АССОЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ С ПРИЗНАКАМИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ

Балацкий А. В.¹, Самоходская Л. М.¹, Бойцов С. А.², Ткачук В. А.^{1,2}

Цель. Провести анализ возможных ассоциаций полиморфизма генов урокиназной системы и матриксных металлопротеиназ с критериями нестабильности атеросклеротических поражений сонных артерий.

Материал и методы. Обследовано 50 пациентов с каротидным атеросклерозом (32 мужчины и 18 женщин). Критериями включения являлись стеноз сонной артерии 70% и более и перенесенная в связи с этим каротидная эндартерэктомия. Пациенты были подразделены на группы в зависимости от макроскопических признаков нестабильности атеросклеротических поражений и в зависимости от толщины фиброзной капсулы. Группы сравнивались по частотам однонуклеотидных полиморфизмов C(-1306)T (rs243865) гена *MMP2*, C(-1562)T (rs3918242) и A855G (Gln279Arg, rs17576) гена *MMP9*, Pro141Leu (C7240T, rs2227564) и C/T 3'-UTR (rs4065) гена *PLAU*, Lys220Arg (A659G, rs2302524) и T(-516)C (rs344781) гена *PLAUR*, (-675)4G/5G (rs1799768) гена *SERPINE1*.

Результаты. Однофакторный анализ показал ассоциацию вариантов 279Gln/Gln гена *MMP9* и 141Leu/Leu гена *PLAU* с развитием макроскопически стабильных бляшек. По данным многофакторного анализа только носительство генотипа 141Leu/Leu гена *PLAU* ассоциировано с развитием стабильных бляшек. Для группы носителей генотипов 141Pro/Leu и 141Leu/Leu отношение шансов составляет 0,22 (95% доверительный интервал 0,05-0,93). С развитием бляшек, имеющих толщину капсулы менее 65 мкм, по данным однофакторного анализа ассоциированы варианты 3'-UTR C/T гена *PLAU* и (-516)T/C гена *PLAUR*, а также нормальная масса тела. Наличие ожирения и носительство аллели (-516) C гена *PLAUR* являются протективными для развития бляшек с тонкой капсулой. У пациентов с отсутствием ожирения и генотипом (-516)T/T гена *PLAUR* отношение шансов выявления атеросклеротической бляшки с тонкой капсулой составляет 10,16 (95% доверительный интервал 2,57-40,16).

Заключение. В работе показана ассоциация полиморфизма генов урокиназной системы (урокиназного активатора плазминогена и его рецептора) с критериями нестабильности атеросклеротических поражений. Также продемонстрирована ассоциация ожирения с развитием более стабильных бляшек.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(8):32–38

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-32-38>

Ключевые слова: атеросклероз, нестабильная бляшка, урокиназный активатор плазминогена, матриксные металлопротеиназы, генетический полиморфизм.

Конфликт интересов: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) с использованием биоматериала человека, собранного и сохраняемого в рамках научной программы Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем (соглашение РНФ № 14-50-00029), и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М. В. Ломоносова.

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва; ²ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва, Россия.

Балацкий А. В.* — к.м.н., с.н.с. отдела лабораторной диагностики медицинского научно-образовательного центра, факультет фундаментальной медицины, ORCID: 0000-0002-6694-2231, Самоходская Л. М. — к.м.н., доцент, зав. отделом лабораторной диагностики медицинского научно-образовательного центра, ORCID: 0000-0001-6734-3989, Бойцов С. А. — д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0001-6998-8406, Ткачук В. А. — д.б.н., профессор, акад. РАН, декан факультета фундаментальной медицины, ORCID: 0000-0002-7492-747X.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
balatsky@fbm.msu.ru

АГ — артериальная гипертензия, ГХС — гиперхолестеринемия, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ДИ — доверительный интервал, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, КЭАЭ — каротидная эндартерэктомия ММП — матриксная металлопротеиназа, НУО — нарушения углеводного обмена, ОШ — отношение шансов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, *MMP2* — ген матриксной металлопротеиназы 2, *MMP9* — ген матриксной металлопротеиназы 9, *PLAU* — ген урокиназного активатора плазминогена, *PLAUR* — ген рецептора урокиназного активатора плазминогена, *SERPINE1* — ген ингибитора активатора плазминогена 1 типа, uPA — урокиназный активатор плазминогена, uPAR — рецептор урокиназного активатора плазминогена.

