

Полиморфные варианты генов системы тромбообразования и их роль в развитии инфаркта миокарда

А.Л. Гончар¹, И.Б. Моссе¹, А.А. Иванов¹, Н.И. Моссе², К.А. Моссе²

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

² РНПЦ «Мать и дитя» МЗ Беларуси, Минск, Беларусь

Гончар А.Л. — аспирант Института генетики и цитологии НАН Беларуси; Моссе И.Б. — доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией генетики человека Института генетики и цитологии НАН Беларуси; Иванов А.А. — магистрант Института генетики и цитологии НАН Беларуси; Моссе Н.И. — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цитогенетических, молекулярно-генетических и морфологических исследований РНПЦ «Мать и дитя»; Моссе К.А. — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией цитогенетических, молекулярно-генетических и морфологических исследований РНПЦ «Мать и дитя».

Контактная информация: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, д. 27, 220072 Минск, Беларусь. Тел.: + 375 172–84–19–42. Факс: + 375 172–84–19–42. E-mail: i.mosse@igc.bas-net.by (Моссе Ирма Борисовна).

Резюме

Генетическая предрасположенность к инфаркту миокарда (ИМ) исследована по полиморфным вариантам α -Fibrinogen Thr312Ala, Factor XIII Val34Leu, PAI-1 4/5G и мутации Factor V Leiden, влияющим на активность и структуру фибриногена и плазминогена — белков, участвующих в процессе тромбообразования на конечных стадиях коагуляционного каскада. В качестве биологического материала использована дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), экстрагированная из пятен крови, высушенных на специальных бланках. Разработаны усовершенствованные методы молекулярно-генетического анализа. Показано, что распределение генотипов по аллелям полиморфизмов Thr312Ala и Val34Leu у пациентов с острым ИМ и в контрольной группе достоверно различалось. Выявленное увеличение в 2,5 раза частоты гомозигот по аллелю 34Leu у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, по сравнению с контрольной группой может свидетельствовать о повышенном риске этого заболевания у людей с генотипом LL. Показано, что генотип 4G/4G гена PAI-1 может являться предрасполагающим к возникновению ИМ, а 5G/5G — протекторным. Повышение частоты мутации Factor V Leiden в 2,3 раза в опытной группе по сравнению с контрольной свидетельствует о том, что данная мутация также является фактором риска развития инфаркта миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, генетическая предрасположенность, полиморфизм.

Polymorphisms of clot formation genes and their role in myocardial infarction

A.L. Gonchar¹, I.B. Mosse¹, A.A. Ivanov¹, N.I. Mosse², K.A. Mosse²

¹Institute of Genetics and Cytology of Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

²National Center of Research and Applied Medicine «Mother and child», Minsk, Belarus

Corresponding author: Institute of Genetics and Cytology of Belarus National Academy of Sciences, 27 Akademicheskaya st., 220072 Minsk, Belarus. Phone: + 375 172–84–19–42. Fax: + 375 172–84–19–42. E-mail: i.mosse@igc.bas-net.by (Mosse Irma, PhD, Doctor of Biology, Professor, the Head of the Human Genetics Laboratory at Institute of Genetics and Cytology of Belarus National Academy of Sciences).

Abstract

Gene polymorphisms of α -Fibrinogen Thr312Ala, Factor XIII Val34Leu, PAI-1 4/5G and Factor V Leiden mutation, responsible for activity and structure of fibrinogen and plasminogen, were studied as genetic factors predisposing to myocardial infarction. Deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from dried bloodspots was used as a matrix for polymerase chain reaction (PCR) analysis. The new improved molecular genetic methods were elaborated and used. Genotype distribution of Thr312Ala and Val34Leu polymorphisms alleles in patients with myocardial infarction and control subjects was significantly different; a 2.5-fold increase of allele 34Leu homozygote frequency in patients with myocardial infarction has been observed as compared to control group, which indicates on an increased risk of the disease in persons with LL genotype. The 4G/4G genotype of PAI-1 gene can predispose to myocardial infarction, while 5G/5G genotype could be protective. A 2.3-fold increase in the frequency of Factor V Leiden mutation observed in patients with acute myocardial infarction (AMI) as compared to control subjects, supports the hypothesis that this mutation is represent a risk factor for myocardial infarction.

Key words: myocardial infarction, genetic predisposition, polymorphisms.

Статья поступила в редакцию: 15.04.09. и принята к печати: 19.05.09.

