

На правах рукописи

Стрюкова Евгения Витальевна

**ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И ФАКТОРЫ ГЕМОСТАЗА У
ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНЫМИ И НЕСТАБИЛЬНЫМИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМИ
БЛЯШКАМИ**

14.01.05 - Кардиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Максимов Владимир Николаевич

Научный консультант:

доктор биологических наук

Каштанова Елена Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент

Кашгалап Василий Васильевич

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», заведующий отделом клинической кардиологии)

доктор медицинских наук

Назаренко Мария Сергеевна

(Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томского Национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, руководитель лаборатории популяционной генетики)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в 14-00 на заседании Диссертационного Совета Д 003.011.02 созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН (630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1, <https://iimed.ru>)

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета

доктор медицинских наук

С. В. Мустафина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы.

Распространенность атеросклеротических повреждений сосудов и смертность от сердечно-сосудистых осложнений остаются высокими в России. Пусковым механизмом к клиническим проявлениям атеросклероза является нарушение целостности эндотелия на участке изъязвления/деструкции покрышки нестабильной атеросклеротической бляшки, последующее тромбообразование и окклюзия артерии, ишемия и некроз миокарда [Рагино Ю.И. и соавт. 2008; Waksman R. et al., 2007].

Примерно 60% инфарктов миокарда (ИМ) вызваны разрывом бляшки [Casscells W. et al., 2003]. Нестабильные атеросклеротические бляшки, имеющие уязвимую, нестабильную структуру, являются наиболее частой причиной острого коронарного синдрома (ОКС) [Fuster V., et al., 2005].

Известно, что на начальном этапе развития атеросклеротической бляшки важную роль играют эндотелиальная дисфункция и окислительные изменения, в то время как на стадии развития нестабильной бляшки ярко выражена активность воспалительных и деструктивных процессов [Рагино Ю.И. и соавт., 2012; Virmani R. et al., 2006; Niccoli G. et al., 2014]. Дисфункция и деструкция эндотелиоцитов приводит к повышенной секреции ими адгезивных молекул, хемоаттрактантов, к высвобождению в кровь эндотелина-1, фактора Виллебранда, снижению синтеза и секреции NO. В то же время, известно, что нарушения системы гемостаза сопровождают практически все этапы развития атеросклеротического очага. Компоненты системы гемостаза не только участвуют в тромбировании пораженных участков сосудов, но и могут играть важную роль в процессе формирования и прогрессирования атеросклеротических стенозов [Fishbein M. C. et al., 2010; Рагино Ю.И. и соавт., 2011].

В настоящее время известно, что помимо различных факторов, имеющих большое значение в развитии атеросклеротического очага: повышенных концентраций в крови общего холестерина, маркеров воспаления и эндотелиальной дисфункции, курения, ожирения, сахарного диабета 2 типа, генетические факторы также способствуют развитию атеросклероза [Kalayi Nia S. et al., 2017; Abraham G. et al., 2016; de Vries M. A. et al., 2017].

Исследования с помощью современных высокотехнологичных методов молекулярно-генетического анализа, дающие возможность выявить влияние некоторых полиморфизмов генов эндотелиальной дисфункции и гемостаза на прогрессирование атеросклеротического процесса, становятся все более актуальными. Это особенно важно для молодых пациентов, у которых традиционные факторы риска выражены слабо.

Среди маркеров нарушения эндотелиальной функции, воспаления и гемостаза изменение концентраций моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), интерлейкина-6 (IL-6), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), фактора VII, фактора II по данным литературы ассоциированы с атеросклеротическими явлениями. Полиморфизмы генов, кодирующих эти белки, могут влиять на их структуру, концентрацию или функцию и тем самым приводить к усугублению эндотелиальной дисфункции и более тяжелому течению атеросклероза.

Вышеизложенное позволяет считать актуальным изучение биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции и гемостаза с целью поиска ассоциаций их с коронарным атеросклерозом и наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, а также изучение некоторых полиморфизмов генов в группах пациентов со стабильными и нестабильными атеросклеротическими бляшками в коронарных артериях и концентрацию белков, кодируемых этими генами, в плазме крови.

Степень разработанности темы

Работ, изучающих связь маркеров эндотелиальной дисфункции с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях как в зарубежной, так и в отечественной литературе недостаточно. Имеются данные о том, что уровень АДМА значительно повышается у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [Гайковская Л. Б. и соавт., 2009; Xuan C. et al., 2016] и может являться независимым предиктором степени коронарного атеросклероза и функциональной значимости ИБС [Mangiacapra F. et al., 2016]. Показано, что одним из важнейших показателей эндотелиальной дисфункции у пациентов с нестабильной стенокардией является повышенный уровень эндотелина-1 в крови. Данный маркер может выступать в качестве независимого маркера как риска сердечно-сосудистых исходов у пациентов со стабильной ИБС [Zhou B. Y. et al., 2017], так и прогноза течения заболевания у пациентов с ИБС [Либов И. А. и соавт., 2008].

Чрезмерная экспрессия на поверхности эндотелиальных клеток молекул адгезии сосудистых клеток (VCAM, ICAM) может являться прогностическим фактором для развития ИБС [Masseau I. et al., 2015]. В литературе имеется достаточно широкий спектр исследований о том, что гомоцистеин в плазме в диапазоне 15–25 мкмоль / л коррелирует с ишемической болезнью сердца [Arnesen E. et al., 1995], инсультом [Homocysteine Studies Collaboration et al., 2002], стенозом периферических артерий [Graham I. M. et al., 1997], венозным тромбозом [Den Heijer M. et al., 1998], и дефицитом фолиевой кислоты [Cheng Z. J. et al., 2009; Lai W. K. C. et al., 2015].

Имеются данные о том, что MCP-1 играет важную роль в патогенезе атеросклероза, и значительные доказательства подтверждают, что моноциты и макрофаги, содержащие MCP, влияют на рост других типов клеток в атеросклеротическом очаге [Lin J. et al., 2014]. Ряд исследований указывает на значительную связь между полиморфизмом гена *CCL2* 2518A>G и развитием ИБС [Lin H. L. et al., 2008; Lin H. L. et al., 2015]. Большое количество работ показывает ассоциации полиморфизмов гена *IL6* (в том числе 174C>G) с развитием и прогрессированием ишемической болезни сердца [Li L. et al., 2015; Lin H. L. et al., 2015; Tong Z. et al., 2013; Chen Z. et al., 2013]. Однако, в литературе не встречаются данные о связи полиморфизмов rs1024611 гена *CCL2* и rs1800795 гена *F7* именно с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек.

В отношении факторов гемостаза имеются данные о положительной и независимой связи между активностью фактора свертывания VII и сердечно-сосудистыми событиями [Cirillo P. et al., 2004]. Мета-анализы, включающие исследования полиморфизма R353Q гена *F7*, показывают противоречивые результаты. Mo X. et al. [Mo X. et al., 2011] и Shanker J. et al. выявили связь полиморфизма R353Q гена *F7* с риском сердечно-сосудистых заболеваний [Shanker J. et al., 2009]. В

других работах: Huang H. et al [Huang H. et al., 2018], Cheraghi S. et al. [Cheraghi S. et al., 2013] не выявили подобной связи. А исследование Pegoraro R. J., Ranjith N., Rom L. H показало, что полиморфизм R353Q гена *F7* может иметь даже протективную роль для сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [Pegoraro R. J. Et al., 2005].

Показано, что фактор Хагемана является биомаркером атеросклеротического повреждения сосудов [Renne T. Et al., 2012]. В отношении связи между полиморфизмами генов факторов свертывания крови VII, XII и ИБС в литературе имеются противоречивые данные [Huang H. et al., 2018; Vach J. et al., 2008].