Рукопись получена 02.07.2018

Рецензия получена 05.07.2018

Принята к публикации 12.07.2018

ASSOCIATION OF MOLECULAR GENETIC FACTORS WITH THE SIGNS OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES INSTABILITY

Balatsky A. V.¹, Samokhodskaya L. M.¹, Boytsov S. A.², Tkachuk V. A.^{1,2}

Aim. Analysis of possible associations of polymorphisms of the urokinase system and matrix metalloproteases genes with criteria of atherosclerotic plaques instability.

Material and methods. Totally, 50 patients were investigated, with carotid atherosclerosis (32 males and 18 females). Inclusion criteria were carotid stenosis ≥70% and carotid endarterectomy. Patients were selected to groups according to macroscopic signs of instability of the lesions and thickness of fibrous cap. The groups were compared by the rates of mononucleotide polymorphisms C(-1306)T (rs243865) gene *MMP2*, C(-1562)T (rs3918242) and A855G (Gln279Arg, rs17576) gene *MMP9*, Pro141Leu (C7240T, rs2227564) and C/T 3'-UTR (rs4065) gene *PLAU*, Lys220Arg (A659G, rs2302524) and T(-516)C (rs344781) gene *PLAUR*, (-675)4G/5G (rs1799768) gene *SERPINE1*.

Results. Monofactorial analysis showed the association of the variants 279Gln/Gln of gene *MMP9* and 141Leu/Leu gene *PLAU* with development of macroscopically stable plaques. By multifactorial analysis, only the carriage of genotype 141Leu/Leu

gene *PLAU* was associated with development of stable plaques. For the group of genotype carriers 141Pro/Leu and 141Leu/Leu odds ratio is 0,22 (95% confidence interval 0,05-0,93). With the development of plaques with capsule less than 65 mcm, by monofactorial analysis, the associated variants are 3'-UTR C/T gene *PLAU* and (-516)T/C gene *PLAUR*, and normal body mass. Presence of obesity and the carriage of allele (-516) C gene *PLAUR* are protective against the thin cap plaques development. In patients with absent obesity and genotype (-516)T/T gene *PLAUR* odds ratio for the thin cap plaque occurrence is 10,16 (95% confidence interval 2,57-40,16).

Conclusion. In the work, an association is shown of the polymorphism of urokinase system gene (urokinase plasminogen activator and receptor) with criteria of atherosclerotic lesion instability. Also, an association demonstrated of obesity with more stable plaques.

Russ J Cardiol. 2018;23(8):32–38

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-32-38>

Key words: atherosclerosis, unstable plaque, urokinase plasminogen activator, matrix metalloproteases, genetic polymorphism.

Conflicts of Interest: supported by the grant from Russian Scientific Foundation (project № 14-24-00086) with human specimens collected and deposited in the framework of the program "Scientific foundations for national depository of life systems" (agreement of RSF № 14-50-00029), and equipment acquired by the Development program of Lomonosov MSU.

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow; ²National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia.

Balatsky A. V. ORCID: 0000-0002-6694-2231, Samokhodskaya L. M. ORCID: 0000-0001-6734-3989, Boytsov S. A. ORCID: 0000-0001-6998-8406, Tkachuk V. A. ORCID: 0000-0002-7492-747X.

Бессимптомные нестабильные атеросклеротические поражения — частое и опасное явление. Нестабильная атеросклеротическая бляшка (АСБ) — это бляшка с высоким риском тромбоза в ближайшем периоде времени [1]. Её отличают следующие признаки:

1) истончённая соединительнотканная капсула — как правило, пороговым значением считают толщину 65 мкм [2];

2) большое некротическое атероматозное ядро;

3) позитивное ремоделирование сосуда [1];

4) неоваскуляризация бляшки [3].