Введение

Существует генетическая предрасположенность к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленная мутациями и полиморфными вариантами генов системы гемостаза. Генетические факторы риска этих заболеваний в мире изучены недостаточно, сведения о генетической предрасположенности к ним противоречивы [1–2].

Нами проводится исследование роли полиморфизмов Thr312Ala α -цепи фибриногена и Val34Leu XIII-го фактора свертывания крови, 4G/5G гена PAI-1 плазминогена, а также мутации Factor V Leiden V-го фактора свертывания крови, как возможных факторов риска развития инфаркта миокарда. Выбор полиморфизмов обусловлен тем, что их аллели оказывают влияние на активность и структуру фибриногена и плазминогена — белков, участвующих в процессе тромбообразования на конечных стадиях коагуляционного каскада и, соответственно, на прочность и эластичность тромба [3]. Лейденская мутация является известным фактором предрасположенности к венозным тромбозам, в то время как ее роль в развитии артериальных тромбозов изучена недостаточно.

К настоящему времени выявлено несколько десятков генетических вариантов, носительство которых ассоциировано с развитием протромботических сдвигов в системе гемостаза и/или риском атеротромбоза. Большинство из них кодирует компоненты плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. Однако существует множество вопросов относительно их участия в патогенезе различных клинических проявлений и целесообразности диагностики этих маркеров в практических целях. Сложившаяся ситуация во многом объясняется многофакторной природой атеротромбоза и сложным характером взаимодействия генетических и экзогенных факторов риска, лежащих в основе или провоцирующих развитие патологических сдвигов в системе гемостаза. Эпидемиологические исследования указывают также на возможность неодинакового вклада тех или иных факторов, в том числе генетических, в патогенез атеротромбоза у представителей различных популяционных групп.

Необходимость использования принципиально новых подходов при изучении основ генетической предрасположенности к тромбозу диктуется существующей на сегодняшний день концепцией о полигенном характере тромбофилии, которая постулирует наличие не одного, а нескольких генетических вариантов, модифицирующих риск развития заболевания. Ввиду этого особый интерес уделяется явлению аллельного полиморфизма, которое присуще большинству генов человека, в том числе тем, продукты которых вовлечены в регуляцию тромбообразования.

В процессе свертывания крови конечным продуктом является фибрин, образующийся из фибриногена под влиянием тромбина. В организме существуют специфические ингибиторы для каждого фактора свертывания крови. Снижение активности ингибиторов приводит к повышению свертываемости крови и способствует тромбообразованию. Функция фибринолитической

системы заключается в фибринолизе, то есть расщеплении фибриновых волокон на растворимые в воде фрагменты под действием фермента плазмина. В норме в крови находится неактивный предшественник плазмина плазминоген. Активаторов плазминогена в организме достаточно много. Одним из основных компонентов антисвертывающей системы крови является ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) [4]. Этот белок регулирует тканевый и урокиназный активаторы плазминогена. PAI-1 обеспечивает до 60 % общей ингибиторной активности в отношении активатора плазминогена в плазме, играя важную роль в регуляции фибринолиза. Повышение уровня PAI-1 связано с увеличением риска тромбозов [5].

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 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 того, как была выявлена способность обоих аллелей связываться с активатором транскрипции гена, тогда как аллель 5G также имеет сайт связывания с транскрипционным репрессором [6]. Отсутствие действия репрессора и обеспечивает более высокий уровень транскрипции гена PAI-1 с аллелем 4G. Влияние 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 на риск развития инфаркта миокарда до сих пор точно не установлено. Некоторые исследования свидетельствуют о том, что генотип 4G/4G обуславливает повышенный риск инфаркта миокарда [7], но в то же время имеются сообщения, что этот генотип является нейтральным [8] или даже протекторным [9].

Материалы и методы

Образцы крови больных, перенесших острый инфаркт миокарда, были предоставлены Республиканским научно-практическим центром «Кардиология» МЗ Беларуси. Контрольная группа состояла из лиц старше 50 лет, без явной сердечно-сосудистой патологии. В качестве биологического материала для исследования была использована ДНК, экстрагированная из пятен крови, высушенных на специальных бланках.

Для определения аллелей полиморфизма альфа-цепи фибриногена Thr312Ala была разработана методика на основе принципа Tetra-primer ARMS [10], суть которой заключается в использовании двух пар праймеров — внешних и внутренних. Внутренние праймеры являются аллель-специфичными, а внешние ограничивают сайт мутации таким образом, что при разделении продуктов полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с помощью электрофореза разным аллелям соответствуют полосы различной длины.

