяции составляет 28,7 %, является предрасполагающим к возникновению инфаркта миокарда (OR = 1,44), а 5G/5G – протекторным.

Полученные нами результаты для популяции Беларуси хорошо согласуются с данными, полученными в США и Швеции [10-13] – частоты генотипов полиморфизма 4G/5G гена PAI-1 в различных популяциях представлены в табл. 2.

Нами проведен сравнительный анализ частот генотипов риска ИМ с уровнями этого заболевания в ряде стран Европы (рис. 3). Большинство средовых факторов риска, таких как мало подвижный образ жизни, стрессы, диабет и другие, связаны с уровнем

социального и экономического развития страны, поэтому частота заболеваний во многом зависит от образа жизни людей в разных странах и может не совпадать с частотой генетических факторов риска.

Тем не менее в ходе статистического анализа данных была выявлена достоверная положительная корреляционная зависимость между частотой заболеваемости ИМ и частотой генотипа 4G/4G гена PAI-1 ($r = 0,8871$, $P < 0,0447$), в отличие от других известных факторов риска, частоты которых в разных странах не коррелируют с уровнем заболеваемости ИМ [14]. Это свидетельствует о том, что данный генотип вносит существенный вклад в развитие заболевания и является наиболее информативным для определения генетической предрасположенности к ИМ.

Таблица 2

Частоты генотипов (в процентах) по полиморфизму 4G/5G гена PAI-1 в популяциях разных стран

Генотипы	Популяции разных стран		
	Беларусь	США	Швеция
4/4	28,7	29,0	31,0
4/5	48,7	47,1	47,2
5/5	21,6	24,0	22,1

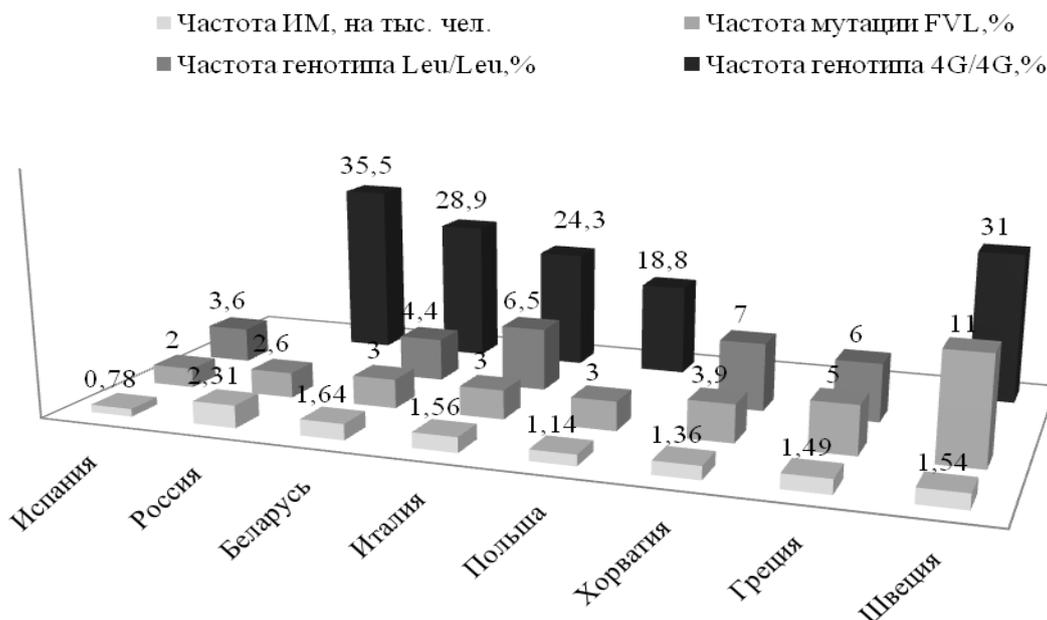


Рис. 3. Сравнение частот генотипов риска ИМ с уровнями заболеваемости ИМ в разных странах

Исследование роли гена LDLR в генетической предрасположенности к ИМ выполнено нами впервые. Анализ динуклеотидных ТА повторов экзона 18 гена LDLR выполнен в образцах ДНК 150-ти человек контрольной группы среди жителей Беларуси и 150-ти пациентов с инфарктом миокарда. В общей сложности частота аллелей полиморфизма исследована в 600 хромосомах.