На стабильность АСБ влияет, в частности, повышенная активность внеклеточных матриксных металлопротеиназ (ММП) [4], разрушающих фиброзную капсулу. Однако не менее важной представляется роль системы урокиназного активатора плазминогена (uPA). Протеолитический домен uPA расщепляет неактивный плазминоген, переводя его в плазмин. Плазмин, в свою очередь, не только расщепляет фибрин, но и активирует ряд латентных ММП [5]. Кроме того, на поверхности клеток существует специфический рецептор uPA (uPAR). Связывание uPA с uPAR активирует uPA и обеспечивает образование плазмина в строго определенных участках клеточной поверхности (рис. 1). Существует также ингибитор uPA (PAI-1, кодируется геном *SERPINE1*).

В данной работе был проведен анализ возможных ассоциаций полиморфизма генов урокиназной системы и ММП (табл. 1) с критериями нестабильности АСБ сонных артерий.

Материал и методы

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическими комитетами всех участвующих клинических центров. До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

В данное одномоментное исследование было включено 50 пациентов с атеросклерозом сонных артерий (32 мужчины и 18 женщин). Критериями включения являлись стенозирование сонной артерии более 70%, ставшее показанием к проведению каротидной эндартерэктомии (КЭАЭ).

Разделение пациентов на группы производилось двумя способами в зависимости от макроскопических характеристик бляшки и толщины фиброзной капсулы.

Подгруппы в зависимости от макроскопических параметров:

1. Пациенты с атероматозными АСБ, соответствующими АСБ типа Va по классификации Американской ассоциации сердца (n=29).

2. Пациенты с фиброзными АСБ, соответствующими АСБ типа Vc по классификации Американской ассоциации сердца АСБ (n=21).

Подгруппы в зависимости от микроскопических параметров:

1. Пациенты с АСБ, имеющими толщину фиброзной капсулы <65 мкм (n=29).

2. Пациенты с АСБ, имеющими толщину фиброзной капсулы ≥65 мкм АСБ (n=21).

По историям болезни всех пациентов изучались жалобы и анамнез. Принималось во внимание наличие артериальной гипертензии (АГ) и курение. Также учитывались данные физикального, лабораторного и инструментального обследований.

АГ диагностировалась при наличии в анамнезе повышений уровня систолического артериального давления >140 мм рт.ст. или диастолического артериального давления >90 мм рт.ст. длительностью не менее 1 года. Ожирение определяли при индексе массы тела (ИМТ) ≥30 кг/м². Гиперхолестеринемией (ГХС) считалось повышение общего холестерина ≥5,3 ммоль/л. Нарушениями углеводного обмена (НУО) считали нарушение толерантности к глюкозе или сахарный диабет 2 типа.

После операций КЭАЭ полученные фрагменты сонных артерий вскрывались, после чего обнаружен-

Таблица 1
Исследуемые полиморфные маркеры

Группа генов	Ген	Полиморфизм
Гены матриксных металлопротеиназ	<i>MMP2</i>	C(-1306)T (rs243865)
	<i>MMP9</i>	C(-1562)T (rs3918242)
		A855G (Gln279Arg, rs17576)
Гены урокиназной системы	<i>PLAU</i>	Pro141Leu (C7240T, rs2227564)
		3'-UTR C/T (rs4065)
	<i>PLAUR</i>	Lys220Arg (A659G, rs2302524)
		T(-516)C (rs344781)
	<i>SERPINE1</i>	(-675)4G/5G (rs1799768)

Рис. 1. Система uPA и деградация внеклеточного матрикса.

Сокращения: sc-uPA — одноцепочечная uPA, tc-uPA — двуцепочечная uPA, Plg — плазминоген, PlgR — рецептор плазминогена.

ные АСБ оценивались разделялись согласно классификации Американской ассоциации сердца [6]. Фрагменты, содержащие АСБ, замораживались в среде TissueTek, после чего изготавливались срезы толщиной 10 мкм. Толщина фиброзной капсулы оценивалась при микроскопии после окраски масляным красным "О".

