

УДК 575:616.126.3-089:616-005.1-084-085.273.53

І.В. Малярчук, Н.Г. Горovenko, А.Р. Бабочкіна, Н.С. Осипенко

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ

НМАПО ім. П.Л. Шупика, Київ

ДУ «Національний інститут серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова НАМН», Київ

Дослідження впливу поліморфного варіанта С148Т гена β -ланцюга фібриногену на режим дозування варфарину

АНОТАЦІЯ

Мета дослідження – проаналізувати залежність величини підбраної дози варфарину та ступеня гіпокоагуляції від генотипу гена *FGB*.

Матеріали і методи. В дослідження було включено 155 пацієнтів (чоловіків – 67,74%, жінок – 32,26%; середній вік – $51,7 \pm 1,1$ року), які перенесли операцію з протезування клапанів серця та отримували варфарин у стартовій дозі 5 мг/добу. Пацієнти, у яких на етапі підбору дози варфарину спостерігали підвищення значень рівня міжнародного нормалізованого відношення (МНВ) $>3,5$, увійшли до підгрупи А (n=35), пацієнтів, у яких значення рівня МНВ не виходили за межі цільових значень, включено до підгрупи В (n=120).

Результати. Визначено частоту генотипів 148СС, 148СТ і 148ТТ за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB*, що становила 45,2; 45,8 і 9% відповідно. За даними порівняльного аналізу частоти генотипів за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB* між пацієнтами підгруп А та В достовірної різниці не виявлено. У пацієнтів з генотипом 148СС середньодобова доза варфарину склала $3,43 \pm 0,2$ мг, у пацієнтів з генотипом 148СТ – $3,4 \pm 0,18$ мг, а у пацієнтів з генотипом 148ТТ – $3,23 \pm 0,21$ мг. Асоціації поліморфного варіанта С148Т гена *FGB* з величиною дози варфарину не виявлено.

Висновки. У пацієнтів з протезованими клапанами серця не виявлено впливу поліморфного варіанта С148Т гена *FGB* на ступінь гіпокоагуляції та підбір дози варфарину.

Ключові слова:

варфарин, генотип, доза, поліморфізм.

У пацієнтів з протезованими клапанами серця існує дуже високий ризик виникнення тромбоемболічних ускладнень (ТЕУ), тому необхідність проведення у них життєвої антикоагулянтної терапії є загально визнаною. Згідно з європейськими протоколами рекомендованим препаратом для профілактики ТЕУ є варфарин [6]. Препарат блокує активацію вітамін К-залежних факторів згортання, що сприяє сповільненню процесів коагуляції крові.

Фібриноген (фактор згортання I) є одним з основних компонентів системи гемостазу. У механізмі згортання фібриноген займає виключне положення, оскільки є єдиним субстратом, з якого під дією протеолітичного ферменту тромбіну виникає волокниста сітка фібрину, що є основою кров'яного згустку. Фібриноген – глікопротеїн з молекулярною масою 340 kDa, що являє собою димер, кожна субодиниця якого складається з трьох типів

поліпептидних ланцюгів α , β та γ , що з'єднані дисульфідними містками в єдину структуру. Підвищення концентрації фібриногену в плазмі крові у пацієнтів призводить до стану гіперкоагуляції та значно підвищує ймовірність тромбоутворення [2, 3, 11].

На рівень фібриногену в плазмі крові впливають як зовнішні, так і генетичні чинники, зокрема поліморфізм гена β -ланцюга фібриногену (*FGB*).

Ген *FGB* (OMIM*134830) локалізований на хромосомі 4 (4q31.3) та кодує β -ланцюг фібриногену. На сьогодні відомо декілька поліморфних варіантів гена *FGB*, що асоційовані з підвищенням концентрації фібриногену в плазмі крові [5]. Серед них найбільш вивчений поліморфний варіант С148Т гена *FGB* (rs1800787), що характеризується заміною цитозину (С) на тимін (Т) у положенні 148 у промоторній зоні *FGB*. У деяких дослідженнях визна-

чено, що у пацієнтів з генотипами 148СТ та 148ТТ рівень фібриногену в плазмі крові підвищений приблизно на 10–30% порівняно з таким в осіб з генотипом «дикий тип» [4, 7, 9, 10]. Досліджень, метою яких був аналіз залежності ступеня коагуляції крові та величини дози варфарину від генотипу поліморфного варіанта С148Т гена *FGB* у доступній літературі ми не знайшли.

Мета дослідження – проаналізувати вплив генотипу за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB* на режим дозування варфарину у пацієнтів кардіохірургічного профілю.