При исследовании структуры полиморфизма (ТА)_n в 18 экзоне гена LDLR нами идентифицированы все три аллеля, описанные в литературе [15], имеющие 7, 8 и 10 ТА-повторов, а также редкий аллель с 11-ю ТА-повторами (рис. 2).

В группе пациентов с ИМ показано значимое увеличение частоты аллеля 8 ТА по сравнению с

контролем – OR = 3.27 (95 % CI 1.43 – 7.47). Эти результаты указывают на то, что наличие в генотипе аллеля с 8 ТА-повторами в 18 экзоне гена LDLR является фактором более, чем 3-х кратного увеличения риска развития ИМ (табл. 3). Анализ ассоциации генотипа пациентов с возрастом, в котором произошёл инфаркт, показал, что среди пациентов с инфарктом миокарда в возрасте до 55 лет встречаемость аллеля 8 ТА составляет 15,1 %.

Кроме того, среди пациентов с ИМ выявлено несколько генотипов, которые не встречаются в контрольной выборке. Это случаи гомозиготного носительства аллеля 8, а также генотипы с редким аллелем 11, который обнаружен только у пациентов (табл. 4).

Таблица 3

Сравнение частот аллелей (ТА) повторов гена LDLR у пациентов с ИМ и в контроле

Аллели	Пациенты с ИМ	Контрольная группа	OR	95 % CI
	Количество хромосом	Количество хромосом		
7	123	132	0,82	0,54 – 1,24
8	24	8	3,27	1,43 – 7,47
10	50	60	0,78	0,50 – 1,21
11	3	–	–	–
Всего	200	200		

Таблица 4

Сравнение частот генотипов по (ТА) повторам гена LDLR у пациентов с ИМ и в контроле

Генотип	Пациенты с ИМ	Контрольная группа	χ^2	p-
	Количество генотипов	Количество генотипов		
7/7	39	48	1,65	0,199
7/8	10	3	4,03	0,04
7/10	33	33	–	–
7/11	2	–	2,02	0,155
8/8	2	–	2,02	0,155
8/10	9	5	1,23	0,267
8/11	1	–	–	–
10/10	4	11	3,53	0,06
Всего	100	100		

Таким образом, генотипирование по (ТА)_n полиморфизму 18 экзона гена LDLR является весьма информативной составляющей комплексного теста генетической предрасположенности к инфаркту миокарда.

У лиц с ССЗ, имеющих в генотипе аллель 4G гена PAI-1 и аллель 8 ТА-повторы гена LDLR, риск возникновения инфаркта миокарда значительно гораздо выше, чем у индивидов, у которых данные аллели отсутствуют. Среди носителей аллеля риска 4G было выявлено меньшее количество лиц с сахарным диабетом второго типа [95 % CI 0,06-1,17, p = 0,0662] по сравнению с группой лиц, носителей протекторного аллеля 5G. Концентрации ОХС и ХСЛПНП в сыворотке были достоверно ниже в группе пациентов, имеющих в генотипе аллели 4G и 8 ТА (p = 0,038 и p = 0,097). В группе носителей аллелей 4G и 8 ТА содержание ФГ в плазме крови было достоверно выше по сравнению с группой лиц, у которых данные аллели отсутствуют (p = 0,001), что может способствовать тромбообразованию и, как следствие, развитию ИМ.

Заключение

Разработана методика эффективного выявления генетической предрасположенности к ИМ на основе тестирования аллелей 4G гена PAI-1 и 8 ТА-повторов гена LDLR в комплексе с клинико-биохимическими параметрами. Преимущества данной методики:

1) в качестве биологического материала используются пятна капиллярной крови, высушенной на специальных бланках, что намного дешевле, чем в случае выделения ДНК из цельной крови; позволяет хранить и пересылать по почте бланки с образцами крови;

2) анализируется частота полиморфизма 4G/5G гена PAI-1, который является наиболее информативным при анализе генетической предрасположенности к ИМ.