ДНК выделялась из венозной крови при помощи набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Для определения вариантов C(-1306)T (rs243865) гена *MMP2*, C(-1562)T (rs3918242) и A855G (Gln279Arg, rs17576) гена *MMP9*, Pro141Leu (C7240T, rs2227564) гена *PLAU* и Lys220Arg (A659G, rs2302524) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались готовые наборы производства "ДНК-технология" (Россия). Определение вариантов C/T 3'-UTR (rs4065) гена *PLAU* и T(-516)C (rs344781) гена *PLAUR* проводилось посредством ПЦР с детекцией в реальном времени, применялись гидролизующие зонды TaqMan. Для определения полиморфизма (-675)4G/5G (rs1799768) гена *SERPINE1* применялась аллель-специфичная ПЦР с раздельной амплификацией каждой аллели.

Статистическая обработка осуществлялась при помощи пакета программ Statistica 8.0. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Соответствие распределения нормальному проверялось при помощи критерия Шапиро-Уилка. В настоящей работе нормально распределённые данные не встречались. Данные представлены как медиана (интерквартильный размах).

Для сравнения выборок по количественным признакам использовался критерий Манна-Уитни. Гипотезы об ассоциации между качественными признаками в таблицах сопряженности 2x2 и 2x3 проверялись при помощи критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, а также с использованием двустороннего точного теста Фишера при невозможности использования критерия χ^2 .

Обработка данных также проводилась при помощи веб-программы SNP Stats. С помощью данной программы проведён анализ ассоциаций генотипов с необходимыми показателями на основе линейной или логистической регрессии [7]. Информационный критерий Акаике (ИКА) использовали для определения модели наследования, наиболее соответствующей полученным результатам (кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная или лог-аддитивная). Предпочтение отдавалось моделям с наименьшими значениями ИКА, указывающими на хорошее соответствие данным при использовании меньшего числа параметров.

Для многофакторного анализа применялась модель многофакторной логистической регрессии.

Результаты

Как было указано выше, разделение пациентов на группы производилось в зависимости от макроскопических характеристик бляшки и толщины фиброзной капсулы. В таблицах 2 и 3 приведена клиническая характеристика обследованных групп.

Таблица 2

Характеристика пациентов, перенесших КЭАЭ, по группам в зависимости от макроскопических параметров АСБ

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

Сокращения: АГ — артериальная гипертензия, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ГХС — гиперхолестеринемия, ИМТ — индекс массы тела, НУО — нарушения углеводного обмена.

Таблица 3

Характеристика пациентов, перенесших КЭАЭ, по группам в зависимости от толщины капсулы АСБ

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

Сокращения: АГ — артериальная гипертензия, АСБ — атеросклеротическая бляшка, ГХС — гиперхолестеринемия, ИМТ — индекс массы тела, НУО — нарушения углеводного обмена.

При разделении пациентов в зависимости от макроскопических параметров АСБ возраст лиц с фиброзными бляшками был больше. Очевидно, это связано с тем, что плотные фиброзные АСБ развиваются медленнее и такие пациенты переносят оперативное вмешательство на каротидных артериях позже. Тем не менее, возраст не был ассоциирован с толщиной капсулы АСБ, при этом толщина капсулы была ассоциирована с ожирением. Нестабильные бляшки с толщиной капсулы <65 мкм обнаруживались у 20,0% пациентов с ожирением и у 56,7% — при отсутствии ожирения: отношение шансов (ОШ) = 0,19 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,05-0,73). При наличии ожирения медиана значения толщины фиброзной капсулы составила 166,2 (76,3; 390,7) мкм, тогда как у пациентов с нормальной массой тела медиана составила 60,5 (40,0; 241,9) мкм. Разница медиан значений толщины фиброзной капсулы АСБ была на уровне тенденции (p=0,06).

В таблицах 4 и 5 приведены результаты однофакторного анализа ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов с признаками нестабильности атеросклеротических поражений — макроскопической характеристикой (табл. 4) и толщиной капсулы бляшки (табл. 5). Для каждого однонуклеотидного полиморфизма приведены данные по кодоминантной модели наследования, а также по модели, имею-

щей наименьшее значение информационного критерия Акаике. Расчёты выполнены с учётом поправки на пол, возраст, уровень общего холестерина плазмы крови, курение, наличие ожирения, АГ и НУО.

