

На правах рукописи

САДИКОВА РЕГИНА ИЛЬГИЗОВНА

**Клинико-иммунологические и генетические предикторы
эндотелиальной дисфункции у больных инфарктом миокарда**

14.01.04 – Внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Уфа – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Муталова Эльвира Газизовна**

Официальные оппоненты:

Гапон Людмила Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, Тюменский кардиологический научный центр - филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», заведующий научным отделом клинической кардиологии

Ложкина Наталья Геннадьевна, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры факультетской терапии им. проф. Г.Д. Залесского лечебного факультета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ года в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.084.04 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, адрес организации: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34) и на сайте www.rzgmu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

Песков О.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) умирают более 16 млн. человек. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения к 2030 году смертность от ССЗ может достигнуть 269 случаев на 100000 населения (Global status report on noncommunicable diseases, 2014). Инфаркт миокарда (ИМ) занимает лидирующее положение в структуре заболеваемости, смертности и инвалидности населения экономически развитых стран мира. В настоящее время участие процессов воспаления в развитии атеросклероза и ИБС, в том числе, ИМ, достаточно доказаны (Мурашов И.С. и др., 2017; Вербовой А.Ф., Пашенцева А.В., Вербовая Н.И., 2018; Дзугкоев С.Г. и др., 2019; Montecusso F. et al., 2017, Anderson J.L., Morrow D.A., 2017). Известно, что повреждение эндотелия сосудов влечет за собой его функциональные нарушения, которые лежат в основе развития ССЗ, в частности, ИМ (Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д., 2017; Котюжинская С.Г., Уманский Д.А., 2017). В основе дестабилизации атеросклеротической бляшки лежит процесс воспаления, главными участниками которого являются цитокины: МСР-1, ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, которые стимулируют выработку С-реактивного белка в гладкомышечных клетках сосудов, тем самым усугубляя воспаление в сосудистой стенке и дисфункцию эндотелия. Считается, что баланс про- и противовоспалительных факторов, как и соотношение протеиназы/ингибиторы определяют течение постинфарктного периода и скорость ремоделирования поврежденных тканей (Петрищев Н.Н. и др., 2015; Фатхуллина А.Р., Пешкова Ю.О., Кольцова Е.К., 2016; Hansson G.K., 2017; Ong S.B. et al., 2018; Lino D.O.C. et al., 2019). Однако, большинство современных исследователей акцентируют свое внимание только на изменениях цитокинового профиля без учета уровней белков, синтез которых стимулируется изучаемыми цитокинами (Briasoulis A. et al., 2016; Seropian I.M. et al., 2016; Min X. et al., 2017; Ridker

Р.М., 2019). Представляется перспективным использование комплексной оценки концентрации ряда цитокинов при прогнозировании течения острых коронарных событий. На сегодняшний день выявлены основные факторы риска развития ИБС, но остаются неясными генетические аспекты развития заболевания, тогда как именно они определяют индивидуальную восприимчивость к неблагоприятным внешнесредовым факторам и могут являться основой эффективной первичной и вторичной профилактики патологии. Поиск генов ИБС основывался на существующих представлениях о факторах риска развития заболевания, его этиологии и патогенезе. Хотя имеются данные о взаимосвязи функции эндотелия и генетических факторов в развитии ИМ, однако оценка клинических показателей связи воспаления с параметрами генетического полиморфизма генов-кандидатов эндотелиальной дисфункции в развитии ИМ ограничена, остается недостаточно изученной система иммунных предикторов и реактивность сосудов в возникновении и течении ИМ.

Цель исследования

Оценить клиничко-иммунологические и генетические предикторы развития эндотелиальной дисфункции у больных QИМ.

Задачи исследования

1. Оценить наличие и степень возможного взаимоотношения между ремоделированием крупных сосудов и миокарда у больных QИМ.

2. Оценить проявление системного воспаления по уровню провоспалительных цитокинов, моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в сыворотке крови у больных QИМ.

3. Провести изучение морфогенеза и клеточного гомеостаза по анализу содержания компонентов апоптоза (CD95+(Fas), активности каспаз при QИМ.

4. Провести анализ распределения частот генотипов полиморфных маркеров генов-кандидатов возможных предикторов развития ЭД в выборках

здоровых индивидов и больных, перенесших QИМ: *SELP* (1q24.2, S331N, rs6131), *VCAM1* (1p32-p31, c.928+420A>C, rs3917010), *VEGFA* (6p21.1, -2549(18)I/D, rs34357231), *CCL2* (17q12, -2518A>G, rs1024611), *NOS3* (7q36, E298D, rs1799983), *DDAH1* (1p22, c.303+30998A>G, rs669173).

5. Провести анализ взаимосвязи процессов ремоделирования крупных сосудов и миокарда, состояния иммунного воспаления, апоптоза и генетических факторов у больных QИМ.

Научная новизна результатов исследования

Впервые проведено сопоставление концентрации хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), компонентов апоптоза с биомаркерами субклинического воспаления, клиническими, анамнестическими, инструментальными и лабораторными показателями у пациентов с ИМ, а также оценена его роль в формировании патологического ремоделирования миокарда ЛЖ. Впервые был проведен анализ частот генотипов и аллелей полиморфизмов генов молекул адгезии *VCAM1* и селектина P, генов хемокинов rs1024611 (-2518A> G) гена *CCL2* и rs34357231 (-2549(18)I/D) гена *VEGFA*, генов эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*) и гена *DDAH1* у больных с QИМ, выделены генетические маркеры повышенного риска ИМ и протективные маркеры.

Практическая и теоретическая значимость

Теоретическая значимость диссертационного исследования состоит в увеличении данных о роли хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), компонентов апоптоза в патогенетических реакциях ремоделирования миокарда ЛЖ и эндотелиальной дисфункции при QИМ, что позволяет улучшить прогнозирование неблагоприятных исходов ИМ, и в будущем определить дополнительные молекулярные аспекты оценки эффективности патогенетической терапии данного заболевания. Выделение генетических маркеров повышенного риска QИМ и протективных маркеров будет способствовать совершенствованию проведения реабилитации пациентов с QИМ и определить группы риска.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Повышенные концентрации провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), компонентов апоптоза у пациентов с QИМ ассоциированы с исходной клинической тяжестью больных, связанной с наличием гипертонической болезни, дислипидемии, эндотелиальной дисфункции.

2. Повышенные значения провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), компонентов апоптоза у пациентов с QИМ связаны с тяжестью патологического постинфарктного ремоделирования миокарда ЛЖ в виде систолической и диастолической дисфункций.