По результатам систематического обзора данных литературы 2018 года сообщается, что уровни PAI-1 плазмы могут в перспективе использоваться в качестве маркера основных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [Jung R. G. et al., 2018]. Метаанализ, проведенный Zhang H. et al. показывает, что полиморфизм 4G/5G гена *SERPINE1* (*PAI1*) ассоциирован с ССЗ [Zhang H. et al., 2014].

Так же уровни протромбина (фактора II) и комплекса тромбин-антитромбин в плазме повышаются пропорционально тяжести течения атеросклеротического процесса, и в некоторых исследованиях прогнозировали сердечно-сосудистые события [Foley C. J. et al., 2010; Loeffen R. et al., 2012]. В исследовании Victor E.A Gerdes и соавт. выявлено, что среди лиц с установленным атеросклерозом толщина интимы-медии больше у носителей мутации 20210 G>A [Rosendaal F. R. et al., 1998]. Также была выявлена связь мутации 20210 G>A с ранним ишемическим инсультом у молодых мужчин [Jiang B. et al., 2014], с инфарктом миокарда [Kallel A. et al., 2016]. В литературе не встречаются данные о связи полиморфизмов rs1799889 гена *SERPINE1*, rs179963 гена *F2* и rs6046 гена *F7* именно с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек.

Цель исследования

Определить наиболее значимые биохимические маркёры нарушения функции эндотелия, нарушений гемостаза и некоторые полиморфизмы генов, кодирующих эти белки у пациентов с наличием стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях.

Задачи исследования

1. Изучить биохимические маркеры нарушения функции эндотелия (эндотелин-1, моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 типа, адгезивные молекулы sVCAM-1, ассиметричный диметиларгинин, гомоцистеин, ингибитор активатора плазминогена 1 типа) и их ассоциации с факторами свертывания крови, воспаления, с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом.

2. Изучить биохимические показатели факторов свертывания крови (фактор II, фактор VII, фактор XII, антитромбин III) и их ассоциации с биомаркерами эндотелиальной дисфункции, воспаления (фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин-1-бета, интерлейкин-6, интерлейкин-8, С-реактивный белок, липопротеин (а)), с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом.

3. Изучить частоты аллелей и генотипов однонуклеотидных полиморфизмов *CCL2* (rs1024611, 2518A>G), *SERPINE1* (rs1799889, -675insG, 4G/5G), *IL6* (rs1800795, 174C>G), *F2*

(rs1799963, G20210A), *F7* (rs6046, R353Q), и концентрацию белков, кодируемых этими генами, в плазме крови в группах пациентов со стабильными и нестабильными атеросклеротическими бляшками в коронарных артериях.

Научная новизна

Проведено исследование биохимических маркеров нарушения функции эндотелия и биохимических показателей факторов свертывания крови с целью выявления их ассоциаций с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом.

Показано, что у мужчин с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях (КА) из показателей, характеризующих нарушение функции эндотелия значительно повышен уровень MCP-1 ($p=0.19$), а из показателей, отражающих нарушения свертывающей системы в плазме крови повышен уровень фактора XII (фактора Хагемана) ($p=0.017$) в сравнении с мужчинами, у которых, согласно гистологическому заключению при анализе материалов образцов интима/медии КА, в коронарных артериях не было нестабильных бляшек.

Установлено, что отношение шансов наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек увеличивается с повышением уровня в крови фактора XII (ОШ=1.008, 95% ДИ 1.000 – 1.017, $p=0.048$).

Исследованы полиморфизмы генов *CCL2* (rs1024611, 2518A>G), *IL6* (rs1800795), *SERPINE1* (rs1799889, -675insG, 4G/5G), *F2* (rs1799963, G20210A), *F7* (rs6046, R353Q), с целью поиска их ассоциаций с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом, с концентрацией белков, кодируемых этими генами, в плазме крови. Впервые показано, что отношение шансов наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек выше у пациентов с генотипом 4G4G полиморфизма rs1799889 гена *SERPINE1* и с генотипом GG полиморфизма rs6046 гена *F7* (ОШ=4.667, 95% ДИ 1.159 – 18.783, $p=0.030$ и ОШ=4.032, 95% ДИ 1.488 – 10.989, $p=0.004$, соответственно).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты изучения содержания маркеров нарушения функции эндотелия, воспаления и гемостаза позволили прийти к выводу, что в группах мужчин с коронарным атеросклерозом со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях имеются отличия по уровням в крови показателей, характеризующих нарушение функции эндотелия и гемостаза, таких как MCP-1, фактор XII.

Так же пациенты со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях имеют различия в частотах генотипов полиморфизмов генов, кодирующих определенные белки крови, отвечающие за функцию эндотелия и процесс свертывания крови, таких как rs1799889 гена *SERPINE1* и rs6046 гена *F7*.

Обнаружение указанных изменений позволит выявлять лиц с повышенным риском развития острого коронарного синдрома, а также с более тяжелым течением ишемической болезни сердца для эффективной профилактики заболевания.

Положения, выносимые на защиту

1. У мужчин с коронарным атеросклерозом из исследованных показателей крови (эндотелин 1, моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 типа, адгезивные молекулы sVCAM-1, асимметричный диметиларгинин, гомоцистеин, ингибитор активатора плазминогена 1 типа), характеризующих нарушение функции эндотелия, только повышенный уровень в крови моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 типа ассоциируется с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных сосудах.

2. У мужчин с коронарным атеросклерозом из изученных показателей (фактор II, фактор VII, фактор XII, антитромбин III), отражающих нарушения свертывающей системы крови относительный шанс наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек увеличивается с повышением уровня в крови фактора XII.

3. При наличии генотипов 4G4G rs1799889 гена *SERPINE1* и GG rs6046 гена *F7* увеличивается шанс наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях у мужчин с верифицированным коронарным атеросклерозом.

Степень достоверности и апробации результатов

Материалы, представленные в диссертации, основаны на обследовании 94 пациентов (с коронароангиографически верифицированным атеросклерозом), представленная выборка репрезентативна для оценки всех изучаемых вариантов патологии.

Мощность выборки рассчитывалась при помощи формулы: $N_{min} = 15.4 * (p * (1-p)) / W^2$. (1)

где p – ожидаемое значение вероятности случайного события;

W – ширина доверительного интервала для значения вероятности.

По этой формуле минимальный объем выборки пациентов составил 80 человек.

Оборудование, на котором выполнялись исследования, проходило регулярную поверку в соответствии с «ГОСТ Р 8.563-96 Государственная система обеспечения единства измерений». Методики выполнения измерений с вынесением соответствующего заключения метрологической службы, что подтверждается наличием сертификатов. Используются современные методические подходы для выполнения биохимических исследований – клинико-биохимических (Сертификаты Федерального контроля качества) и фундаментальных, а также проведена статистическая обработка результатов.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 6 статей (4 в центральных российских журналах, рекомендованных Перечнем ВАК Российской Федерации и 4 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Web of Science и/или Scopus)).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, иллюстрирована таблицами и рисунками. Работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материал и методы исследования,

результаты и обсуждения), заключения, содержит выводы, практические рекомендации и указатель литературы, включающий 10 ссылок на отечественные и 225 ссылок на зарубежные источники.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке научной концепции и дизайна исследования, постановке его цели и задач. Автором совместно с сотрудниками лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний выполнены все биохимические исследования; совместно с сотрудниками лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний проведены все генетические исследования; создана база данных; проанализированы и интерпретированы полученные результаты. В соавторстве написаны и опубликованы печатные работы в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, в которых отражены научные результаты по теме диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование имеет дизайн Случай-контроль (рисунок 1). Все пациенты заполняли форму Информированного согласия на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Исследование проведено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН и ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. Проведение исследования было одобрено Этическими комитетами обоих учреждений. Исследование было выполнено в рамках бюджетной темы по Государственному заданию № 0324-2018-0002, бюджетной темы по поддержке биоресурсных коллекций по Государственному заданию № 0324-2017-0048 и при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 19-015-00055а.

