

## PROTHROMBOTIC POLYMORPHISMS AND LONG-TERM PROGNOSIS OF PATIENTS WITH STABLE ISCHEMIC HEART DISEASE

A.L. Komarov<sup>1</sup>, O.O. Shahmatova<sup>1\*</sup>, D.V. Rebrikov<sup>2,3</sup>, D.Yu. Trofimov<sup>2</sup>, T.I. Kotkina<sup>1</sup>, T.A. Ilyushenko<sup>1</sup>, A.D. Deev<sup>4</sup>, E.P. Panchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian Cardiology Research and Production Complex. Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

<sup>2</sup> «DNA-Technology» Research and Production Company. Varshavskoe shosse 125Ж-6, Moscow, 117587 Russia

<sup>3</sup> General Genetics Institute named after N.I. Vavilov. Gubkina ul. 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>4</sup> State Research Center for Preventive Medicine. Petroverigsky per. 10, Moscow, 101990 Russia

### Prothrombotic polymorphisms and long-term prognosis of patients with stable ischemic heart disease

A.L. Komarov<sup>1</sup>, O.O. Shahmatova<sup>1\*</sup>, D.V. Rebrikov<sup>2,3</sup>, D.Yu. Trofimov<sup>2</sup>, T.I. Kotkina<sup>1</sup>, T.A. Ilyushenko<sup>1</sup>, A.D. Deev<sup>4</sup>, E.P. Panchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian Cardiology Research and Production Complex. Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

<sup>2</sup> «DNA-Technology» Research and Production Company. Varshavskoe shosse 125Ж-6, Moscow, 117587 Russia

<sup>3</sup> General Genetics Institute named after N.I. Vavilov. Gubkina ul. 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>4</sup> State Research Center for Preventive Medicine. Petroverigsky per. 10, Moscow, 101990 Russia

**Aim.** To estimate influence of thrombosis associated genetic factors on cardiovascular complications (CVC) occurrence in patients with stable ischemic heart disease (IHD) on the base of 5-year prospective survey.

**Material and methods.** A total of 503 patients with the mean age of 59.4 years were enrolled into the study. The follow-up period was 5.4 years. Composite endpoint included the following cases of fatal and nonfatal CVC: death, acute coronary syndrome, ischemic stroke/transient ischemic attack, peripheral arterial thrombosis and revascularization of affected vascular system. We determined prevalence and prognostic value of mutations and polymorphisms in genes that encode blood clotting factors (factor V Leiden G1691A, prothrombin G20210A,  $\beta$ -fibrinogen 455G>A), platelet GPIIb/IIIa receptor (C1565T) and enzymes involved in homocysteine metabolism (methylentetrahydrofolate reductase (C667 T MTHFR) and A1298C, methionine synthase (MTR) A2756G, methionine synthase-reductase (MTRR) A66G and transcobalamin (TCN) C776G).

**Results.** Overall incidence rate of vascular events made up 31.0%. MTHFR and TCN polymorphisms proved to be significant in regard to cardiovascular risk among all studied genetic indices. Carriage of at least C667 T one MTHFR polymorphic allele increased risk of CVC 1.64 times (95% confidence interval (CI) 1.2-2.3, p=0.003). Homozygous carriage of MTHFR 1298 AA and TCN 776 CC "wild" genotypes increased risk of CVC 1.63 times (95% CI 1.2-2.3, p=0.006) and 1.37 times (95% CI 1.001-1.89, p=0.04), respectively. Such genetic variants as MTHFR C667 T/CT and 1298 AA impacted prognosis only given concomitant decrease in plasma folate level, which was observed in 56.1% of the patients.

**Conclusion.** It can be recommended to test the presence of MTHFR C667 T, MTHFR 1298 AA and TCN 776 CC, and to simultaneously assess folate level in IHD patients in order to clarify risk of unfavorable cardiovascular events.

**Key words:** stable ischemic heart disease, prothrombotic polymorphisms, homocysteine metabolism, folate

**Rational Pharmacother. Card. 2011;7(4):409-425**

### Влияние генетических факторов, ассоциированных с тромбозами, на долгосрочный прогноз больных хронической ишемической болезнью сердца

A.L. Komarov<sup>1</sup>, O.O. Shahmatova<sup>1\*</sup>, D.V. Rebrikov<sup>2,3</sup>, D.Yu. Trofimov<sup>2</sup>, T.I. Kotkina<sup>1</sup>, T.A. Ilyushenko<sup>1</sup>, A.D. Deev<sup>4</sup>, E.P. Panchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский кардиологический научно-производственный комплекс. 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

<sup>2</sup> Научно-производственная фирма «ДНК-Технология». 117587, Москва, Варшавское шоссе, 125Ж, корп. 6

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова. 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>4</sup> Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины. 101990 Москва, Петроверигский пер., 10

**Цель.** На основании результатов пятилетнего проспективного наблюдения определить роль генетических факторов, ассоциированных с тромбозами, в развитии сердечно-сосудистых осложнений (ССО) у больных со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС).