Представленные результаты демонстрируют, что с развитием макроскопически стабильных АСБ ассоциировано носительство вариантов 279Gln/Gln гена *MMP9* и 141Leu/Leu гена *PLAU*. Многофакторный анализ (табл. 6) показывает, что только генотип 141Leu/Leu гена *PLAU* ассоциирован с развитием стабильных поражений. По всей видимости, имеет значение и гетерозиготное носительство аллели 141Leu, поскольку для лог-аддитивной модели $p=0,0032$, а для группы носителей генотипов 141Pro/Leu и 141Leu/Leu ОШ составляет 0,22 (95% ДИ 0,05-0,93).

Тонкая фиброзная капсула (менее 65 мкм), как демонстрирует однофакторный анализ, ассоциирована с генотипами 3'-UTR C/T *PLAU* и (-516)T/C *PLAUR*. Кроме того, в многофакторном анализе (табл. 7) учитывалось наличие ожирения. Полиморфизм гена *PLAU* оказался незначимым, в то время как ожирение и вариант гена *PLAUR* сохранили ассоциацию с наличием истончённой капсулы АСБ. Таким образом, наличие у пациента ожирения и аллели (-516) C гена *PLAUR* являются факторами, препятствующими развитию поражения с тонкой капсулой.

Таблица 4

Ассоциация полиморфных генетических маркеров с макроскопическими параметрами АСБ

Модель	Генотип	Макроскопич, стабильная АСБ, % (n) (n=21)	Макроскопич, нестабильная АСБ, % (n) (n=29)	ОШ (95% ДИ)	p	ИКА
C(-1306)T (rs243865) MMP2						
КД	C/C	15 (71,4%)	14 (48,3%)	1,00	0,23	69,1
	C/T	6 (28,6%)	14 (48,3%)	3,28 (0,78-13,80)		
	T/T	0 (0%)	1 (3,5%)	NA (0,00-NA)		
Д	C/C	15 (71,4%)	14 (48,3%)	1,00	0,091	67,2
	C/T-T/T	6 (28,6%)	15 (51,7%)	3,32 (0,79-13,91)		
C(-1562)T (rs3918242) MMP9						
-	C/C	16 (76,2%)	22 (75,9%)	1,00	0,81	70
	C/T	5 (23,8%)	7 (24,1%)	1,20 (0,27-5,47)		
T(-516)C (rs344781) PLAUR						
КД	T/T	12 (57,1%)	16 (55,2%)	1,00	0,41	70,3
	T/C	6 (28,6%)	12 (41,4%)	1,75 (0,42-7,25)		
	C/C	3 (14,3%)	1 (3,5%)	0,28 (0,02-5,20)		
Р	T/T-T/C	18 (85,7%)	28 (96,5%)	1,00	0,28	68,9
	C/C	3 (14,3%)	1 (3,5%)	0,23 (0,01-4,01)		
C/T 3'-UTR (rs4065) PLAU						
КД	T/T	5 (23,8%)	11 (37,9%)	1,00	0,43	70,4
	C/T	9 (42,9%)	10 (34,5%)	0,41 (0,08-2,14)		
	C/C	7 (33,3%)	8 (27,6%)	1,09 (0,16-7,35)		
СД	T/T-C/C	12 (57,1%)	19 (65,5%)	1,00	0,2	68,4
	C/T	9 (42,9%)	10 (34,5%)	0,40 (0,09-1,68)		
Pro141Leu (C7240T, rs2227564) PLAU						
КД	Pro/Pro	8 (38,1%)	21 (72,4%)	1,00	0,003	60,4
	Pro/Leu	6 (28,6%)	7 (24,1%)	0,57 (0,11-3,00)		
	Leu/Leu	7 (33,3%)	1 (3,5%)	0,01 (0,00-0,37)		
Р	Pro/Pro-Pro/Leu	14 (66,7%)	28 (96,5%)	1,00	0,0008	58,9
	Leu/Leu	7 (33,3%)	1 (3,5%)	0,01 (0,00-0,42)		
(-675)4G/5G (rs1799768) SERPINE1						
КД	4G/4G	5 (23,8%)	12 (41,4%)	1,00	0,26	69,3
	4G/5G	12 (57,1%)	13 (44,8%)	0,33 (0,07-1,58)		
	5G/5G	4 (19,1%)	4 (13,8%)	1,19 (0,12-11,82)		
СД	4G/4G-5G/5G	9 (42,9%)	16 (55,2%)	1,00	0,1	67,4
	4G/5G	12 (57,1%)	13 (44,8%)	0,32 (0,08-1,32)		
A855G (Gln279Arg, rs17576) MMP9						
КД	Gln/Gln	12 (57,1%)	9 (31%)	1,00	0,047	66
	Gln/Arg	8 (38,1%)	16 (55,2%)	4,40 (0,87-22,14)		
	Arg/Arg	1 (4,8%)	4 (13,8%)	17,78 (0,93-339,64)		
Д	Gln/Gln	12 (57,1%)	9 (31%)	1,00	0,025	65
	Gln/Arg-Arg/Arg	9 (42,9%)	20 (69%)	5,45 (1,14-26,12)		
	Gln/Arg	8 (38,1%)	16 (55,2%)	2,30 (0,56-9,38)		
Л-А	---	---	---	4,30 (1,21-15,27)	0,014	64
Lys220Arg (A659G, rs2302524) PLAUR						
-	Lys/Lys	16 (76,2%)	21 (72,4%)	1,00	0,73	69,9
	Lys/Arg	7 (24,1%)	6 (28,6%)	1,81 (0,33-9,82)		