В исследование были включены 94 мужчины 40-71 лет с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом, без ОКС со стабильной стенокардией напряжения II-IV ФК, поступившие в Клинику ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России на операцию коронарного шунтирования, которым в ходе операции по интраоперационным показаниям была проведена эндартерэктомия из коронарной(-ых) артерии(-й). Материал эндартерэктомии, содержащий интиму/медиа артерии был поперечно разделен на фрагменты, содержащие атеросклеротические бляшки, для проведения гистологических исследований. Гистологический анализ фрагментов интимы/медии коронарных артерий после стандартной окраски гематоксилин-эозином и Ван Гизон проводился на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (C. Zeiss) с цифровым фото выходом.

Стабильные и нестабильные атеросклеротические бляшки дифференцировались согласно критериям Waksman. Стабильная бляшка характеризуется толстой покрышкой, гомогенным липидным ядром, отсутствием воспалительных изменений, а нестабильная - тонкой покрышкой (толщина <65 мкм) или участком истонченной покрышки с очаговой деструкцией эндотелия, воспалительной клеточной инфильтрацией (более 25 клеток в поле зрения длиной 0,3 мм), рыхлым липидным ядром (>40% объема бляшки) с участками некроза [Waksman R. et al., 2007].

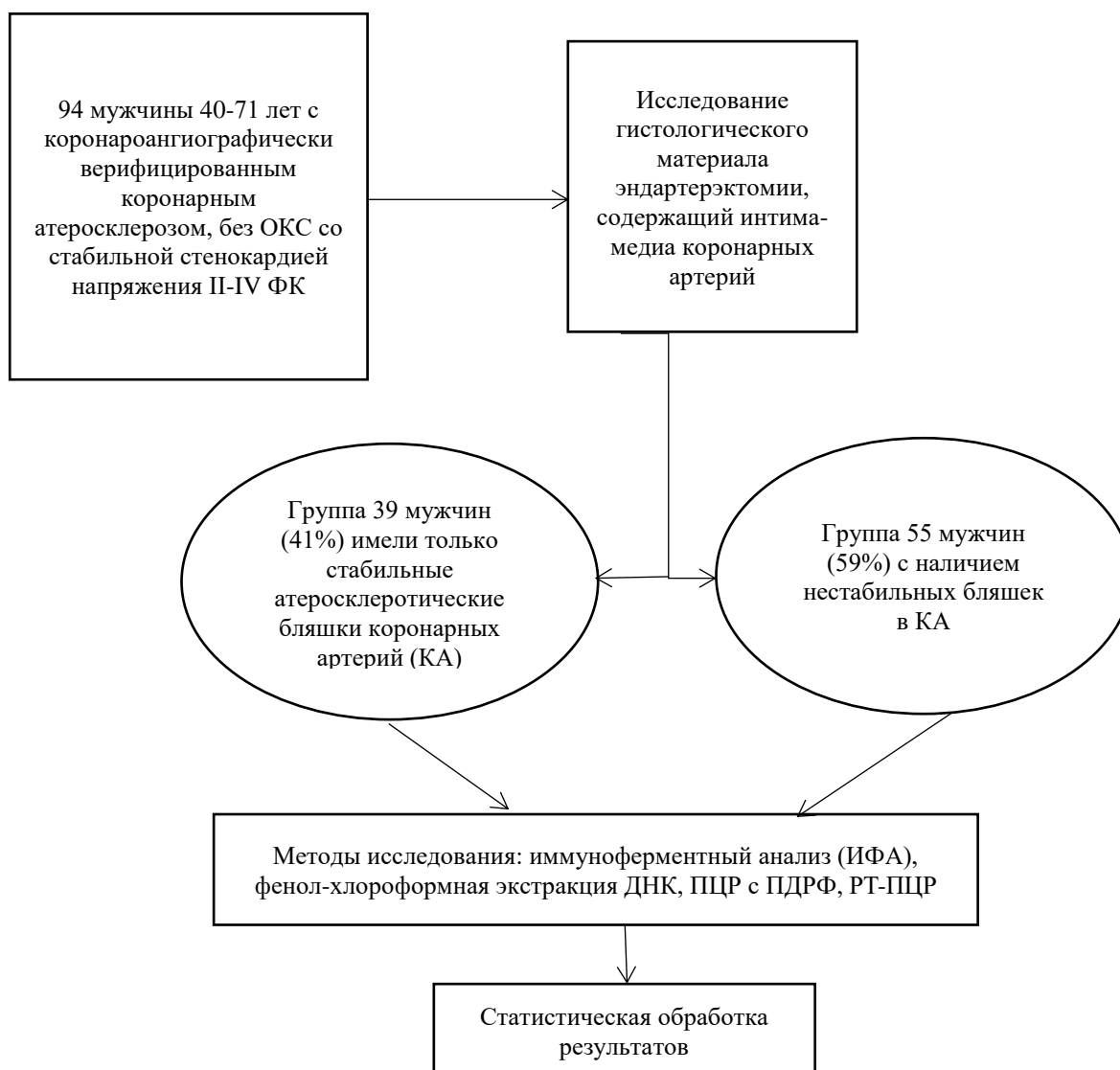


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Критериями исключения пациентов из исследования были ИМ давностью менее 6 месяцев, острые воспалительные заболевания, обострение хронических воспалительных заболеваний, активные заболевания печени, почечная недостаточность, онкологические заболевания.

Лабораторные методы исследования. Исследование биохимических показателей проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест систем ELISAs на анализаторе Multiscan EX (Финляндия).

В сыворотке крови определяли факторы эндотелиальной дисфункции: гомоцистеин (Axis-Shield), моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 типа – MCP-1 (Bender Medsystems), эндотелин 1 (Biomedica), липопротеин (a) – ЛП(a) (AssayPro), ассиметричный диметиларгинин – АДМА (Immundiagnostik), ингибитор активатора плазминогена 1 типа – PAI-1 (Technoclone), адгезивные молекулы sVCAM-1 (Bender Medsystems). В плазме крови определяли следующие факторы свертывания крови: фактор II, фактор VII, фактор XII, антитромбин III (тест-системы AssayPro). В сыворотке крови определяли воспалительные биомаркеры: фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), интерлейкины: ИЛ-1-бета, ИЛ-6, ИЛ-8 (Bender Medsystems), С-реактивный белок – СРБ (Biomerica).

На момент написания работы отсутствуют общепринятые референсные лабораторные значения для некоторых показателей. Анализ результатов по уровням известных биомаркеров крови проводился нами с ориентиром на клинические рекомендации и референсные значения тест-систем. Для оценки других значений мы ориентировались на результаты законченных немногочисленных исследований в Европе или в США, при этом учитывая весьма предварительный характер этих значений. Тем не менее, ориентиром уровней в крови стали: MCP-1 ≥ 51.5 пг/мл (по данным исследования EPIC-Norfolk, UK) [Georgakis M. K. et al., 2019], гомоцистеина ≥ 12.0 мкм/л [Maron V. A. et al., 2009], эндотелина-1 ≥ 0.31 Пм/л [Jankowich M. et al., 2020], липопротеина (а) ≥ 180 мг/дл (>430 нмоль/л) [65], АДМА ≥ 1.115 ммоль/л [Cavusoglu E. et al., 2009], PAI-1 ≥ 100 нг/мл (тест система ELISAs kit), sVCAM-1 ≥ 1148.0 нг/мл [Andrys C. et al., 2000], фактор II ≥ 100 мкг/мл [Butenas S. et al., 1999], фактор VII ≥ 500 нг/мл [Butenas S. et al., 1999], антитромбин III ≥ 200 мкг/мл [Butenas S. et al., 1999], фактор XII ≥ 28 мкг/мл (тест система ELISAs kit).