3. Выделены маркеры повышенного риска инфаркта миокарда - генотипы и аллели: *VCAM1**A/*C, *CCL2**G/*G, *CCL2**G, *VEGFA**I, *DDAH1**T/*T и *DDAH1**T; протективными маркерами являются - генотипы и аллели *VCAM1**A/*A, *CCL2**A, *VEGFA**D/*D, *VEGFA**D и *DDAH1**C. У больных с QИМ и АГ в анамнезе предикторами развития воспаления и атеротромбоза становятся генотипы *CCL2**G/*G, *VEGFA**I/*D.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах написания диссертации: самостоятельно проведен анализ зарубежных и отечественных литературных источников, разработка дизайна и организация исследования, набор материала, его статистическая обработка и анализ полученных результатов, написание научных статей, тезисов и рукописи диссертационного исследования.

Апробация диссертации и публикации

Основные положения диссертации представлены на Московском международном форуме кардиологов (Москва, 2012, 2013), конференции «Ломоносов-2014» (Москва, 2014). По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 6 – в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, а также 2 – в журналах, индексируемых в Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 163 страницах печатного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка условных сокращений и списка литературы, состоящего из 316 источников (121 отечественных и 195 зарубежных работ). Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 29 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на базе кардиологического отделения МБУЗ ГКБ № 13, Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова и в лаборатории молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН (директор – академик РАН, проф. Э.К. Хуснутдинова).

Всего в исследование включено 667 мужчин с Q-образующим инфарктом миокарда, в возрасте от 35 до 64 лет (средний возраст $50,15 \pm 0,5$ года), всем пациентам было проведено генотипирование по 6 полиморфным локусам. Из них полное клиническое обследование, включающее лабораторно-инструментальные исследования, иммуноферментный анализ и реакцию апоптоза прошли 90 мужчин (средний возраст $53,3 \pm 2,2$ года). В качестве контроля в молекулярно-генетических методах использовали сыворотки крови 621 практически здоровых мужчин, в группу сравнения для лабораторных исследований вошли 20 практически здоровых мужчин – донора сравниваемого возраста ($49,3 \pm 1,8$ года).

В данной группе на момент обследования по анамнестическим и лабораторным данным не имелось острых и хронических сердечно-сосудистых, аутоиммунных заболеваний. Все мужчины дали добровольное письменное согласие на участие в исследовании. Результаты были внесены в разработанную анкету, где отражались паспортные данные, субъективные и

объективные показатели, результаты инструментальных и лабораторных исследований.

Настоящее исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practise) и принципами Хельсинской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. У всех пациентов, включенных в исследование, было подписано информированное согласие. Критерии включения: 1. Наличие ИМ на момент поступления согласно критериям, определённым в Национальных рекомендациях и «Третьем универсальном определении инфаркта миокарда» (Национальные рекомендации по диагностике и лечению больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST ЭКГ, 2007; Thygesen K. et al., 2012); 2. Начало симптомов не более чем за 24 часа до госпитализации; 3. Подписанное информированное согласие.

Диагноз «инфаркт миокарда» имел место при доказанном некрозе миокарда вследствие длительной острой его ишемии. Диагноз устанавливали при наличии повышения и/или закономерной динамики снижения кардиоспецифических ферментов (тропонин Т) в сочетании хотя бы с одним из нижеследующих критериев: а) симптомы ишемии миокарда; б) диагностически значимая элевация сегмента ST либо впервые зарегистрированная блокада левой ножки пучка Гиса (БЛНПГ); в) патологический зубец Q на ЭКГ; г) появление нежизнеспособного миокарда или выявление зон гипо- /акинеза; д) выявление интракоронарного тромбоза при ангиографическом или патологоанатомическом исследовании. Все ИМ относились к 1 типу – спонтанному ИМ. При появлении патологического зубца Q на ЭКГ ИМ считался Q-образующим (ИМсQ), при отсутствии – ИМ без патологического зубца Q (ИМ без Q). Критерии невключения: 1. Наличие клинически значимой сопутствующей патологии (метастазирующие онкологические заболевания, тяжелые хронические заболевания внутренних органов в стадии обострения, печеночная недостаточность, тяжелая хроническая обструктивная болезнь

легких, аутоиммунные заболевания, терминальная почечная недостаточность, психические заболевания); 2. ИМ, осложнившийся ЧКВ, или коронарное шунтирование; 3. Смерть больного в первые сутки заболевания.

Методы исследования

У всех пациентов при госпитализации собирали жалобы, анамнез, проводили осмотр, оценивали результаты лабораторных и инструментальных исследований. По классификации Killip оценивали тяжесть ОН, далее сердечную недостаточность анализировали по NYHA. Всем пациентам выполнены стандартные при ИМ лабораторные обследования: общий анализ крови, биохимический анализ крови с оценкой липидного спектра глюкозы, креатинина, мочевины, калия, общего белка, билирубина, аспаратаминотрансферазы, аланиламинотрансферазы, уровня кардиоспецифических маркеров некроза миокарда (КФК-МВ, тропонин Т/И) с использованием стандартных реактивов. Для расчёта скорости клубочковой фильтрации (СКФ) использовали формулу СКД - EPI. Определяемые показатели гемостаза включали в себя активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПТИ), международное нормализованное отношение (МНО), фибриноген, количество тромбоцитов, участвующих в агрегации, время агрегации с коллагеном и аденозиндифосфатом. Тропонин Т определяли количественным методом с помощью набора «TnT» («Roche», Швейцария). Из инструментальных методов исследования применялись ЭКГ, эхокардиография (ЭхоКГ), триплексное сканирование брахиоцефальных артерий. За период госпитализации проводилось ультразвуковое исследование ЭКА для выявления признаков ремоделирования. В рамках данной работы у пациентов проводилось определение в сыворотке крови следующих биологических маркеров – ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-1 β , определение содержания MCP-1, VEGF в сыворотке крови в первые сутки госпитализации.

Активность апоптоза изучалась по показателям спонтанного апоптоза по содержанию CD95+ лимфоцитов, количеству 1- и 2-нитевых разрывов ДНК и

активности каспаз (K4, K8). Для вычисления FaS (CD95) использовали МКА мышей против антител человека CD95 клона DX-2 (Galtag Lab., USA). Оценка апоптоза циркулирующих лимфоцитов проводилась по активности K4 и K8 после реакции флуоресценции (ФЦ) с использованием специфических субстратов K и по выявлению количества 2-нитевых и 1-нитевых разрывов ДНК методом ФЦ ДНК-тропных красителей – бромистого этидия (EtBr) и 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI).

ДНК выделяли из 10 мл периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew C.C., 1984). Амплификацию полиморфных локусов генов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на амплификаторах «Терцик» производства компании «ДНК-технология» (Россия). Подбор праймеров и рестриктаз осуществляли с помощью базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/SNP>) и пакета программ DNASTAR V.5.0. Разделение фрагментов ДНК проводили при помощи электрофореза на полиакриламидном или агарозном гелях. Фоторегистрацию результатов выполняли при УФ-освещении.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 5.0 (Stat-Soft), SPSS v.13.0. Для сравнения количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовался t-критерий Стьюдента. При сравнении исследуемых групп проводилось парное сравнение групп с использованием непараметрического теста для проверки достоверности различий изучаемых признаков в независимых выборках – U-тест Манна-Уитни с поправкой Бонферони. Различия считались высоко значимыми при $p < 0,01$, значимыми – при $p < 0,05$. Анализ достоверности различий относительных величин выполнялся по критерию χ^2 . Для выявления корреляционных взаимосвязей использовался метод ранговых корреляций Спирмена (Реброва О.Ю., 2002). Для сравнения групп по частотам генотипов и аллелей использовался точный двухсторонний тест Фишера. Относительный риск

заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как соотношение шансов (OR - odds ratio).