Матеріали і методи дослідження

В дослідження було включено 155 пацієнтів (105 (67,74%) чоловіків та 50 (32,26%) жінок), які перенесли операцію з протезування клапанів серця та отримували варфарин. Середній вік пацієнтів – 51,7±1,1 року. На проведення роботи було отримано дозвіл комітету з біоетики НМАПО ім. П.Л. Шупика. Кожний пацієнт давав інформовану згоду на участь у дослідженні.

У всіх пацієнтів було проведено аналіз залежності підбору дози варфарину та ступеня гіпокоагуляції від генотипу за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB*. Враховували такі характеристики періоду підбору дози: підбрану дозу варфарину (мг/добу) та проміжні значення міжнародного нормалізованого відношення (МНВ). Згідно з інструкцією стартова доза варфарину складала 5 мг/добу. Підбір дози препарату у пацієнтів з протезованими серцевими клапанами здійснювали до досягнення рекомендованих цільових значень МНВ (від 2,5 до 3,5). Підбраною вважали дозу, за якої цільові значення МНВ підтримувались у двох послідовних аналізах.

Пацієнти, у яких на етапі підбору дози варфарину спостерігали підвищення значень МНВ >3,5, що є маркером надмірної гіпокоагуляції крові та може призвести до виникнення кровотеч, увійшли до підгрупи А (n=35). Пацієнтів, у яких значення рівня МНВ не виходили за межі цільових значень, було включено до підгрупи В (n=120).

Для молекулярно-генетичного дослідження використовували ДНК, виділену з лейкоцитів периферійної крові. Виділення ДНК здійснювали з використанням комерційного набору «ДНК-сорб-В» (ЦНДІ епідеміології Міністерства охорони здоров'я РФ). Генотипування поліморфного варіанта С148Т гена *FGB* проводили з використанням методу ПЛР-ПДРФ згідно з методикою, описаною в роботі та оптимізованою до наших умов [8].

Детекцію продуктів ПЛР-ПДРФ проводили в 2% агарозному гелі. Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі після фарбування розчином етидію броміду. Довжину фрагментів аналізували шляхом порівняння з маркерною ДНК (рисунок).

Статистичну обробку даних проводили на персональному комп'ютері з використанням програмних пакетів Statistica 10.0 та MS Excel. Для оцінки відповідності розподілу генотипів очікуваним значенням при рівновазі Харді–Вайнберга та порівняння розподілу частоти генотипів та алелів між підгрупами дослідження використовували критерій χ^2 Пірсона та критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса на безперервність (при кількості до-

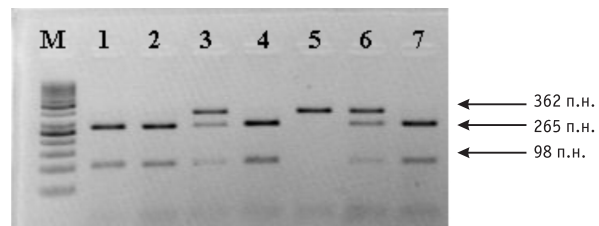


Рисунок. Електрофореграма рестрикційних фрагментів гена *FGB*. Зразки 1, 2, 4, 7 – генотип 148СС; 3, 6 – генотип 148СТ; 5 – генотип 148ТТ; М – ДНК маркер 100–1500 п.н.

сліджень менше 10). Для порівняння величин доз у підгрупах дослідження використовували критерій Стюдента. Вплив сполучень генотипів на ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції крові оцінювали за величиною відношення шансів (OR) у межах 95% довірчого інтервалу (CI) [1]. Статистично достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

В результаті проведеного молекулярно-генетичного обстеження 155 пацієнтів визначено частоту поліморфного варіанта С148Т гена *FGB*. Частота генотипів 148СС, 148СТ, 148ТТ гена *FGB* становила 45,2; 45,8 та 9% відповідно. Частота алелів 148С та 148Т складала: РС=0,68 та РТ=0,32. Виходячи з визначеної частоти алелів, підраховано теоретично очікувану частоту генотипів та встановлено, що частота генотипів за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB* відповідає розподілу згідно із законом Харді – Вайнберга та статистично вірогідно не відрізнялась від теоретично очікуваних.

Підраховано середню підбрану дозу варфарину для пацієнтів із протезованими клапанами серця. За генотипу 148СС гена *FGB* середньодобова доза варфарину складала 3,43±0,2 мг, за 148СТ – 3,4±0,18 мг, за 148ТТ – 3,23±0,21 мг. Не було виявлено асоціації поліморфізму С148Т гена *FGB* з величиною дози варфарину ($p > 0,05$).