Генетические методы исследования. ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из венозной крови пациентов. Генотипирование проведено методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Для генотипирования по rs1799963 (*F2*), rs6046 (*F7*) использовались наборы производителя ДНК-технология для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Для генотипирования по rs1024611 (полиморфизм промотора гена *CCL2*) использовали прямой праймер 5'-cagcatcactcatagaatcc-3' и обратный праймер 5'-agtatctggaatgcaggctc-3'. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: Трис-НСI (рН 9.0) 75 мМ, (NH₄)₂SO₄ 20мМ, Tween-20 0.01%, 3.0 мМ MgCl₂, по 2.0 мкл каждого праймера, 0.2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единицу Taq-полимеразы, вода до объема 25 мкл. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 33 цикла, включающих денатурацию 95°C 30 секунд, отжиг праймеров 63°C 30 секунд и элонгацию 72°C 30 секунд. Рестрикцию проводили с 10 единицами активности рестриктазы Pvu II (ООО СибЭнзим, Россия). Размер продукта амплификации 476 п.н. После проведения рестрикции при генотипе AA детектировался продукт 476 п.н., при GG генотипе - продукты 305 п.н. и 171 п.н., при гетерозиготном генотипе AG все перечисленные продукты: 476 п.н., 305 п.н., 171 п.н.

Для генотипирования по rs1799889 (*SERPINE1*) использовали прямой праймер 5'-cacagagagagtctggccacgt-3' и обратный праймер 5'-ссааcagaggactcttggtct-3'. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: Трис-НСI (рН 9.0) 75 мМ, (NH₄)₂SO₄ 20мМ, Tween-20 0.01%, 2,5 мМ MgCl₂, по 1.0 мкл каждого праймера, 0.2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 0.4 единицы Taq-полимеразы, вода до объема 25 мкл. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 35 циклов, включающих денатурацию 95°C 30 секунд, отжиг праймеров 55°C 30 секунд и элонгацию 72°C 30 секунд. Рестрикцию проводили с 10 единицами активности рестриктазы Bsc 4 I (ООО СибЭнзим, Россия). Размер продукта амплификации 98 п.н. После проведения рестрикции при наличии аллеля 4G детектировался продукт 98 п.н., при наличии аллеля 5G - продукты 77 п.н. и 22 п.н.

Для генотипирования по rs1800795 (*IL6*) использовали прямой праймер 5'-agcctgtaatctggctcactgaaaa -3' и обратный праймер 5'-tgtgcaatgtgacgtccttagaat -3'. Смесь для ПЦР

объемом 14 мкл включала: Трис-НСI (рН 9.0) 75 мМ, (NH₄)₂SO₄ 20мМ, Tween-20 0.01%, 2.0 мМ MgCl₂, по 1.0 мкл каждого праймера, 0.2 мМ смеси dNTP, 2 мкг ДНК, 1 единица Taq-полимеразы, вода до объема 14 мкл. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 30 циклов, включающих денатурацию 95°C 30 секунд, отжиг праймеров 57°C 30 секунд и элонгацию 72°C 30 секунд. Рестрикцию проводили с 20 единицами активности рестриктазы Hinf I (ООО СибЭнзим, Россия). Размер продукта амплификации 137 п.н. После проведения рестрикции при генотипе СС детектировались продукты 137 п.н. и 130 п.н., при генотипе GG детектировался продукт 110 п.н., при гетерозиготном генотипе СG все перечисленные продукты: 137 п.н., 130 п.н., 110 п.н.

Статистическая обработка. Полученные результаты статистически обработаны с помощью пакета программ SPSS 16.0, определены частоты генотипов и аллелей изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов в группе у мужчин со стабильными и нестабильными бляшками и контрольных группах. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей выполнялось с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат по Пирсону. В случае четырёхпольных таблиц применяли точный двусторонний критерий Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. В качестве уровня значимости использовали $p < 0.05$.

Нормальность распределения биохимических параметров проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова (в связи с тем, что количество наблюдений больше 60).

При нормальном распределении расчеты производились с использованием Т-критерия Стьюдента для независимых выборок. В случае отклонения от нормального распределения использовали тест Крускалла-Уоллиса и тест Манна-Уитни. В случае номинальной и порядковой шкалы данных использовались таблицы сопряженности и тест хи-квадрат по Пирсону с поправкой на правдоподобие. В качестве уровня значимости также использовали $p < 0.05$.

Клиническая характеристика групп пациентов. На основании медицинской документации и анамнеза для всех пациентов были проанализированы жалобы и клиническая картина заболевания на момент осмотра (перед операцией). Сравнительное исследование клинико-анамнестических характеристик представлена в таблице 1.

Согласно таблице 1, статистически значимых различий в клинических характеристиках двух групп мужчин выявлено не было (с наличием только стабильных и с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек).

Группы сопоставимы по возрасту.

Так же учитывался уровень артериального давления (систолического и диастолического) во время объективного осмотра перед оперативным лечением - среднее при трехкратном измерении с интервалом в 10 минут. При этом в 1 группе (только со стабильными бляшками) гипертоническая болезнь установлена у 77.8%, а во 2-й (с наличием нестабильных бляшек в коронарных артериях) у 71.4%. Все пациенты с гипертонической болезнью получали терапию, на которой были достигнуты целевые цифры АД до поступления на оперативное лечение. У остальных мужчин на момент госпитализации гипертоническая болезнь не была верифицирована.

Инфаркт миокарда в анамнезе в 1-й группе имели 71.4% мужчин, в то время как во 2-й группе - 76,4%. Стенокардия напряжения II ФК и более встречалась у всех пациентов.

Таблица 1

Клинико-анамнестические данные пациентов

Параметр	Группа 1 (с наличием нестабильных бляшек) n=55	Группа 2 (пациенты без нестабильных бляшек) n=42	P
Возраст, лет	59.71±8.69	60.82±7.01	0.398
Систолическое АД	135.68±15.0	141.05±16.44	0.108
Диастолическое АД	82.74±9.75	86.22±9.51	0.92
Пульс	71.24±7.07	67.98±6.11	0.28
ИМ в анамнезе	76.4% (42)	71.4% (30)	0.582
Стенокардия напряжения в анамнезе:			
I ФК	100%	100%	0.403
II ФК	0	0	
III ФК	12.7% (7)	14.3% (6)	
IV ФК	78.2% (43)	69.0% (29)	
Гипертоническая болезнь:			
ГБ III ст.	77.8%	71.4%	0.384
	77.8% (42)	71.4% (30)	
Хроническая сердечная недостаточность:			
ХСН I ФК	100%	97.6%	0.439
ХСН II ФК	42.6% (23)	36.6% (15)	
ХСН III ФК	53.7% (29)	63.4% (26)	
ХСН IV ФК	1.85% (1)	0	
СД 2 типа в анамнезе	1.85% (1)	0	0.064
Избыточный вес (ИМТ 25–29,9 кг/м ²)	27.3% (15)	11.9% (5)	0.440
Ожирение (ИМТ ≥30 кг/м ²)			
Ожирение, 1 степень 30–34,9	42.6% (23)	48.8% (20)	0.764
Ожирение, 2 степень 35–39,9	82.6% (19)	78.9% (15)	
Ожирение, 3 степень ≥ 40	17.4% (4)	21.1% (4)	
	0	0	
Курение	12.7% (7)	26.2% (11)	0.077
Гиперлипидемия в анамнезе	65.5% (36)	76.2% (32)	0.252

Хроническая сердечная недостаточность наблюдалась практически у всех пациентов в подавляющем большинстве случаев не выше II функционального класса по NYHA. Для описания выраженности симптомов ХСН использовали разделение по функциональным классам, согласно критериям, предложенным Нью-Йоркской ассоциацией кардиологов (NYHA). В группе мужчин с нестабильными бляшками число лиц с ХСН I ФК 42.6%, II ФК – 53.7%, III ФК – 1.85%, IV ФК – 1.85%, что достоверно не отличалось от группы пациентов без нестабильных бляшек, где число лиц с ХСН I ФК составило 36.6%, II ФК – 63.4%.