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное нами исследование выявило определенные различия между группами исследуемых. У 38 (42,2%) больных ангинозная боль была спровоцирована значительной физической нагрузкой, у 24 (24,4%) – сильным психоэмоциональным стрессом, у 5 (6,7%) – приемом алкоголя, у оставшейся группы пациентов не было связи с провоцирующими факторами. Все больные в момент поступления в стационар отмечали боли за грудиной давящего, жгучего, сжимающего характера, не купирующиеся приемом нитроглицерина, анальгетиками. Длительность болевого синдрома составила от 5 (от начала инфузионной терапии) до 24 часов, у 8 (8,9 %) пациентов и у 5 (5,6 %) в течение 48 часов, у остальных длительность болевого синдрома не превышала 5 часов. Болевой синдром был ведущим показателем во всех группах, что свидетельствует о типичном ангинозном характере ИМ. «Стаж» заболевания ИБС в среднем составил от 9 до 12 лет. У 49 (54,4 %) пациентов – наличие в анамнезе близких родственников с ИМ и ИБС. Среднее значение систолического артериального давления (САД) составил $102,3 \pm 3,7$ мм.рт.ст., диастолического артериального давления (ДАД) – $60,1 \pm 4,1$ мм.рт.ст. Частота сердечных сокращений (ЧСС) более 80 уд. в/мин отмечено у 61 (67,8 %) больных, менее 60 уд. в/мин – у 18 (20 %) и в пределах от 60 до 80 уд. в/мин – у 9 (10 %) пациентов. У 48 (53,3%) больных выявлены нарушения ритма по типу экстрасистолии, пароксизмальной тахикардии. Артериальная гипертензия (АГ) отмечена у 74 (82,2%) пациента, где САД составило $150,0 \pm 9,74$ мм.рт.ст., ДАД – $81,10 \pm 7,05$ мм.рт.ст. Субфебрильная температура в пределах $37,5-37,7^{\circ}\text{C}$ тела в течение 2-3 дней отмечалась у 90 % пациентов. На ЭКГ в 12 общепринятых отведениях у 90 (100%) больных определялся зубец QS. В первые сутки госпитализации повышение КФК МВ выше 25 ЕД/л было у 82,2 %, положительный тропонин I, определенный экспресс-методом, - у 95,6 % пациентов. Согласно проведенному анализу данных ЭКГ, выполненной при

поступлении, обнаружено, что у 75 (83%) пациентов имелся синусовый ритм, также в 6 (6,6%) случаях выявлена синусовая тахикардия, в 2 (2,3%) синусовая брадикардия, ФП отмечена у 7 (7,7%) пациентов. АГ в анамнезе отмечалась у 82% пациентов, предшествовавшая ИМ стенокардия наблюдалась у 42,2% больных. Среди других факторов риска 85,7 % пациентов имели повышенную массу тела и ожирение, курили до возникновения ИМ 56,7% пациентов, у 2/3 индекс курения составил $25,8 \pm 10,1$ пачка/лет, т.е. отнесены к злостным курильщикам. У 26 (28,8%) пациентов выявлен задний ИМ, у 61 (67,7%) больных – передней локализации ИМ, у 2 (2,2%) больных засвидетельствован задний ИМ с вовлечением правого желудочка, а у 1 (1,1%) был обнаружен циркулярный ИМ. Значение медианы фракции выброса в группе пациентов приходится на 50 [41 и 62] %. Проявление ОСН у большинства пациентов отмечалось в пределах I - II классов по Killip, а именно у 72 (80 %) больных I класс и у 13 (14,4%) – II класс по Killip.

Анализ липидного спектра выявил значительное повышение ОХС, ХС ЛПНП и атерогенного коэффициента со снижением ХС ЛПВП, у каждого четвертого больного ИМ выявлялся II Б тип гиперлипидемии.

Показатели коагуляционного гемостаза и фибринолиза у больных ИМ выявили наличие гиперкоагуляции. Концентрация фибриногена увеличилась до $4,78 \pm 0,22$ г/л (в сравнении – $2,84 \pm 0,12$ г/л, $p < 0,05$), фибринолитическая активность снижалась до $12,04 \pm 0,64\%$ (в контроле $15,6 \pm 2,4\%$, $p < 0,05$).

Проведена оценка патологического постинфарктного ремоделирования сердца и сосудов и выраженности эндотелиальной дисфункции у пациентов с ИМ. Средние значения толщины стенок миокарда ЛЖ у больных ИМ статистически недостоверно отличались от показателей контрольной группы. Выявлены статистически значимые отличия по показателям размеров ЛЖ, и ЛП у больных ИМ по сравнению с контрольной группой. У всех больных ИМ выявлялось статистически значимое увеличение переднезаднего размера ЛП ($p < 0,05$). Сохранение нормальных структурно-функциональных взаимоотношений в виде нормальной геометрии миокарда выявлено только у

13,3% (12 больных). У 78 больных (86,7%, $p < 0,01$) выявлено ремоделирование ЛЖ сердца, где главными составляющими которого были повышение КДО левого желудочка на 46,2% ($p < 0,001$), КСО на 72,5% ($p < 0,001$) и уменьшение фракции выброса на 15,8% ($p < 0,01$). Нами проведен анализ наличия либо отсутствия гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ) и ее тип. Выявлено, что среди больных ИМ преобладают больные с концентрическим ремоделированием левого желудочка (ГЛЖ 1 типа) - 44% и концентрической ГЛЖ (ГЛЖ 2 типа) - 36%, эксцентрическая ГЛЖ (ГЛЖ 3 типа) отмечена у 12% пациентов, а у 8% - нет ГЛЖ. При исследовании диастолической функции выявлено ее нарушение в виде достоверного увеличения времени изоволюмического расслабления и изменения трансмитрального диастолического потока преимущественно по гипертрофическому типу, нарушения заполнения ЛЖ наблюдаются у всех обследованных больных ИМ в первые 4 суток ИМ. Постинфарктное ремоделирование можно рассматривать как еще один механизм срочной компенсаторной реакции сердца в ответ на внезапную потерю части сократительного миокарда, обусловленный повышением преднагрузки на ЛЖ, с другой стороны, как отражение изменение жесткости миокарда ЛЖ в результате процессов заживления и формирования рубца.