На наступному етапі дослідження було проведено порівняльний аналіз частоти генотипів за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB* у пацієнтів підгрупи А (n=35) та підгрупи В (n=120). У підгрупі А на етапі підбору дози варфарину епізоди надмірної гіпокоагуляції частіше фіксували у пацієнтів з генотипом 148СТ (57,14%) та 148СС (34,29%). Тільки у 3 (8,57%) пацієнтів з генотипом 148ТТ значення МНВ виходили за межі терапевтичного діапазону. Проте не було виявлено достовірної різниці підвищення значень МНВ >3,5 залежно від генотипу за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB*.

На сьогодні активно продовжується пошук чинників, у тому числі генетичних, що можуть впливати на ефективність та безпеку терапії варфарином для удосконалення алгоритму дозування. Тому перспективним є вивчення впливу поліморфного варіанта С148Т гена *FGB* на режим дозування варфарину в комбінації з іншими поліморфними варіантами генів, що кодують білки системи гемостазу.

Висновки

Отже, визначено таку частоту генотипів за поліморфним варіантом С148Т гена *FGB*: 148СС – 45,2%, 148СТ –

45,8% та 148ТТ – 9%. Частота алелів 148С та 148Т становила: РС=0,68 та РТ=0,32. Не виявлено впливу даного поліморфізму на ступінь гіпокоагуляції та підбір дози варфарину у пацієнтів із протезованими клапанами серця.

Список літератури

1. Бабич П.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятие, вычисление и интерпретация / П.Н. Бабич, А.В. Чубенко, С.Н. Лапач // Український медичний часопис. – 2005. – № 2. – С. 138–144.
2. Fibrin D-dimer, tissue-type plasminogen activator, von Willebrand factor, and risk of incident stroke in older men / S.G. Wannamethee, P.H. Whincup, L. Lennon [et al.] // Stroke. – 2012. – Vol. 43, № 5. – P. 1206–1211.
3. Fibrinogen and the risk of thrombosis / P. de Moerloose, F. Boehlen, M. Neerman-Arbez [et al.] // Semin Thromb. Hemost. – 2010. – Vol. 36, № 1. – P. 7–17.
4. Fibrinogen beta-chain-C148T polymorphism is associated with increased fibrinogen, C-reactive protein, and interleukin-6 in patients undergoing coronary artery bypass grafting / E. Wypasek, E. Stepien, M. Kot [et al.] // Inflammation. – 2012. – Vol. 35, № 2. – P. 429–435.
5. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study / C.J. O'Donnell, M.G. Larson, D. Feng D [et al.] // Circulation. – 2001. – Vol. 103, № 25. – P. 3051–3056.
6. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / A. Vahanian, O. Alfieri, F. Andreotti [et al.] // European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33. – P. 2451–2496.
7. Is fibrinogen a marker of inflammation in coronary artery disease? / N. Papageorgiou, D. Tousoulis, G. Siasos [et al.] // Hellenic Journal of Cardiology. – 2010. – Vol. 51. – P. 1–9.
8. Mutation in the promoter region of the fibrinogen gene and the risk of future myocardial infarction, stroke and venous thrombosis / G.J. Blake, C. Schmitz, K. Lindpaintner [et al.] // European Heart Journal. – 2001. – Vol. 22. – P. 2262–2266.
9. Polymorphisms of the beta fibrinogen gene and plasma fibrinogen concentration in Caucasian and Japanese population samples / H. Iso, A.R. Folsom, J.C. Winkelmann [et al.] // Thromb Haemost. – 1995. – Vol. 73, № 1. – P. 106–111.
10. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration / F.M. van 't Hooft, S.J. von Bahr, A. Silveira [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1999. – Vol. 19, № 12. – P. 3063–3070.
11. Von Willebrand factor, fibrinogen and other risk factors of thrombosis in patients with a history of cerebrovascular ischemic stroke and their children / M. Jastrzebska, B. Torbus-Lisiecka, K. Honczarenko [et al.] // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. – 2002. – Vol. 12, № 3. – P. 132–140.

Исследование влияния полиморфного варианта С148Т гена β-цепи фибриногена на режим дозирования варфарина

И.В. Мальярчук, Н.Г. Горovenko, А.Р. Бабочкина, Н.С. Осипенко

РЕЗЮМЕ. Цель исследования – проанализировать зависимость величины подобранной дозы варфарина и степень гипоккоагуляции от генотипа гена *FGB*.