Сахарный диабет 2 типа в анамнезе встречался у 11.9% в 1й группе и у 27.3% во второй. Сахароснижающую терапию получали не все пациенты с сахарным диабетом, данный параметр не учитывался.

Подавляющее большинство пациентов в группах имели избыточную массу тела/ожирение: в 1й группе 88.9% (46,3% для избыточной массы тела и 42.6% - ожирение 1й и 2й степени), во 2й группе 82.9% (34.1% для избыточной массы тела и 48.8% - ожирение 1й и 2й степени). Ожирение, как известно [Feingold K. R. et al., 2018], является независимым фактором риска гиперлипидемии, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.

При опросе выявлялись так же курящие пациенты (курение так же является независимым фактором риска гиперлипидемии, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда), которых в 1й группе было 12.7%, а во 2й 26.2%.

Гиперлипидемия так же учитывалась, при этом в 1-й группе гиперлипидемия в анамнезе была у 65.5% мужчин, а во 2-й у 76.2%. Независимо от наличия гиперлипидемии в анамнезе все пациенты по показанию ИБС получали статины в максимально переносимых дозировках (Аторвастатин и Розувастатин).

У всех пациентов были выявлены гемодинамически значимые стенозы в коронарных артериях (Гемодинамически значимыми являются стенозы >70% для всех коронарных артерий, за исключением левой основной коронарной артерии, где стеноз >50% считается значимым) [Miller S. W. Et al., 2009].

Предложенная шкала SCCT grading scale для оценки степени тяжести стеноза оценивает степень стеноза просветного диаметра: 0% – отсутствие видимого стеноза, 1–24% – минимальный стеноз, 25–49% – легкий стеноз, 50–69% – умеренный стеноз, 70–99% – тяжелый стеноз, 100% – окклюзия [Cury R. C. et al., 2016].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели эндотелиальной дисфункции и воспаления. В рамках данной работы был проведен анализ уровня биохимических факторов эндотелиальной дисфункции (гомоцистеина, эндотелина-1, АДМА, PAI-1, MCP-1, sVCAM-1) в группах мужчин со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях.

У мужчин с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях уровень в крови MCP-1 был выше в 1.45 раз ($p=0.19$, 622.80 [443.30; 868.05] vs 429.69 [343.07; 611.41]) (рисунок 2) в сравнении с мужчинами, у которых, согласно гистологическому заключению при анализе материалов образцов интима/меди КА, в коронарных артериях не было нестабильных бляшек.

Полученные нами результаты относительно MCP-1 не противоречат данным других исследований. Так, в исследовании Cho K.Y. и коллег было выявлено, что у пациентов с инфарктом миокарда в нестабильных атеросклеротических бляшках повышено содержание MCP-1 и ИЛ-6 [Cho K. Y. et al., 2013]. Hoogeveen R.C. с коллегами заключили, что повышенный уровень в крови MCP-1 связан не только с риском развития атеросклероза, но и с риском развития инфаркта миокарда [Hoogeveen R. C. et al., 2005].

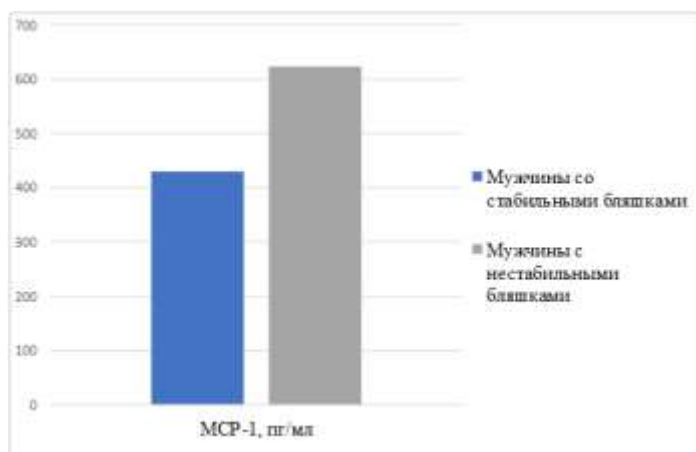


Рисунок 2 - Уровень MCP-1 у мужчин с коронарным атеросклерозом

По уровню в крови других изученных нами факторов эндотелиальной дисфункции различий между двумя группами пациентов выявлено не было (таблица 2, 3).

Таблица 2

Факторы нарушения функции эндотелия у мужчин с коронарным атеросклерозом Me [Q25, Q75]

Факторы эндотелиальной дисфункции в крови	Мужчины (n=39) со стабильными бляшками в коронарных артериях	Мужчины (n=55) с нестабильными бляшками в коронарных артериях	P
Эндотелин-1, пМ/л	0.53 [0.33; 0.78]	0.46 [0.22; 0.84]	0.520
sVCAM-1, нг/мл	838.82 [735.82; 1121.71]	825.65 [555.66; 1020.47]	0.144

Таблица 3

Факторы нарушения функции эндотелия у мужчин с коронарным атеросклерозом (M±σ)

Факторы эндотелиальной дисфункции в крови	Мужчины (n=39) со стабильными бляшками в коронарных артериях	Мужчины (n=55) с нестабильными бляшками в коронарных артериях	P
Гомоцистеин, мкМ/л	18.07±5.47	18.35±7.58	0.864
АДМА, мкМ/л	1.38±0.36	1.38±0.37	0.959
РАI-1, нг/мл	395.5±116.3	398.0±96.2	0.914

Таким образом, среди факторов эндотелиальной дисфункции получены различия по уровню MCP-1 между пациентами со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях.

Показатели факторов гемостаза. Так же в рамках диссертационной работы был проведен анализ уровней некоторых факторов свертывания крови (фактор II, антитромбин III, фактор VII, фактор XII) в группах мужчин со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях.

У мужчин с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях ровни в плазме крови фактора XII (фактора Хагемана) был в 1.3 раз выше ($p = 0.017$, 85.7 ± 57.7 vs 114.7 ± 54.4) в сравнении с мужчинами, у которых, согласно гистологическому заключению при анализе

материалов образцов интима/меди КА, в коронарных артериях не было нестабильных бляшек (рисунок 3).

Полученные результаты не противоречат данным других исследований, посвященных изучению фактора свертывания XII при атеросклерозе. Renne T. и соавторы считают, что фактор Хагемана – один из ключевых факторов в образовании фибрина – является биомаркером атеросклеротического повреждения сосудов [Renne T. et al., 2012].