Примечание: обозначение моделей наследования: КД — кодоминантная, Д — доминантная, Р — рецессивная, СД — сверхдоминантная, Л-А — лог-аддитивная. NA — расчёт невозможен.

У пациентов с отсутствием ожирения и генотипом (-516)T/T *PLAUR* ОШ выявления бляшки с истончённой фиброзной капсулой составляет 10,16 (95% ДИ 2,57-40,16).

Обсуждение

В настоящей работе пациенты, перенесшие КЭАЭ, подразделялись на две группы. Фиброзные плотные бляшки (поражения типа Vc) считались макроскопи-

Таблица 5

Ассоциация полиморфных генетических маркеров с толщиной капсулы АСБ

Модель	Генотип	Капсула АСБ ≥65 мкм, % (n) (n=29)	Капсула АСБ <65 мкм, % (n) (n=21)	ОШ (95% ДИ)	p	ИКА
C(-1306)T (rs243865) <i>MMP2</i>						
КД	C/C	16 (55,2%)	13 (61,9%)	1,00	0,68	72,6
	C/T	12 (41,4%)	8 (38,1%)	0,57 (0,14-2,31)		
	T/T	1 (3,5%)	0 (0%)	0,00 (0,00-NA)		
Л-А	---	---	---	0,56 (0,14-2,20)	0,4	70,6
C(-1562)T (rs3918242) <i>MMP9</i>						
-	C/C	21 (72,4%)	17 (81%)	1,00	0,14	69,1
	C/T	8 (27,6%)	4 (19,1%)	0,28 (0,05-1,62)		
T(-516)C (rs344781) <i>PLAUR</i>						
КД	T/T	13 (44,8%)	15 (71,4%)	1,00	0,09	68,6
	T/C	14 (48,3%)	4 (19,1%)	0,21 (0,04-1,03)		
	C/C	2 (6,9%)	2 (9,5%)	1,70 (0,13-21,68)		
СД	T/T-C/C	15 (51,7%)	17 (81%)	1,00	0,031	66,7
	T/C	14 (48,3%)	4 (19,1%)	0,20 (0,04-0,95)		
C/T 3'-UTR (rs4065) <i>PLAU</i>						
КД	T/T	10 (34,5%)	6 (28,6%)	1,00	0,06	67,8
	C/T	8 (27,6%)	11 (52,4%)	3,66 (0,62-21,60)		
	C/C	11 (37,9%)	4 (19,1%)	0,41 (0,05-3,68)		
СД	T/T-C/C	21 (72,4%)	10 (47,6%)	1,00	0,026	66,4
	C/T	8 (27,6%)	11 (52,4%)	5,26 (1,10-25,15)		
Pro141Leu (C7240T, rs2227564) <i>PLAU</i>						
КД	Pro/Pro	16 (55,2%)	13 (61,9%)	1,00	0,8	72,9
	Pro/Leu	8 (27,6%)	5 (23,8%)	1,27 (0,25-6,38)		
	Leu/Leu	5 (17,2%)	3 (14,3%)	2,00 (0,25-16,09)		
Л-А	---	---	---	1,38 (0,52-3,71)	0,52	70,9
(-675)4G/5G (rs1799768) <i>SERPINE1</i>						
КД	4G/4G	9 (31%)	8 (38,1%)	1,00	0,5	72
	4G/5G	16 (55,2%)	9 (42,9%)	0,38 (0,08-1,95)		
	5G/5G	4 (13,8%)	4 (19,1%)	0,60 (0,06-6,32)		
Д	4G/4G	9 (31%)	8 (38,1%)	1,00	0,27	70,1
	4G/5G-5G/5G	20 (69%)	13 (61,9%)	0,42 (0,09-2,01)		
A855G (Gln279Arg, rs17576) <i>MMP9</i>						
КД	Gln/Gln	10 (34,5%)	11 (52,4%)	1,00	0,22	70,4
	Gln/Arg	16 (55,2%)	8 (38,1%)	0,25 (0,05-1,33)		
	Arg/Arg	3 (10,3%)	2 (9,5%)	0,34 (0,03-3,57)		
Д	Gln/Gln	10 (34,5%)	11 (52,4%)	1,00	0,087	68,4
	Gln/Arg-Arg/Arg	19 (65,5%)	10 (47,6%)	0,26 (0,05-1,32)		
Lys220Arg (A659G, rs2302524) <i>PLAUR</i>						
-	Lys/Lys	22 (75,9%)	15 (71,4%)	1,00	0,49	70,9
	Lys/Arg	7 (24,1%)	6 (28,6%)	1,81 (0,33-9,82)		