3) методика анализа полиморфизмов 4G/5G гена PAI-1 и (ТА)_n повторов в 18 экзоне гена LDLR является единственной, в которой аллели определяются напрямую по разнице в размере фрагмента ДНК, составляющей 1 нуклеотид. Преимущества данного метода:

- возможность прямого определения размера фрагментов ДНК, соответствующих каждому аллелю;
 - более высокая чувствительность (достаточно 1 нг ДНК);
 - отсутствие необходимости в коммерческих наборах;
 - более низкая себестоимость (50 тыс. руб. вместо 50 \$);
 - меньшее время анализа (3 часа вместо 11-15 часов);
 - малое количество ручных операций;
 - высокая разрешающая способность (дает возможность проводить интерпретацию полученных данных практически в 100 % случаев, максимально уменьшая количество повторных анализов).
 1. Анализ комплекса генетических и клинико-биохимических факторов.
 2. Математический анализ полученных результатов.
- Все это позволяет более корректно и с меньшими затратами средств и труда осуществлять оценку риска развития инфаркта миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Genetic aspects of ischemic stroke / S. Stanković [et al.] // *Jugoslav Med Biochem.* – 2005. – Vol. 24. – P. 225-239.
2. Voetsch, B. Genetic determinants of arterial thrombosis / B. Voetsch, J. Loscalzo // *Arterioscler ThrombVasc Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 216-229.
3. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke.* 2004;35 :212–227.
4. Marenberg ME, Zdravkovic S, Pedersen NL, deFair U. The effect of age on the genetic susceptibility to mortality from stroke in men and women: 35 years of follow-up in the Swedish Twin Registry. 29th International Stroke Conference, San Diego, Calif; 2004.
5. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism, coronary thrombosis, and myocardial infarction in middle-aged Finnish men who died suddenly./ J. Mikkelsen [et. al.] // *Thromb Haemost.* – 2000. – Vol. 84. – P. 78–82.
6. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. / Per-Gunnar Wiklund [et al.] // *Stroke.* – 2005. – Vol. 36. – P. 1661-1665.
7. Hobbs H. H., Brown M. S., Goldstein J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia // *Human Mutation.* – 1992. – Vol. 1. P. 445-466.
8. Rutherford S., Nyholt D. R., Curtain R. P., Quinlan S. R., Gaffney P. T., Morris B. J., Griffiths L. R. Association of a low density lipoprotein receptor microsatellite variant with obesity // *International Journal of Obesity* 1997; Vol. 21, P. 1032-1037
9. А. Л. Гончар, И. Б. Мосса, А. А. Иванов, Н. И. Мосса, К. А. Мосса. Ассоциация полиморфных вариантов гена PAI-1 и мутации Factor V Leiden с генетической предрасположенностью к инфаркту миокарда. «Молекулярная и прикладная генетика», т. 9. 2009 г. С 114-120.
10. Festa; R. D'Agostino; N. S. Jenny; R. P. Tracy; S. M. Haffner. Insulin Resistance Atherosclerosis Study The Activator Inhibitor-1 Levels in Blacks, Hispanics, and Non-Hispanic Whites: Promoter (4G/5G) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genotype and Plasminogen / *Circulation.* 2003;107: 2422–2427.
11. K. Jood, P. Ladenvall, A. Tjärnlund-Wolf, C. Ladenvall, M. Andersson, S. Nilsson, C. Blomstrand, C. Jern. Fibrinolytic Gene Polymorphism and Ischemic Stroke / *Stroke.* 2005; 36: 2077–2081.
12. P.-G. Wiklund, L. Nilsson, S. Nilsson-Ardnor, P. Eriksson, B. Stegmayr, A. Hamsten, D. Holmberg, K. Asplund. Cohorts Replicated Findings in Two Nested Case-Control Studies Based on Independent Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism and Risk of Stroke / *Stroke.* 2005; 36: 1661–1665.
13. Гончар А. Л., Мосса И. Б., Иванов А. А., Мосса Н. И., Мосса К. А. Полиморфные варианты генов системы тромбообразования и их роль в развитии инфаркта миокарда. Журнал «Артериальная гипертензия», 2009, Т. 15, № 4 . С. 466-469.
14. И.Б. Мосса, А. Л. Гончар, К. В. Жур, М. Д. Амелянович, П. М. Морозик «Сравнение популяционных частот генетических факторов риска инфаркта миокарда с уровнями этого заболевания в разных странах Европы» Молекулярная и прикладная генетика. Т. 11. Минск 2010. С. 45-54.
15. Zuliani G, Hobbs HH. Dinucleotide repeat polymorphism at the 3' end of the LDL receptor gene // *Nucleic Acid Res* 1990; 18: 4300.

Рецензенти: Корольов В. Г., д.б.н., професор;
Гродзинський Д. М., академік НАН України, д.б.н., професор

© Мосса И. Б., Мосса К. А., Буко И. В.,
Полонецкий Л. З., Гончар А. Л., 2011

Стаття надійшла до редколегії 05.10.2011 р.