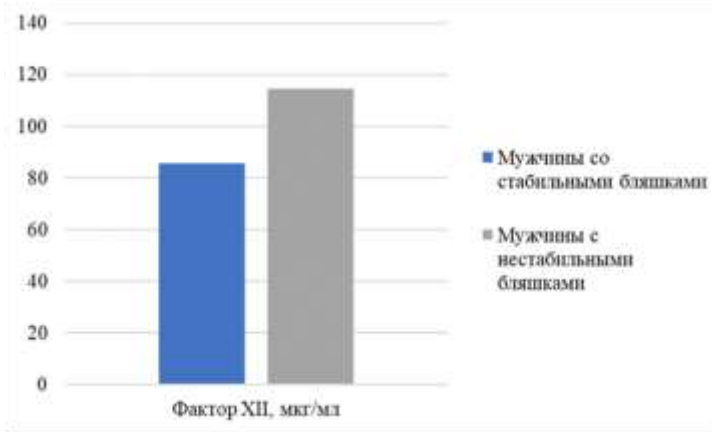


Рисунок 3 - Уровень фактора XII у мужчин с коронарным атеросклерозом

По уровню в плазме крови фактора II, фактора VII и антитромбина III различий между двумя группами мужчин не было (таблица 4, 5).

Таблица 4

Факторы гемостаза у мужчин с коронарным атеросклерозом Me [Q25, Q75]

Факторы свертывания крови	Мужчины (n=38) со стабильными бляшками в коронарных артериях	Мужчины (n=55) с нестабильными бляшками в коронарных артериях	P
Фактор VII, нг/мл	305.94 [235.59; 465.46]	259.76 [175.11; 407.66]	0.165

Таблица 5

Факторы гемостаза у мужчин с коронарным атеросклерозом (M±σ)

Факторы свертывания крови	Мужчины (n=38) со стабильными бляшками в коронарных артериях	Мужчины (n=55) с нестабильными бляшками в коронарных артериях	P
Фактор II, мкг/мл	250.5±58.9	261.5±65.5	0.418
Антитромбин III, мкг/мл	611.4±185.9	598.4±227.7	0.763

Таким образом, среди факторов гемостаза получены различия по уровню фактора XII между пациентами со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях.

На следующем этапе статистической обработки все исследуемые нами факторы свертывания крови были включены в Модель логистического регрессионного анализа (таблица 6).

Логистический регрессионный анализ относительного риска наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек, связанного с факторами гемостаза

Факторы гемостаза	Exp(B)	95.0% C.I. для Exp(B)		P
		нижний	верхний	
Фактор II	1.003	0.996	1.010	0.418
Фактор VII	1.000	1.000	1.001	0.314
Фактор XII	1.009	1.002	1.017	0.018
Антитромбин III	1.000	0.998	1.002	0.768

Результаты показали, что относительный риск наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек связан только с повышенным уровнем в крови фактора XII (ОШ=1.009, 95% ДИ 1.002 – 1.017, $p=0.018$).

Мультивариантный логистический регрессионный анализ относительного риска наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек, связанный с фактором XII. Получив результаты о том, что повышенный уровень фактора XII связан с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, мы включили уровень фактора XII в многофакторный регрессионный анализ с учетом других сердечно-сосудистых факторов риска (таблица 7).

Таблица 7

Мультивариантный логистический регрессионный анализ относительного риска наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек, связанный с фактором XII

Показатели		Модель 1	Модель 2	Модель 3	Модель 4	Модель 5
ОШ (95% ДИ)	Фактор XII, мкг/мл	1.009 (1.002– 1.017) ($p = 0.018$)	1.011 (1.003– 1.020) ($p = 0.010$)	1.011 (1.003– 1.020) ($p = 0.008$)	1.008 (1.000– 1.017) ($p = 0.050$)	1.012 (1.003– 1.022) ($p = 0.013$)
	Возраст	0.981 (0.933– 1.032) ($p = 0.459$)	-	-	-	0.990 (0.937– 1.046) ($p = 0.722$)
	Наличие гипертонической болезни	-	1.411 (0.574– 3.470) ($p = 0.454$)	-	-	1.628 (0.637– 4.160) ($p = 0.309$)
	ИМТ, кг/м ²	-	-	1.092 (0.982– 1.216) ($p = 0.105$)	-	1.057 (0.933– 1.198) ($p = 0.382$)
	Курение	-	-	-	1.715 (0.526– 5.593) ($p = 0.212$)	1.591 (0.427– 5.925) ($p = 0.489$)

Фактор XII активирует внутренний путь коагуляции, который начинается с появления отрицательно заряженных поверхностей на поверхности эндотелия, что можно наблюдать при дестабилизации бляшки. Это может объяснить выявленные связи между фактором Хагемана и относительным риском наличия уязвимых атеросклеротических бляшек в коронарных артериях. Kuijpers M.J. и соавторы, изучавшие накопление фактора XIIa на наружной поверхности тромбов посредством их иммунологической окраски, считают, что фактор XII регулирует патологический процесс тромбообразования на поверхности осложненных разрывом атеросклеротических бляшек [Kuijpers M. J. E. et al., 2014].

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов. Нами было проведено выделение ДНК и генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов *CCL2* (rs1024611, 2518A>G), *SERPINE1* (rs1799889 однонуклеотидный полиморфизм-675insG (4G / 5G) в промоторе гена), *IL6* (rs1800795, 174C>G), *F2* (rs1799963, G20210A), *F7* (rs6046, R353Q) в группах мужчин со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях.

Выявлены статистически значимые различия между группами со стабильными и нестабильными бляшками по частотам аллелей и генотипов полиморфизма rs6046 гена *F7*, аллель G vs A ($p=0.015$). У пациентов со стабильными бляшками в коронарных артериях аллель A встречается в 2.9 раз чаще (95% ДИ 1.198 – 7.163, $p=0.015$), чем у мужчин с нестабильными бляшками. Отношение шансов обнаружить носительство генотипа GA в 4.7 раза больше среди пациентов со стабильными бляшками в коронарных артериях, по сравнению с пациентами с нестабильными бляшками (95% ДИ 0.008 – 0.597, $p=0.002$), в то время как шанс обнаружить генотип GG в 4 раза выше в группе пациентов с нестабильными бляшками (95% ДИ 1.488 – 10.989, $p=0.004$) (таблица 8).

В теории, фактор VII способствует развитию атеросклероза через образование тромбина и фибрина. Развитие коагуляции в стенке сосуда может привести к продукции тромбина и активации тромбоцитов, что приводит к высвобождению различных цитокинов и пролиферации гладкомышечных клеток в стенке сосуда. Таким образом, у лиц с более низким уровнем FVII с может быть меньше шансов на развитие ИБС, при этом в проспективном обсервационном когортном исследовании Zakaï, включавшем американских мужчин и женщин старше 65 лет для оценки факторов риска ССЗ, редкий аллель был ассоциирован со сниженными уровнями фактора VII в крови. [Zakaï N. A. et al. 2011; Ken Dror G. et al., 2010].

В исследовании Vairova et al., где исследовались российские подростки в возрасте 15.7 лет с гипертонической болезнью и контрольная группа, обладатели аллеля G имели значительно более высокую активность фактора свертывания крови, чем обладатели аллеля A [Vairova T. A. et al., 2014]. Таким образом, редкий аллель связан со снижением уровня фактора VII в крови у различных групп пациентов различного возраста.

Частоты генотипов и аллелей однонуклеотидного полиморфизма гена *F7* (rs6046) в группах мужчин со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях

Однонуклеотидный полиморфизм	Генотип/ аллель	Группа стабильными бляшками		Группа нестабильными бляшками		P
		n	%	n	%	
<i>F7</i> (rs6046)	GG	23	62.2	53	86.9	p=0.004 (ОШ 4.032, 95% ДИ 1.488–10.989)
	GA	14	37.8	7	11.5	p=0.002 (ОШ 0.213, 95% ДИ 0.008–0.597)
	AA	0	0	1	1.6	p=0.434
	G	81		92.6		p=0.015 (ОШ 0.341, 95% ДИ 0.140–0.835)
	A	19		7.4		p=0.015 (ОШ 2.930, 95% ДИ 1.198–7.163)

Так же получены статистически значимые различия между группами со стабильными и нестабильными бляшками по частотам генотипов полиморфизма rs1799889 гена *SERPINE1*. При этом по частотам аллелей 4G и 5G достоверной разницы не получено ($p=0.058$). Отношение шансов обнаружить носительство генотипа 5G4G в 2.47 раза больше среди пациентов со стабильными бляшками в коронарных артериях, по сравнению с пациентами с нестабильными бляшками (95% ДИ 1.081 – 5.621, $p=0.030$). Тогда как носительство генотипа 4G4G в 5.85 раз реже встречается в группе мужчин со стабильными бляшками (95% ДИ 0.047 – 0.623, $p=0.004$) (таблица 9).