Нами изучались структура и функциональное состояние сосудистой стенки общей сонной артерии (ОСА) и бедренной артерии (ОБА) у больных ИМ, выделена группа ИМ в сочетании с АГ. Определен комплекс «интима-медиа» (ТИМ) как показателя толщины субэндотелиальных слоев – раннего маркера атеросклеротического процесса. Анализ процессов сосудистого ремоделирования в зависимости от наличия АГ показал, что при ИМ без АГ показатель ТИМ повышался на 71% по отношению к контрольной группе и составил $1,18 \pm 0,016$ мм при контроле $0,69 \pm 0,04$ мм ($p < 0,05$), а при сочетании ИМ с АГ превышал группу контроля уже на 107,2% ($1,43 \pm 0,02$ мм, $p < 0,01$) и показателя больных без АГ на 21%, что указывало на значимое увеличение атероматоза на ОСА у пациентов при сочетании АГ с ИМ (рисунок 1).

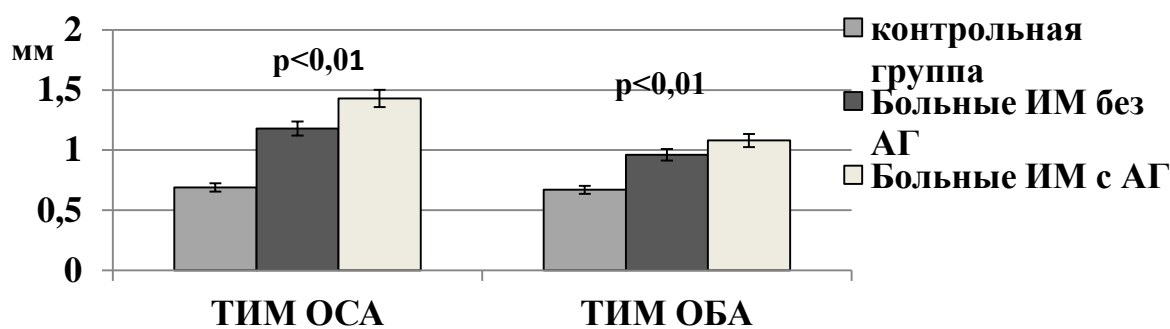


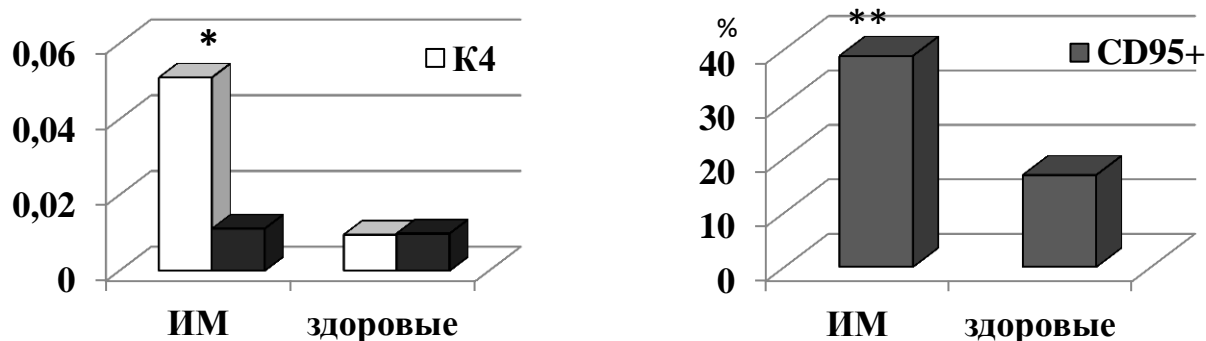
Рисунок 1 – Показатель толщины интима-медиа ОСА и ОБА у больных ИМ в зависимости от наличия АГ

Увеличение ТИМ ОБА было менее выражено, но значимо отличалось от группы сравнения у больных ИМ без АГ, а при сочетании с АГ ТИМ ОБА увеличилась на 70,9% ($p < 0,01$). Полученные изменения ТИМ сосудистой стенки могут свидетельствовать о том, что предиктором острых коронарных нарушений становится ремоделирование периферических сосудов с развитием атероматоза.

С целью изучения цитокинового профиля в развитии ИМ был проведен анализ IL-1 β ; TNF- α . Результаты исследования показали, что содержание IL-1 β как высоко значимого провоспалительного цитокина превышало уровень здоровых лиц в 2,5 раза и составило 28,77(10,6;40,1) пкг/мл (при контроле 10,77 пкг/мл, $p = 0,002$). Содержание IL-6 в сыворотке крови было также достоверно выше у больных ИМ (6,36 (3,81;7,12) чем у здоровых (2,15 пкг/мл, $p = 0,032$), как быстрофазовый ответ на воспаление. Уровень TNF- α был также значимо выше у больных ИМ (24,8 (18,6;28,4) пкг/мл по сравнению с контрольной группой 7,58 пкг/мл, $p = 0,01$). Выявлена высокая корреляционная зависимость уровня IL-1 β с уровнем КФК-МВ ($r = 0,48$; $p = 0,01$). Получена корреляционная связь между уровнем ХСЛПНП и показателями провоспалительных цитокинов IL-1 β ($r = 0,88$; $p = 0,01$) и IL-6 ($r = 0,98$; $p = 0,001$) и обратная с уровнем лимфоцитов ($r = -0,63$; $p = 0,032$).

Активность апоптоза изучалась по показателям спонтанного апоптоза по содержанию CD95+ лимфоцитов, количеству 1- и 2-нитевых разрывов ДНК и активности каспаз (K4, K8). Показатели CD95+ лимфоцитов крови выявили

статистически значимое повышение их содержания у больных ИМ до 38,84% (28,4;43,6% по отношению к контролю 16,9%, $p=0,024$), что определяет высокую готовность кардиомиоцитов к апоптозу, также у больных ИМ выявлена высокая активность каспаз (К4, К8) (рисунок 2).



Примечание: достоверность различий со здоровыми *- $p<0,05$;**- $p<0,01$

Рисунок 2– Активность компонентов апоптоза в исследуемых группах

Реакция апоптоза оказалась также выше по количеству 1- и 2-нитевых разрывов ДНК (таблица 1).

Таблица 1 – Количество 1- и 2-нитевых разрывов ДНК

	Флуоресценция ДНК-прочных красителей	
	EtBr	DAPI
Больные ИМ	5,78 (3,9;6,8)**	30,40 (20,6;34,2)*
Здоровые	5,20 (4,0;5,18)	28,02 (26,0;29,1)

Примечание: достоверность различий со здоровыми *- $p<0,05$;**- $p<0,01$;

EtBr – этидиумбромид; DAPI – 4,6 диамидин -2-фенилиндола.