Примечание: обозначение моделей наследования: КД — кодоминантная, Д — доминантная, Р — рецессивная, СД — сверхдоминантная, Л-А — лог-аддитивная.

Таблица 6

**Многофакторный анализ ассоциации
полиморфных генетических маркеров
с макроскопическими параметрами АСБ**

Фактор	p для статистики Вальда	ОШ (95% ДИ)	p для модели логистической регрессии
<i>PLAU</i> 141Leu/Leu	0,041	0,09 (0,01-0,97)	0,01
<i>MMP9</i> 279Gln/Gln	0,414	0,58 (0,15-2,21)	

Таблица 7

**Многофакторный анализ ассоциации
различных факторов с толщиной капсулы АСБ**

Фактор	p для статистики Вальда	ОШ (95% ДИ)	p для модели логистической регрессии
<i>PLAU</i> 3'-UTR C/T	0,08	3,56 (0,83-15,25)	<0,001
<i>PLAUR</i> (-516)T/C	0,014	0,14 (0,03-0,70)	
Наличие ожирения	0,005	0,11 (0,02-0,54)	

чески стабильными, а фиброатеромы (поражения типа Va) — макроскопически нестабильными.

Многофакторный анализ выявил только один молекулярно-генетический фактор, ассоциированный с макроскопическими характеристиками бляшки — однонуклеотидный полиморфизм Pro141Leu (C7240T, rs2227564) гена *PLAU*. Генотип 141LL существенно реже (в 11,1 раз, ОШ=0,09) обнаруживается при наличии фиброатеромы.

Таким образом, впервые была показана ассоциация полиморфизма Pro141Leu гена *PLAU* с типом развивающихся АСБ. Данных о взаимосвязи данного полиморфизма с заболеваниями сердечно-сосудистой системы крайне мало. При изучении литературы была найдена только одна статья, авторы которой продемонстрировали отсутствие ассоциации данного маркера с развитием инфаркта миокарда [8]. Полученные в нашей работе данные, тем не менее, позволяют говорить о существенной роли урокиназы в процессах развития АСБ. Аминокислотная замена в uPA приводит к увеличению гидрофобности кринг-домена, что снижает сродство uPA к фибрину и, возможно, прочим белкам внеклеточного матрикса [9]. Возможно, изменение аффинности uPA к матриксу бляшки приводит к меньшей его деградации в результате протеолиза и формированию бляшек, имеющих большую плотность и содержащих большее количество соединительной ткани.