Редкий аллель 4G связан с большей экспрессией PAI-1, что было показано в исследованиях Ding J. et al., включавших мужчин и женщин в возрасте от 70 до 79 лет (белых и афроамериканцев) [Ding J. et al. 2006], а также было подтверждено в обзоре Tsantes A. E. et al. [Tsantes A. E. et al., 2008]. В мета-анализе Nikolopoulos, основанном на 53 исследованиях, показано, что аллель 4G полиморфизма rs1799889 гена *SERPINE1* связан с повышенным риском инфаркта миокарда посредством изменения уровня PAI-1 плазмы. Важно отметить, что в данном исследовании во всех моделях носители аллеля 4G имели более высокую активность PAI-1. Это является значительным доказательством того, что активность PAI-1 действительно находится на причинном пути между полиморфизмом *SERPINE1* 4G/5G и возникновением атеротромботических событий. [Nikolopoulos G. K. et al, 2014]. Так же в

метаанализе Liu 2018 года, включавшем 99 исследований, полиморфизм rs1799889 был в значительной степени связан с риском инфаркта миокарда и ишемическим инсультом. Кроме того, полиморфизм rs1799889 значительно коррелировал с риском атеросклероза как у азиатской популяции, так и у европейцев [Liu Y. et al., 2018].

Таблица 9

Частоты генотипов и аллелей однонуклеотидного полиморфизма гена *SERPINE1* (rs1799889) в группах мужчин со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях

Однонуклеотидный полиморфизм	Генотип/ аллель	Группа со стабильными бляшками		Группа с нестабильными бляшками		P
		n	%	n	%	
<i>SERPINE1</i> (rs1799889)	5G5G	14	35.9	20	32.8	p=0.749
	5G4G	22	56.4	21	34.4	p=0.030 (ОШ 2.465, 95% ДИ 1.081–5.621)
	4G4G	3	7.7	20	32.8	p=0.004 (ОШ 0.171, 95% ДИ 0.047–0.623)
	5G	64.1		50		p=0.058
	4G	35.9		50		p=0.058

В группе со стабильными бляшками не найдено носителей редкого аллеля А полиморфизма rs1799963 гена *F2*. Не выявлено статистически значимых различий между группами по частотам генотипов и аллелей полиморфизма rs1799963 гена *F2*, *CCL2* (rs 1024611), *IL6* (rs1800795)

Была проведена оценка уровней биохимических показателей (фактора XII, PAI-1, MCP-1, IL-6) в зависимости от генотипов в общей группе и в группах мужчин со стабильными и нестабильными бляшками в коронарных артериях. Статистически значимой разницы между уровнями биохимических показателей в группах с разными генотипами получено не было.

Логистический регрессионный анализ относительного риска наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек, связанный с однонуклеотидными полиморфизмами. На заключительном этапе полиморфизмы генов *F7* и *SERPINE1* были включены в логистический регрессионный анализ отношения шансов наличия нестабильной атеросклеротической бляшки в коронарных артериях (таблица 10).

Таблица 10

Логистический регрессионный анализ отношения шансов наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек, связанного с полиморфизмами генов гемостаза и эндотелиальной дисфункции

Полиморфизмы	Exp(B)	95.0% C.I. для Exp(B)		P
		нижний	верхний	
<i>F7</i> , GG	4.696	1.676	13.156	0.003
<i>SERPINE1</i> , 4G4G	4.667	1.159	18.783	0.030

Таким образом, шанс наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в 4.696 раз выше у пациентов с носительством генотипа GG, по отношению к пациентам с носительством других генотипов гена *F7*.

Так же, шанс наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в 4.667 раз выше у пациентов с носительством генотипа 4G4G, по отношению к пациентам с носительством других генотипов гена *SERPINE1*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении ИБС, смертность от атеротромботических событий остается высокой, в связи с чем в последних исследованиях предпринимаются попытки выделить биохимические маркеры не только обладающие предсказательной ценностью в отношении наличия ИБС, но и в отношении тяжести ее течения (наличия нестабильности атеросклеротических бляшек).

В результате проведенного исследования было показано, что в группах пациентов с наличием стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях имеются отличия по уровню биохимических маркеров, отражающих нарушения функции эндотелия и гемостаза. MCP-1, фактора XII (фактора Хагемана) выше у мужчин с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, шанс наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек увеличивается с повышением в крови уровня фактора XII.

Так же выявлены различия между группами со стабильными и нестабильными бляшками по частотам генотипов полиморфизмов генов, кодирующих белки, которые отвечают за нарушение эндотелиальной функции и патологические изменения системы гемостаза. Так, генотип 4G4G rs1799889 гена *SERPINE1* и GG rs6046 гена *F7* увеличивает шанс наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом.

ВЫВОДЫ

1. У мужчин с коронарным атеросклерозом с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях уровень в крови MCP-1 выше в 1.45 раз по сравнению с мужчинами со стабильными бляшками в коронарных артериях (622.80 [443.30; 868.05] и 429.69 [343.07; 611.41] соответственно, (p = 0.19).

2. У мужчин с коронарным атеросклерозом с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях уровень в крови фактора XII (фактора Хагемана) в 1.3 раз выше по сравнению с мужчинами со стабильными бляшками в коронарных артериях (85.7 ± 57.7) и (114.7 ± 54.4) соответственно, ($p = 0.017$). Шанс наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек увеличивается с повышением в крови уровня фактора XII независимо от других сердечно-сосудистых факторов риска (ОШ = 1.009); 95 % ДИ 1.002 – 1.017; ($p = 0.018$).

3. Аллель А гена *F7* встречается в 2.9 раз чаще у пациентов со стабильными бляшками в коронарных артериях по сравнению с мужчинами с нестабильными бляшками в коронарных артериях (ОШ 2.930, 95 % ДИ 1.198 – 7.163, ($p = 0.015$)). Носительство генотипа GA в 4.7 раза больше среди пациентов со стабильными бляшками в коронарных артериях по сравнению с мужчинами с нестабильными бляшками в коронарных артериях (95 % ДИ 0.008 – 0.597; ($p = 0.002$)), в то время как шанс обнаружить генотип GG в 4 раза выше в группе пациентов с нестабильными бляшками (95 % ДИ 1.488 – 10.989; ($p = 0.004$)). Шанс наличия нестабильной атеросклеротической бляшки в 4.696 раз выше у пациентов с носительством генотипа GG, по отношению к пациентам с носительством 2-х других генотипов гена *F7* (ОШ = 4.696); 95 % ДИ 1.676 – 13.156; ($p = 0.003$).