Анализ полученных результатов выявил статистически значимое увеличение содержания CD95+(Fas) лимфоцитов у больных ИМ в 2,3 раза, высокую активность каспаз (К4 и К8) по отношению к здоровым лицам и значимое увеличение количества 1- и 2-нитевых разрывов ДНК. Высокие показатели К4 объясняются ролью К4 как активатора цитокинов и участием в реализации провоспалительного эффекта. Это подтверждается корреляционной связью К4 с IL-6 ($r=0,68$; $p=0,002$). Активация К8 предполагает значение программированной клеточной гибели в развитии заболевания. Отмечена положительная корреляция уровня К8 с СРБ ($r=0,64$; $p=0,001$), болевым

синдромом ($r=0,48$; $p=0,038$), однако связь активности К8 с количеством разрывов ДНК оказалась ниже (5,38-29,14). Отмечена слабая положительная корреляция CD95+(Fas) с К8 ($p=0,054$). На основании полученных данных можно отметить, что у больных ИМ имеется более интенсивный апоптоз лимфоцитов периферической крови определяемый повышением количества 1-нитевых и 2-нитевых разрывов ДНК, более высокой активностью CD95+(Fas) лимфоцитов, каспаз 4 и 8, как активатора провоспалительных цитокинов.

Мы изучили уровень фактора VEGF у больных ИМ в зависимости от наличия АГ. У больных ИМ без АГ отмечено значимое повышение VEGF до $223,7 \pm 25,89$ пг/мл ($p=0,001$), но на 30,9% ниже уровня больных ИМ с АГ. При наличии АГ уровень ростового фактора увеличивается до $265,8 \pm 27,68$ пг/мл, превышая группу сравнения в 3 раза ($p=0,001$). Результаты корреляционного анализа установили прямую связь фактора роста эндотелия VEGF с клетками апоптоза CD95+(Fas) ($r=0,64$; $p=0,002$), цитокинами IL-1 β , IL-6 ($r=0,64$ и $r=0,72$; $p=0,01$). Значимое увеличение уровня MCP-1 выявлено только у больных ИМ с АГ ($256,49 \pm 51,49$ пг/мл, $p=0,025$). У больных ИМ без АГ наблюдались более низкие значения уровня MCP-1 ($163,85 \pm 78,12$ пг/мл, $p=0,68$), однако его содержание было выше группы сравнения. Таким образом, у больных ИМ иммунная система характеризуется нарушением цитокиновой регуляции с активацией продуктов острого воспаления (IL-1 β , IL-6), повышением содержания VEGF как активатора агрегации тромбоцитов и ангиогенеза сосудистого русла.

В рамках молекулярно-генетического исследования нами проведен анализ ассоциаций с ИМ полиморфных локусов шести генов: *SELP* (S331N), *VCAM1* (c.928+420A>C), *VEGFA* (-2549(18)I/D), *CCL2* (-2518A>G), *NOS3* (E298D), *DDAH1* (c.303+30998A>G). Полиморфные локусы были выбраны на основе анализа литературных данных, сведений из компьютерных геномных баз данных. Полученные в результате проведенного исследования оценки частот аллелей и генотипов по полиморфному участку rs3917010

(с.928+420A>C) гена *VCAM1* в выборках больных ИМ и здоровых лиц представлены на рисунке 3.

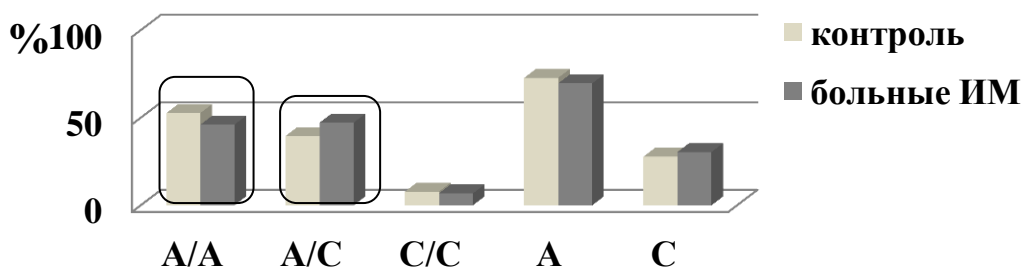


Рисунок 3 – Результаты анализа ассоциаций полиморфного локуса с.928+420A>C гена *VCAM1* с ИМ

Согласно, полученных данных, в группе больных, перенесших ИМ, по сравнению с соответствующей контрольной группой повышена частота генотипа *VCAM1**A/*C (47,11 и 39,57% соответственно, $P=0,006$, $OR=1,36$, CI_{OR} : 1,09-1,7) и понижена частота генотипа *VCAM1**A/*A (46,01 и 52,65% соответственно, $P=0,018$, $OR=0,77$, CI_{OR} : 0,62-0,96). Нами выявлена ассоциация полиморфного локуса -2549(18)I/D (rs34357231) гена *VEGFA* с ИМ (рисунок 4).

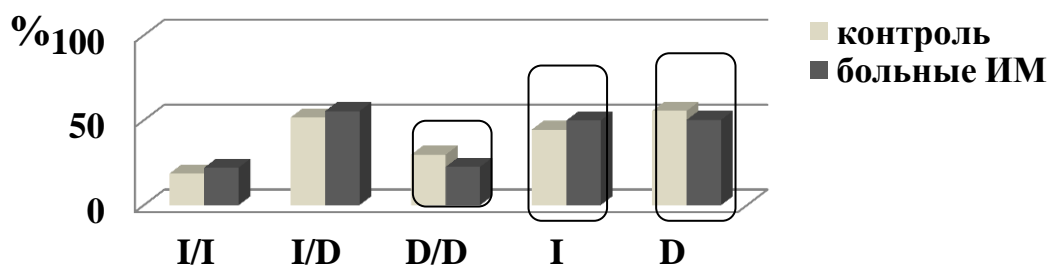


Рисунок 4 – Результаты анализа ассоциаций полиморфного локуса -2549(18)I/D гена *VEGFA* с ИМ

У больных ИМ, по сравнению с контрольной группой статистически достоверно понижены частоты генотипа *VEGFA**D/*D (22,55% и 29,74% соответственно, $P=0,002$, $OR=0,69$, CI_{OR} 0,55-0,87) и аллеля *VEGFA**D (50,21% и 55,52% соответственно, $P=0,004$, $OR=0,81$, CI_{OR} 0,7-0,94), кроме того, в группе больных ИМ в отличие от контрольной группы наблюдается статистически значимое повышение частоты аллеля *VEGFA**I (49,79% и 44,48% соответственно, $P=0,004$, $OR=1,24$, CI_{OR} 1,07-1,43).

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса $-2518A>G$ (rs1024611) гена *CCL2* в группах больных ИМ и соответствующей контрольной группе представлен на рисунке 5.