Материалы и методы. В исследование были включены 155 пациентов, (мужчин – 67,74%, женщин – 32,26%; средний возраст – 51,7±1,1 года), которые перенесли операцию протезирования клапанов сердца и получали варфарин в стартовой дозе 5 мг/сут. Пациенты, у которых на этапе подбора дозы варфарина наблюдалось повышение значений международного нормализованного отношения (МНО) >3,5, вошли в подгруппу А (n=35), пациентов, у которых значения МНО не выходили за границы целевых значений, включили в подгруппу В (n=120).

Результаты. Определена частота генотипов 148СС, 148СТ и 148ТТ по полиморфному варианту С148Т гена *FGB*, которая составила 45,2; 45,8 и 9% соответственно. При сравнительном анализе частоты генотипов по полиморфному варианту С148Т гена *FGB* между пациентами подгрупп А (n=35) и В (n=120) достоверной разницы не выявлено. У пациентов с генотипом 148СС среднесуточная доза варфарина составила 3,43±0,2 мг, у пациентов с генотипом 148СТ – 3,4±0,18 мг, а у пациентов с генотипом 148ТТ – 3,23±0,21 мг. Ассоциация полиморфного варианта С148Т гена *FGB* с величиной дозы варфарина не обнаружена.

Выводы. Не выявлено влияния полиморфного варианта С148Т гена *FGB* на степень гипоккоагуляции и подбор дозы варфарина у пациентов с протезированными клапанами сердца.

Ключевые слова: варфарин, генотип, доза, полиморфизм.

Investigation of the influence of C148T polymorphism of fibrinogen beta-chain gene on warfarin dosing

I.V. Maliarchuk, N.G. Gorovenko, A.R. Babochkina, N.S. Osypenko

SUMMARY. Aim. To investigate the impact of *FGB* polymorphism on dose warfarin and international normalized ratio (INR) values changes.**Materials and methods.** The study included 155 patients (67.74% male, 32.26% women), average age 51.7 ± 1.1 years) after heart valve replacement. Patients received warfarin treatment from initial dose of 5 mg/day. Subgroup A (n=35) – patients with INR values out of therapeutic range and subgroup B (n=120) patients with INR values from 2.5 to 3.5. For determination of polymorphic variant C148T of *FGB* gene the method of PCR-RFLP has been used.**Results.** The frequencies of 148CC, 148CT and 148TT genotypes among the patients group were 45.2%, 48.8% and 9%, respectively. The significant differences in subgroups A and B for C148T polymorphic variant were not found. The mean daily dose of warfarine was 3.43 ± 0.2 mg in patients with 148CC genotype, 3.4 ± 0.18 mg in patients with 148CT genotype and 3.23 ± 0.21 mg with 148TT genotype. The significant differences were not found for warfarin dose with C148T polymorphic variant of *FGB* gene.**Conclusions.** We have not found effect of *FGB* polymorphism on INR values changes and warfarin dosing in patients with heart valve replacement.**Key words:** warfarin, genotype, dose, polymorphism.**Адреса для листування:**Ірина Володимирівна Малярчук
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»,
04114, Київ, вул. Вишгородська, 67

НОВИНИ

Двигательная активность, биомаркеры гемостаза и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний

Изучали влияние двигательной активности на биомаркеры гемостаза и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний у пожилых мужчин по данным лонгитудинальных наблюдений. На протяжении 10 лет наблюдались 3320 мужчин, практически здоровых на момент первичного обследования. Оценивался уровень двигательной активности и выраженность новых маркеров риска заболеваемости сердечно-сосудистой системы, таких, как С-реактивный белок, Д-димер, фактор Виллебрандта, N-концевой предшественник мозгового натриуретического пептида (NT-proBNP). За период наблюдения зафиксировано 303 первичных и 184 летальных сердечно-сосудистых событий. Уровень двигательной активности имел обратную корреляционную взаимосвязь с уровнем С-реактивного белка, Д-димера, фактора Виллебрандта, NT-proBNP. Показано, что двигательная активность даже умеренной интенсивности снижает уровень заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из механизмов этого явления может быть влияние двигательной активности на систему гемостаза, механизмы воспаления и функциональное состояние миокарда.

Jefferis B.J. et al., J. Am. Geriatr. Soc. 2014

Полифосфаты – новый фактор в системе гемостаза

Полифосфаты представляют собой неорганические полимеры. Установлено, что полифосфаты секретируются активированными тромбоцитами и играют важную роль модулятора в процессах гемостаза, тромбообразования, воспаления посредством участия в системе комплемента. В связи с этим полифосфаты представляют значительный интерес, как потенциальные лекарственные средства при воздействии на систему свертывания крови при различных патологических процессах.

Smith S.A., Morrissey J.H. Curr. Opin. Hematol., 2014