Идентификацию мутации Factor V Leiden и полиморфизма Val34Leu проводили методом ARMS [11]. Разделение продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Таблица 1

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ АЛЛЕЛЯМ Thr312Ala

Группы	Генотип			Аллели	
	ТТ	ТА	АА	Т	А
контрольная группа	N = 100			N=200	
	64 (64,0 %)	29 (29,0 %)	7 (7,0 %)	157 (78,5 %)	43 (21,5 %)
пациенты с инфарктом миокарда	N = 90			N = 180	
	55 (61,1 %)	34 (37,7 %)	2 (2,2 %)	144 (80,0 %)	38 (21,1 %)
χ^2	6,17			0,02	
P	0,01			0,88	

Таблица 2

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ АЛЛЕЛЯМ Val34Leu

Группы	Генотип			Аллели	
	VV	VL	LL	V	L
контрольная группа	N = 110			N = 220	
	48 (43,6 %)	58 (52,7 %)	4 (3,7 %)	152 (69,1 %)	68 (30,9 %)
пациенты с инфарктом миокарда	N = 66			N = 132	
	27 (40,9 %)	33 (50,0 %)	6 (9,1 %)	87 (65,9 %)	45 (34,1 %)
χ^2	4,76			0,48	
P	0,03			0,50	

Для анализа полиморфизма 4G/5G промоторной области гена PAI-1 нами разработана оригинальная методика с использованием автоматического капиллярного электрофореза с полихромным лазерным сканированием. В отличие от применявшихся ранее данная методика позволяет определять аллели полиморфизма 4G/5G непосредственно по разнице в размере фрагмента ДНК, составляющей 1 нуклеотид.

Результаты и их обсуждение

1. Исследование частот генотипов и полиморфных аллелей Thr312Ala и Val34Leu. Распределение аллелей полиморфизма Thr312Ala исследовано в 100 образцах крови контрольной группы (200 хромосом) и в 90 образцах крови больных, перенесших острый инфаркт миокарда. В группе пациентов обнаружено 61,1 % гомозиготных и 37,7 % гетерозиготных носителей аллеля Т по сравнению соответственно с 64 % и 29 % в контроле, то есть наблюдается снижение по сравнению с контрольной группой частоты нормальных генотипов и увеличение частоты гетерозигот по А аллелю (табл. 1). В то же время частоты аллелей полиморфизма Thr312Ala у больных с инфарктом миокарда существенно не отличались от контрольной выборки (табл. 1).

Известно, что замена валина на лейцин в гене фактора XIII, обусловленная полиморфизмом Val34Leu, ме-

няет структуру фибриновых волокон [12], что влияет на процесс тромбообразования. При исследовании данного полиморфизма нами не выявлено различий в частотах нормальных и гетерозиготных генотипов в опытной и контрольной группах, однако частота гомозигот по аллелю 34Leu у больных оказалась значительно (в 2,5 раза) выше, чем в контрольной группе (табл. 2), что может свидетельствовать о роли этого аллеля в развитии острого инфаркта миокарда.

2. Исследование мутации Factor V Leiden. Поиск мутации Factor V Leiden выполнен в группе, состоящей из 100 пациентов с инфарктом миокарда, среди которых мы обнаружили 7 гетерозиготных носителей и ни одного гомозиготного. Частота мутации Factor V Leiden в данной группе составила 7 %. В то же время в контрольной группе (численностью 100 человек) было обнаружено 3 гетерозиготных носителя данной мутации, то есть частота мутации Factor V Leiden составила 3 %, что в 2,3 раза меньше, чем в группе больных инфарктом миокарда (табл. 3).

Таким образом, установлено, что частота встречаемости данной мутации у пациентов с острым инфарктом миокарда в 2,3 раза превышает эти показатели в контрольной группе. Эти результаты свидетельствует о том, что мутация Factor V Leiden вносит существенный

Таблица 3

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО МУТАНТНЫМ АЛЛЕЛЯМ FACTOR V LEIDEN

Группы	Генотип			Аллели	
	GG	GA	AA	G	A
контрольная группа	N = 100			N = 200	
	97 (97,0 %)	3 (3,0 %)	0 (0 %)	197 (98,5 %)	3 (1,5 %)
пациенты с инфарктом миокарда	N = 100			N = 200	
	93 (93,0 %)	7 (7,0 %)	0 (0 %)	193 (96,5 %)	7 (3,5 %)
χ^2	5,8			2,83	
P	0,01			0,09	

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФНЫМ АЛЛЕЛЯМ 4G/5G ГЕНА PAI-1

	Генотип			Аллели	
	4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G
контрольная группа	N = 150			N = 300	
	43 (28,7 %)	75 (50,0 %)	32 (21,3 %)	161 (54,1 %)	139 (45,9 %)
пациенты с инфарктом миокарда	N = 80			N = 160	
	33 (41,2 %)	34 (42,5 %)	13 (16,3 %)	100 (62,5 %)	60 (37,5 %)
χ^2	7,74			2,84	
P	0,01			0,10	

вклад в предрасположенность к развитию инфаркта миокарда.