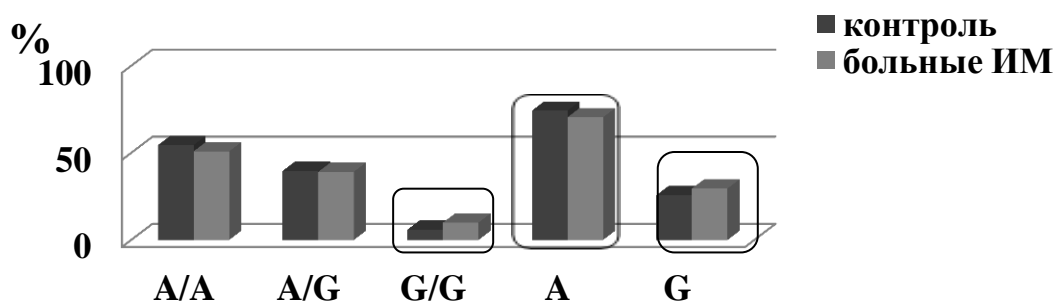


Рисунок 5 – Результаты анализа ассоциаций полиморфного локуса $-2518A>G$ гена *CCL2* с ИМ

У больных ИМ, по сравнению с контрольной группой статистически значимо повышена частота генотипа *CCL2**G/*G (9,97% и 5,9% соответственно, $P=0,008$, $OR=1,77$, CI_{OR} 1,17-2,69), а также повышена частота аллеля *CCL2**G (29,56% и 25,74% соответственно, $P=0,032$, $OR=1,21$, CI_{OR} 1,02-1,44) и понижена частота аллеля *CCL2**A (70,44% и 74,26% соответственно, $P=0,032$, $OR=0,83$, CI_{OR} 0,70-0,99). Результаты анализа ассоциаций полиморфного локуса $c.303+30998A>G$ гена *DDAH1* с ИМ представлены на рисунке 6.

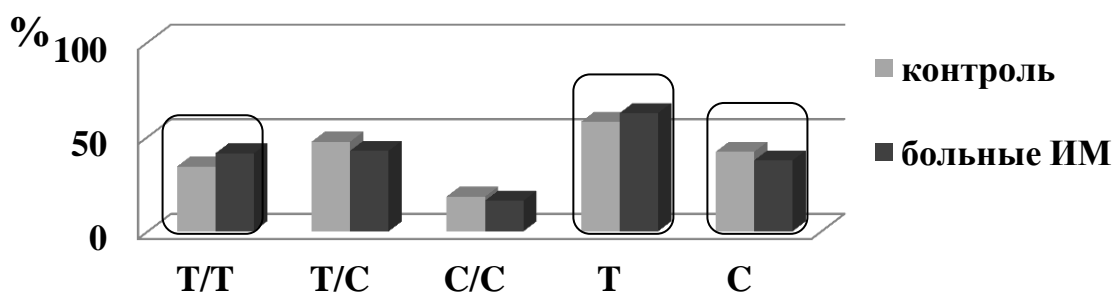


Рисунок 6 – Результаты анализа ассоциаций полиморфного локуса $c.303+30998A>G$ гена *DDAH1* с ИМ

У больных ИМ, по сравнению с контрольной группой статистически значимо увеличена частота генотипа *DDAH1**T/*T (41,21% и 34,22% соответственно, $P=0,014$, $OR=1,35$, CI_{OR} 1,07-1,71) и аллеля *DDAH1**T (62,5 и 57,93 % соответственно, $P=0,025$, $OR=1,21$, CI_{OR} 1,03-1,43), однако, наблюдается

достоверное снижение частоты аллеля *DDAH1*С* (37,5 и 42,07 % соответственно, $P=0,025$, $OR=0,83$, $CI_{OR} 0,70-0,98$). Не выявлено ассоциаций полиморфных локусов генов *SELP* (S331N), *NOS3* (E298D) с ИМ.

Нами представлена концентрация основных биомаркеров иммунного воспаления при ИМ, из которых после проведения статистического анализа полученных данных стало возможным выделить наиболее значимые маркеры воспаления как факторы прогнозирования данного заболевания (таблица 2).

Таблица 2 – Суммарные показатели биомаркеров воспаления при ИМ

Биомаркеры	ИМ	Группа сравнения	ЕИ	АЧ	ВГН
СРБ	15,6 [10,2;20,3]	1,0 [0,5;5,0]	Мкг/мл	0,175	5,0
IL-1 β	28,77 [18,12;42,8]	10,77 [7,2;16,4]	Пкг/мл	0,05	7,6
IL-6	6,36 [4,12;9,08]	2,15 [0,6;2,8]	Пкг/мл	0,006	2,68
TNF- α	24,8 [24,5;56,21]	7,6 [5,8;8,43]	Пкг/мл	0,5	6,0
VEGF	443,7 [163;548,3]	83,37[0,00;273,18]	Пкг/мл	0,05	63,0
МСР-1	209,74[58,37;333,4]	143,7[110,9;237,23]	Пкг/мл	0,2	148,5
Лейкоциты	11,84 [7,0-12,16]	5,90 [5,0;6,24]	10 ⁹ /л	0,2	5,0
Лимфоциты	0,31 [0,24-0,43]	0,189 [0,3;0,48]	10 ⁹ /л	0,2	1,80

Примечание: ЕИ- единицы измерения, АЧ- аналитическая чувствительность, ВГН – верхняя граница нормы.

Данные нашего исследования указывают на то, что усиление цитокиновой реакции приводя к воспалению, может явиться одним из механизмов эндотелиальной дисфункции при ИМ. Причем, как показали результаты исследования, усиливается апоптотическая реакция, приводя к деструкции молекул ДНК, что может выступать в качестве индуктора неблагоприятного течения заболевания.

Проведенный множественный корреляционный анализ позволил установить у больных ИМ корреляционные связи маркеров эндотелиальной дисфункции с генетическими показателями (таблица 3). Также проведенный корреляционный анализ позволил установить прямые и обратные корреляционные связи эндотелиально-гемостазиологических параметров друг с

другом и с показателями сосудистых нарушений, включая маркеры воспаления, ремоделирования, генетические характеристики.