С толщиной капсулы бляшки были ассоциированы полиморфизмы 3'-UTR C/T *PLAU* и (-516)T/C *PLAUR*; многофакторный анализ показал значимость только последнего. Эти данные хорошо соотносятся с результатами, показывающими повышение уровня uPAR в разорвавшихся АСБ, а также ассоциацию увеличения количества uPAR с содержанием в АСБ липидов, макрофагов и других воспалительных элементов [10, 11]. Кроме того, было продемонстрировано, что мутантный промотор гена *PLAUR* в 6 раз увеличивает экспрессию репортера (люциферазы) в линейных клетках [12]. Таким образом, полимор-

физм промотора гена *PLAUR* может приводить к повышению уровня uPAR в АСБ, что, в свою очередь, усиливает миграцию макрофагов и протеолиз внутри бляшки, дестабилизируя её.

Из данных литературы следует, что наибольшим эффектом должен обладать генотип (-516)TT *PLAUR*. Несмотря на то, что при однофакторном анализе различия между группами по частотам генотипа (-516)TT не были статистически значимыми, при включении в анализ фактора ожирения генотип (-516)TT демонстрировал сильную ассоциацию с истончением капсулы (ОШ = 10,16 при отсутствии ожирения). Генотип (-516)CC встречался редко (4 пациента в обеих группах), что не дало возможности показать его протективную роль.

Результаты генетического анализа позволяют предположить, что для дестабилизации АСБ система uPA играет существенную роль.

Заключение

В работе показана ассоциация полиморфизма генов урокиназной системы (урокиназного активатора плазминогена и его рецептора) с критериями нестабильности атеросклеротических бляшек. Неожиданным результатом является обнаружение протективной роли ожирения, что требует дальнейших исследований.

Конфликт интересов. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) с использованием биоматериала человека, собранного и сохраняемого в рамках научной программы Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем (соглашение РНФ № 14-50-00029), и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М. В. Ломоносова.

Благодарности. Авторы выражают благодарности Дарье Павловне Ивановой и Данияру Таалайбековичу Дыйканову.

Литература

1. Schaar JA, Muller JE, Falk E, et al. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *European heart journal*. 2004 Jun;25(12):1077-82. doi:10.1016/j.ehj.2004.01.002.
2. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000 May;20(5):1262-75. doi:10.1161/01.ATV.20.5.1262.
3. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Current opinion in cardiology*. 2001 Sep;16(5):285-92.
4. Yla-Herttuala S, Bentzon JF, Daemen M, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques: an update. *European heart journal*. 2013 Nov;34(42):3251-8. doi:10.1093/eurheartj/ehh301.
5. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):324-33. doi:10.1055/s-0037-1616230.
6. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74. doi:10.1161/01.CIR.92.5.1355.
7. Sole X, Guino E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928-9. doi:10.1093/bioinformatics/btl268.
8. Xu J, Li W, Bao X, et al. Association of putative functional variants in the *PLAU* gene and the *PLAUR* gene with myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010 Oct;119(8):353-9. doi:10.1042/CS20100151.
9. Yoshimoto M, Ushiyama Y, Sakai M, et al. Characterization of single chain urokinase-type plasminogen activator with a novel amino-acid substitution in the kringle structure. *Biochimica et biophysica acta*. 1996 Mar 7;1293(1):83-9. doi:10.1016/0167-4838(95)00228-6.
10. Edsfeldt A, Nitulescu M, Grufman H, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with inflammation in the vulnerable human atherosclerotic plaque. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012 Dec;43(12):3305-12. doi:10.1161/STROKEAHA.112.664094.
11. Svensson PA, Olson FJ, Hagg DA, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor is associated with macrophages and plaque rupture in symptomatic carotid atherosclerosis. *Int J Mol Med*. 2008 Oct;22(4):459-64. doi:10.3892/ijmm.00000043.
12. Campbell DB, Li C, Sutcliffe JS, et al. Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*. 2008 Jun;1(3):159-68. doi:10.1002/aur.27.