3. *Исследование частот генотипов и полиморфных аллелей 4G/5G гена PAI-1.* Популяционное распределение аллелей гена PAI-1 исследовано в контрольной группе из 150 человек (300 хромосом). Частота аллеля 4G составила 53,7 %. Выявлено 43 (28,7 %) гомозиготных носителя и 75 (50 %) гетерозиготных носителей данного аллеля. Частота аллеля 5G составила 46,3 %. В гомозиготном состоянии он был выявлен у 32 (21,3 %) человек.

Аллели гена PAI-1 исследованы также у 80 пациентов с острым инфарктом миокарда (160 хромосом). Частота аллеля 4G в этой группе составила 62,5 %. Выявлено 33 гомозиготных носителя и 34 гетерозиготных носителя данного аллеля. Частота аллеля 5G составила 37,5 %. В гомозиготном состоянии он был выявлен у 13 человек. Полученные результаты показывают, что генотип 4G/4G может являться предрасполагающим к возникновению инфаркта миокарда, а 5G/5G — протекторным (табл. 4).

Заключение

Полученные нами результаты не позволяют сделать однозначных выводов о влиянии полиморфизма Thr312Ala на генетическую предрасположенность к развитию инфаркта миокарда. Что касается Val34Leu, то увеличение в 2,5 раза частоты гомозигот по аллелю 34Leu у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, по сравнению с контрольной группой может свидетельствовать о повышенном риске этого заболевания у людей с генотипом LL. При исследовании полиморфных аллелей 4G/5G гена PAI-1 показано, что генотип 4G/4G может являться предрасполагающим к возникновению инфаркта миокарда, а 5G/5G — протекторным. Частота мутации Factor V Leiden в опытной группе оказалась в 2,3 раза выше, чем в контрольной, что свидетельствует о том, что данная мутация также является фактором риска развития инфаркта миокарда.

Работа выполняется в рамках Госпрограммы РБ «Биотехнология».

Авторы выражают признательность сотрудникам Республиканского научно-практического центра «Кардиология» МЗ Республики Беларусь за предоставление образцов крови больных острым инфарктом миокарда.

Литература

1. Voetsch B., Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 216–229.
2. Curran J.M. The α -fibrinogen T/A312 polymorphism in the ECTIM study // *Thromb. Haemost.* — 1998. — Vol. 79. — P. 1057–1058.
3. Carter A.M. Association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation // *Circulation.* — 1999. — Vol. 99. — P. 2423–2426.
4. Saksela O., Rifkin D.B. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiologic functions // *Annu. Rev. Cell. Biol.* — 1988. — Vol. 4. — P. 93–126.
5. Schneiderman J., Sawdey M.S., Keeton M.R. et al. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 6998–7002.
6. Eriksson P., Kallin B., Hoofst F.M. et al. Allele specific increase in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 1851–1855.
7. Boekholdt S.M., Bijnsterveld N.R., Moons A.H. et al. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review // *Circulation.* — 2001. — Vol. 104. — P. 3063–3068.
8. Doggen C.J., Bertina R.M., Manger Cats V. et al. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction // *Thromb. Haemost.* — 1999. — Vol. 82. — P. 115–120.
9. Hoekstra T., Geleijnse J.M., Kluft C. et al. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly // *Stroke.* — 2003. — Vol. 34. — P. 2822–2828.
10. Shu Ye, Sahar Dhillon, Xiayi Ke et al. Collins and Ian N. M. Day. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms // *Nucl. Acid. Res.* — 2001. — Vol. 29, № 17. — P. e88.
11. Scobie G.A., Ho S.T., Dolan G. et al. Development of a rapid DNA screening procedure for the Factor V Leiden mutation // *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* — 1996. — Vol. 49. — P. 361–363.
12. Wells Ph.S., Anderson J.L., Scarvelis D.K. et al. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis // *Am. J. Epidemiol.* — 2006. — Vol. 164. — P. 101–109.