Таблица 3 – Корреляционный анализ маркеров эндотелиальной дисфункции у больных инфарктом миокарда

Показатель		ИЛ-1 β	ИЛ-6	VEGF	МСР-1	ТИМ ОСА
Ген <i>VCAM1</i>	Генотип А/С	0,65204	0,56381	0,92338	0,74716	0,75622
	Генотип С/С	0,21840	0,23475	0,25347	0,23814	0,12831
	Генотип А/А	0,62728	0,72821	0,79452	0,81538	0,79265
Ген <i>VEGFA</i>	Генотип D/D	0,18462	0,15826	0,19381	0,15625	0,08166
	Генотип I/D	0,83624	0,83624	0,92446	0,78256	0,91488
	Генотип I/I	0,23614	0,19682	0,22615	0,21834	0,14285
Ген <i>CCL2</i>	Генотип А/А	0,68261	0,548251	0,64683	0,72482	0,78352
	Генотип А/Г	0,48452	0,58281	0,62338	0,61486	0,52945
	Генотип G / G	0,17433	0,22851	0,05625	0,00831	0,14722
Ген <i>NOS3</i>	Генотип E/E	0,05728	0,08422	0,12182	0,13257	0,12621
	Генотип D/D	0,09235	0,13482	0,23185	0,08622	0,11635
	Генотип E/D	0,09428	0,11465	0,10431	0,10448	0,13638
Ген <i>DDAH1</i>	Генотип T/T	0,69261	0,58344	0,47566	0,56284	0,62488
	Генотип С/С	0,14882	0,22462	0,11649	0,15371	0,23152
	Генотип T/C	0,25384	0,19366	0,12485	0,21482	0,22741

В качестве наиболее значимого показателя у больных ИМ выбран индекс ТИМ ОСА как наиболее информативный, интегральный показатель, наиболее достоверно отражающий степень выраженности структурно-функциональных изменений в сосудах. В качестве независимых величин были использованы эндотелиальные маркеры, показатели воспаления, полиморфизм генов эндотелиальной функции. В группе больных ИМ (рисунок 7) наиболее тесные взаимосвязи были определены между показателями ремоделирования сосудов (ТИМ ОСА) и показателями АД, маркерами некроза миокарда, трансформирующим фактором роста (VEGF), МСР-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, частотой полиморфизма генотипов гена *VCAM1* *А/*А и *А/*С, *VEGFA* *I/*D, *CCL2* *А/*А и *DDAH1* *Т/*Т ($p < 0,05$). Таким образом, исследование позволило определить тесные взаимосвязи показателей ремоделирования сосудов с комплексом параметров воспаления и эндотелиальной дисфункции,

полиморфизмом генов функции эндотелия, достоверно характеризующими системность механизмов ремоделирования.

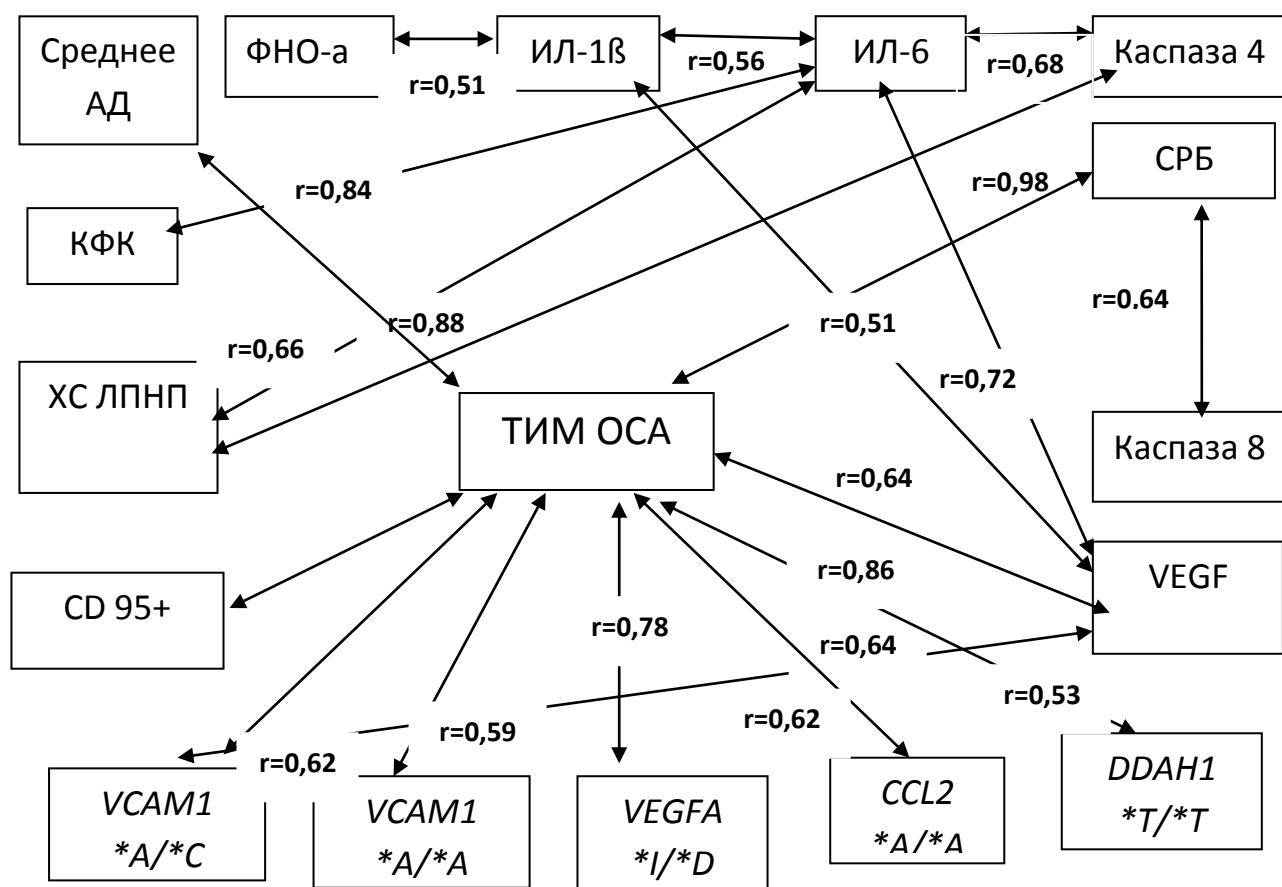


Рисунок 7 – Корреляционные взаимосвязи (r) у больных инфарктом миокарда (различия достоверны ($p < 0,05$))

Анализ результатов исследования позволил сформулировать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена положительная корреляционная связь толщины комплекса интима-медиа с такими показателями как толщина задней стенки ЛЖ ($r=0,56; p=0,038$), толщина межжелудочковой перегородки ($r=0,69; p=0,043$), величина левого предсердия ($r=0,88; p=0,041$), умеренная отрицательная корреляционная связь с показателями сократимости миокарда - фракцией выброса ($r=-0,52; p=0,033$).

2. У больных QИМ выявлено статистически значимое повышение концентрации ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-1β, а также уровня VEGF и MCP-1, как

проявление системного иммунного воспаления отражающих активность воспалительного процесса, как факторов развития эндотелиальной дисфункции.

3. У больных QИМ определяется значимое увеличение содержания компонентов апоптоза по показателям CD95+(Fas) и высокой активности каспаз (K4 и K8) как проявление нарушений морфогенеза, клеточного гомеостаза системного воспаления, что является одним из механизмов эндотелиальной дисфункции при ИМ.