4. Отношение шансов обнаружить носительство генотипа 5G4G в 2.47 раза больше среди пациентов со стабильными бляшками в коронарных артериях, по сравнению с пациентами с нестабильными бляшками (95 % ДИ 1.081 – 5.621; ($p = 0.030$)). Тогда как носительство генотипа 4G4G в 5.85 раз реже встречается в группе мужчин со стабильными бляшками (95 % ДИ 0.047 – 0.623; ($p = 0.004$)). Шанс наличия нестабильной атеросклеротической бляшки в 4.667 раз выше у пациентов с носительством генотипа 4G4G, по отношению к пациентам с носительством 2-х других генотипов гена *SERPINE1* (ОШ = 4.667); 95 % ДИ 1.159 – 18.783; ($p = 0.030$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У мужчин с коронарным атеросклерозом может быть рекомендовано исследование крови на концентрацию фактора XII, поскольку увеличение его содержания в крови ассоциировано с повышением шанса наличия в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек. У мужчин с коронарным атеросклерозом может быть рекомендовано исследование крови на концентрацию MCP-1, так как повышение его концентрации ассоциировано с наличием в коронарных артериях нестабильных атеросклеротических бляшек.

2. В рамках комплексного обследования пациентов для выявления групп риска развития атеросклероза и сердечно-сосудистых событий может быть рекомендовано определение полиморфизмов rs1799889 гена *SERPINE1* и rs6046 гена *F7*. Обнаружение носительства «генотипов риска» позволит на ранних этапах проводить оценку и стратификацию риска.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Биохимические маркеры эндотелиальной дисфункции и гемостаза при атеросклерозе и гены, ответственные за их регуляцию / Стрюкова Е. В., Рагино Ю. И., Максимов В. Н. // *Атеросклероз*. – 2017. – Т. 13. – №. 1. – С. 49-56. (РИНЦ)

2. Association of coagulation factors with the presence of unstable atherosclerotic plaques in the coronary arteries. / Ragino Y.I., **Striukova E.V.**, Murashov I.S., Polonskaya Y.V., Volkov A.M., Kashtanova E.V., Kurguzov A.V., Chernjavskii A.M. // **Russian Journal of Cardiology**. 2018;(8):21-24. (РИНЦ, Scopus, Q4)
3. Association of some hemostasis and endothelial dysfunction factors with probability of presence of vulnerable atherosclerotic plaques in patients with coronary atherosclerosis. / Ragino, Y. I., **Striukova, E. V.**, Murashov, I. S., Polonskaya, Y. V., Volkov, A. M., Kurguzov, A. V., ... & Kashtanova, E. V. // **BMC Research Notes** – 2019, 12(1), 336 (Scopus, Q2)
4. Ассоциация факторов эндотелиальной дисфункции с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях / Рагино Ю.И., **Стрюкова Е.В.**, Мурашов И.С., Полонская Я.В., Волков А.М., Каштанова Е.В., Кургузов А.В., Чернявский А.М. // **Российский кардиологический журнал**. 2019. Т. 24. № 5. С. 26-29. (РИНЦ, Scopus, Q4)
5. Связь маркеров воспаления с факторами свертывания крови у пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом / Каштанова Е.В., Полонская Я.В., **Стрюкова Е.В.**, Стахнёва Е.М., Рагино Ю.И. // **Евразийский кардиологический журнал**. 2019. № S1. С. 163. (РИНЦ)
6. Полиморфизмы в генах F2, F7, PAII у мужчин с нестабильными атеросклеротическими бляшками в коронарных артериях / **Стрюкова Е.В.**, Максимов В.Н., Полонская Я.В., Мурашов И.С., Волков А.М., Кургузов А.В., Чернявский А.М., Каштанова Е.В. // **Российский кардиологический журнал**. 2020;25(10):3721. (РИНЦ, Scopus, Q4)
7. Polymorphisms in the CETP, APOC3 and APOE genes in men with unstable atherosclerotic plaques in the coronary arteries. **E.V. Striukova**, V.N. Maksimov, Yu.I Ragino, Ya.V. Polonskaya, I.S. Murashov, A.M. Volkov, A.V. Kurguzov, A.M. Chernjavskii, E.V. Kashtanova, // **Meta Gene**, Volume 27, 2021, 100847, ISSN 2214-5400, <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2020.100847> (Scopus, Q4)
8. The study of the complex oxidative and inflammatory biomarkers in patients with coronary atherosclerosis. / Polonskaia, I., Kashtanova, E., Kurhuzov, A., Shramko, S., **Stryukova, E.**, Cherniavsky, A., & Ragino, Y. // **Atherosclerosis**. – 2018. – 275, ee 253 (Web of Science, Q1).
9. Study of biomarkers to predict unfavorable course of coronary atherosclerosis. / Kashtanova, E., Polonskaia, I., Kurhuzov, A., Cherniavsky, A., Shramko, V., **Stryukova, E.**, & Ragino, Y. // **Atherosclerosis**. – 2018. – 275, ee 251 (Web of Science, Q1).
10. Significant hemostasis and endothelial dysfunction blood biomarkers of unstable atherosclerotic plaques in coronary arteries. / **Striukova E.**, Kashtanova E., Polonskaya Y., Stakhneva E., Chernyavskii A., Kurguzov A., Kamenskaya O., Murashov I., Ragino Y. // **Atherosclerosis**. – 2018. – 275, e 146 (Web of Science, Q1).
11. Gene polymorphisms of hemostasis indices in men with coronary atherosclerosis / E. **Striukova**, E. Kashtanova, V. Maksimov, Y. Polonskaya, A. Kurguzov, I. Murashov and others. // **Atherosclerosis**, Volume 315, e113, 2020 (Web of Science, Q1).

12. Effect of atorvastatin on the concentration of fractions and subfractions of TG- lipoproteins serum of mice in experimental lipemia. / Y. Polonskaya, V. Loginova, T. Korolenko, E. Kashtanova, **E. Striukova**, V. Shramko // *Atherosclerosis*, Volume 315, e94. 2020 (Web of Science, Q1).
13. Comparison in the proteoms of atherosclerotic plaques at different stages of development in coronary atherosclerosis / E. Stakhneva, I. Meshcheryakova, E. Demidov, K. Starostin, S. Peltek, V. Shramko, **E. Striukova**, Y. Ragino. // *Atherosclerosis*, Volume 315, e113, 2020 (Web of Science, Q1).
14. Biomarkers of calcification associated with the presence of unstable atherosclerotic plaques in patients with coronary atherosclerosis. / E. Kashtanova, Y. Polonskaya, **E. Striukova**, V. Shramko, A. Kurguzov, I. Murashov and others. // *Atherosclerosis*, Volume 315, e127, 2020 (Web of Science, Q1).
15. The elemental composition of the atherosclerotic lesion / Y. Polonskaya, E. Kashtanova, V. Shramko, **E. Striukova**, A. Kurguzov, I. Murashov and others. // *Atherosclerosis*, Volume 315, e127 - e128, 2020 (Web of Science, Q1).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

EPIC - The European Prospective Investigation of Cancer

ICAM - Inter-Cellular Adhesion Molecule 1

IL - Interleukin

MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein 1

NO - Nitric oxide

NYHA - New York Heart Association

PAI-1 - Plasminogen activator inhibitor

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

UK – United Kingdom

VCAM-1 - Vascular cell adhesion molecule 1

АД – Артериальное давление

АДМА – Ассиметричный диметиларгинин

ВАК - Высшая аттестационная комиссия

ГБ – Гипертоническая болезнь

ДИ – Доверительный интервал

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – Ишемическая болезнь сердца

ИЛ - Интерлейкин

ИМ – Инфаркт Миокарда

ИМТ – Индекс массы тела

ИФА – Иммуноферментный анализ

КА – Коронарные артерии

КШ – Коронарное шунтирование

ЛП - Липопротеид

НМИЦ - Национальный медицинский исследовательский центр

ОКС – Острый коронарный синдром

ОШ – Отношение шансов

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

СД – Сахарный диабет

СРБ – С-реактивный белок

ССЗ – Сердечно-сосудистые заболевания

ФК – Функциональный класс

ФНО-а – Фактор некроза опухоли

ХСН – Хроническая сердечная недостаточность