4. Проведенный анализ распределения частот генотипов полиморфных маркеров генов-кандидатов предикторов эндотелиальной дисфункции выявил, что высокий риск развития инфаркта миокарда с возникновением эндотелиальной дисфункции у носителей генотипов *VCAM1**A/*C (OR=1,36), *CCL2**G/*G (OR=1,77), *DDAH1**T/*T (OR=1,35), а у носителей генотипов *VCAM1**A/*A (OR=0,77), *VEGFA**D/*D (OR=0,69) риск развития инфаркта миокарда понижен. У больных QИМ в сочетании с АГ, носителей генотипов *CCL2**G/*G (OR=2,07) и *VEGFA**I/*D (OR=1,42), выявлен высокий риск развития ИМ, что подтверждает вклад АГ в развитие эндотелиальной дисфункции.

5. Проведенный корреляционный анализ установил наличие статистически значимых связей между показателями маркерами апоптоза CD95+(Fas) ($r=0,58$; $p=0,028$), VEGF ($r=0,86$; $p=0,04$), частотой генотипов *VCAM1**A/*A ($r=0,62$), *VCAM1**A/*C ($r=0,59$), *VEGFA**I/*D ($r=0,78$), *CCL2**A/*A ($r=0,62$) и *DDAH1**T/*T ($r=0,53$) в зависимости от степени эндотелиальной дисфункции ТИМ ОСА ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение провоспалительных цитокинов (IL-6), компонентов апоптоза, моноцитарно-макрофагальных факторов (VEGF) может быть использовано в качестве дополнительных маркеров развития эндотелиальной дисфункции и оценки системного воспаления.

2. Для прогнозирования высокого риска развития инфаркта миокарда может быть использовано определение генных полиморфизмов (*VCAM1*

(rs3917010), *CCL2* (rs1024611), *DDAH1* (rs669173) с целью выделения особой группы больных для проведения интенсивных мероприятий по первичной профилактике сердечно-сосудистых осложнений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ремоделирование сердца и функциональное состояние периферических артерий при инфаркте миокарда / Э.Р. Смакаева, Л.Н. Хусаинова, **Р.И. Садикова** [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2009. – №7 (Прил.). – С. 59-62. – (Соавт.: Л.Н. Мингазетдинова, Г.М. Сахаутдинова).

2. Апоптотическая реактивность лимфоцитов в патогенезе острого инфаркта миокарда / Л.Н. Хусаинова, **Р.И. Садикова**, Л.Н. Хасанова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2012. – Спец. вып. – С.119. – (Содерж. журн.: Московский международный форум кардиологов. Москва, 2012). – (Соавт.: Э.Г. Муталова, Л.Н. Мингазетдинова).

3. Клеточные маркеры апоптоза при острой ишемии миокарда / Л.Н. Хусаинова, Э.Р. Смакаева, **Р.И. Садикова** [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2013. – №3. – С. 78-81. – (Соавт.: Э.Г. Муталова, Л.Н. Мингазетдинова).

4. Цитокиновая реакция при острой ишемии миокарда / Л.Н. Хусаинова, Э.Р. Смакаева, З.М. Исламгалева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2013. – Спец. вып. – С.178. – (Содерж. журн.: Московский международный форум кардиологов. Москва, 2013). – (Соавт.: **Р.И. Садикова**, Л.Н. Мингазетдинова, Э.Г. Муталова).

5. Ассоциации полиморфных маркеров генов факторов воспаления с инфарктом миокарда / Т.Р. Насибуллин, **Р.И. Садикова**, Я.Р. Тимашева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Генетика*. – 2014. – Т. 50, № 2. – С. 236-242. – (Соавт.: И.А. Туктарова, В.В. Эрдман, Л.Н. Хусаинова, И.Е. Николаева, О.Е. Мустафина).

6. **Садикова, Р.И.** Анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов факторов воспаления и системы оксида азота с инфарктом миокарда / Р.И. Садикова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Материалы XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014»*. – Москва, 2014. – С. 15.

7. **Садикова, Р.И.** Цитокиновый дисбаланс при остром инфаркте миокарда / Р.И. Садикова, Г.М. Сахаутдинова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Дневник Казанской медицинской школы*. – 2014. – №11. – С.130.

8. Полиморфизм генов гемостаза и особенности эндотелиальной дисфункции при инфаркте миокарда / Л.Н. Хусаинова, Э.Г. Муталова, **Р.И. Садикова**, Л.Н. Мингазетдинова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Евразийский кардиологический журнал*. – 2016. – №3. – С.134.

9. **Садикова, Р.И.** Состояние сосудистой стенки и уровень цитокинов как маркеры сердечно-сосудистых осложнений у больных острым инфарктом миокарда / Р.И. Садикова, Г.М. Сахаутдинова, А.Л. Федотов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т. 1, № 4. С. – 63-69.

10. Genotype/allelic combinations as potential predictors of myocardial infarction / T.R. Nasibullin, Y.R. Timasheva, **R.I. Sadikova** [et al.]. – Text : visual // Molecular biology reports. – 2016. – Vol. 43, № 1. – P. 11-16. – (Co-auth.: I.A. Tuktarova, V.V. Erdman, I.E. Nikolaeva, J. Sabo, P. Kruzliak, O.E. Mustafina).

11. **Садикова, Р.И.** Влияние цитокиновой сети и молекул межклеточной адгезии на развитие эндотелиальной дисфункции больных острым инфарктом миокарда / Р.И. Садикова, Э.Г. Муталова. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Практическая медицина.** –2018. –Т.6, №9. – С. 92-96.

12. Сочетания аллелей генов иммунного ответа и риск развития инфаркта миокарда // **Р.И. Садикова**, Т.Р. Насибуллин, Я.Р. Тимашева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Генетика.** – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 469-479. – (Содерж. журн.: И.А. Туктарова, В.В. Эрдман, М.Ю. Шейн, И.Е. Николаева, О.Е. Мустафина).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания	CI95% – confidence interval - 95% доверительный интервал
ИМ – инфаркт миокарда	OR – odds ratio - соотношение шансов
САД – систолическое артериальное давление	SNP – single-nucleotide polymorphism - однонуклеотидный полиморфизм
ДАД – диастолическое артериальное давление	<i>NOS3</i> – ген синтазы оксида азота 3(nitric oxide synthase 3)
ИБС– ишемическая болезнь сердца	<i>DDAH1</i> – ген диметиларгинина диметиламиногидролазы 1 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1)
ЛЖ – левый желудочек	<i>SELP</i> – ген селектина P (selectin P)
ЛП – левое предсердие	IL-1,6 – интерлейкин -1,6
ТИМ – толщина интима медиа	TNF- α – фактор некроза опухолей альфа (tumor necrosis factor alpha)
ОСА – общая сонная артерия	<i>VCAM1</i> – ген сосудистой молекулы (vascular cell adhesion molecule 1)адгезии 1
ОБА – общая бедренная артерия	<i>VEGFA</i> – ген сосудистого эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor)
СРБ – С-реактивный белок	<i>CCL2</i> – ген хемокина CCL2 (chemokine C-C motif ligand 2) или моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1– monocyte chemoattractant protein 1)
ПЦР – полимеразная цепная реакция	