**Материал и методы.** В исследование были включены 503 больных, средний возраст которых составил 59,4 лет. Продолжительность наблюдения – 5,4 года. Комбинированная конечная точка включала случаи фатальных и нефатальных ССО: смерти, острого коронарного синдрома, ишемического инсульта/транзиторной ишемической атаки, периферического артериального тромбоза и реваскуляризации пораженного сосудистого бассейна. Определены распространенность и влияние на прогноз мутаций и полиморфизмов генов, кодирующих факторы свертывания крови (фактор V Лейден G1691A, протромбин G20210A,  $\beta$ -фибриноген 455 G>A), рецептор тромбоцитов GPIIb/IIIa (C1565T) и ферменты, участвующие в обмене гомоцистеина (метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) C667 T и A1298C, метионинсинтаза (MTR) A2756G, метионинсинтаза-редуктаза (MTRR) A66G и транскобаламин (TCN) C776G).

**Результаты.** Суммарная частота сосудистых событий составила 31,0%. Из всех изученных генетических показателей значимыми в отношении риска развития сосудистых событий оказались полиморфизмы MTHFR и TCN. Носительство хотя бы одной полиморфной аллели MTHFR 677 T повышало риск развития ССО в 1,64 раза (95% доверительный интервал (ДИ) 1,2-2,3, p=0,003). Гомозиготное носительство «диких» генотипов MTHFR 1298 AA и TCN 776 CC повышало риск развития ССО, соответственно, в 1,63 раза (95% ДИ 1,2-2,3, p=0,006) и в 1,37 раза (95% ДИ 1,001-1,89, p=0,04). Влияние на прогноз генетических вариантов MTHFR C667 T/CT и 1298 AA проявлялось при условии сопутствующего снижения уровня фолиевой кислоты плазмы крови, наблюдавшегося у 56,1% обследованных больных.

**Заключение.** Выявление носительства генотипов MTHFR C667 T и 1298 AA, и TCN 776 CC, а также сопутствующее определение уровня фолиевой кислоты могут быть рекомендованы больным ИБС с целью уточнения риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

**Ключевые слова:** стабильная ишемическая болезнь сердца, протромботические полиморфизмы, обмен гомоцистеина, фолиевая кислота.

**РФК 2011;7(4): 409-425**

\*Corresponding author (автор, ответственный за переписку): olga.shahmatova@gmail.com

### Author's information:

**Andrey L. Komarov** – PhD., MD, Senior research associate, Russian Cardiology Research and Production Complex

**Olga O. Shahmatova** – PhD, MD, Junior research associate, the same Complex

**Denis V. Rebrikov** – PhD, R&D Director of "DNA-Technology" Research and Production Company; Head of "Genetic Polymorphism" center of General Genetics Institute named after Vavilov N.I.

**Dmitry Y. Trofimov** – PhD, CEO of "DNA-Technology" Research and Production Company

**Tatiana I. Kotkina** – MD, Head of the clinical-diagnostic laboratory, the same Complex

**Tatiana A. Ilyushenko** – MD, Postgraduate student, the same Complex

**Alexander D. Deev** – PhD, Head of the biostatistics laboratory of the State Research Center for Preventive Medicine

**Elizaveta P. Panchenko** – PhD, MD, Professor, Head of the atherothrombosis clinical problems laboratory, the same Complex

### Сведения об авторах:

**Комаров Андрей Леонидович** – к.м.н., старший научный сотрудник Российского кардиологического научно-производственного комплекса  
**Шахматова Ольга Олеговна** – к.м.н., младший научный сотрудник того же комплекса

**Ребриков Денис Владимирович** – д.б.н., директор по науке НПФ «ДНК-Технология»; руководитель центра коллективного пользования отделения биологических наук РАН «Генетический полиморфизм» Института общей генетики им. Н. И. Вавилова  
**Трофимов Дмитрий Юрьевич** – д.б.н., генеральный директор НПФ «ДНК-Технология»

**Коткина Татьяна Ивановна** – руководитель клинично-диагностической лаборатории Российского кардиологического научно-производственного комплекса

**Илющенко Татьяна Анатольевна** – аспирант того же комплекса  
**Деев Александр Дмитриевич** – к. физ.-мат.н., руководитель лаборатории биostatистики Государственного научно-исследовательского центра профилактической медицины

**Панченко Elizaveta Павловна** – д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клинических проблем атеротромбоза Российского кардиологического научно-производственного комплекса

Cardiovascular diseases attributed to atherothrombosis such as ischemic heart disease (IHD) and cerebrovascular disease (CVD) are the main reason of mortality and incapacitation in developed countries. They cause about half of all cases of death and about 23% of cases of incapacitation in Europe [1].

Standard scales (SCORE, PROCAM, PRIME and others) mainly evaluate clinical findings, and do not allow to adequately estimate cardiovascular complications (CVC) risk, and to reveal those who need active preventive measures [1]. Detection of gene polymorphisms probably associated with atherothrombosis will certainly be useful in cardiovascular risk estimation. Prognostic value of gene polymorphisms, which encode different classes of proteins involved in atherosclerosis pathogenesis (apolipoproteins, kinesins, integrins, inflammatory factors and others) is actively studied now [2,3]. Considering close correlation between atherogenesis and thrombogenesis processes it is important to study polymorphisms of haemostatic system genes.

Correlation of some of them (primarily of Factor V Leiden mutation and prothrombin gene polymorphism) with venous thrombosis and embolism, and with systemic thromboembolic complications of atrium fibrillation has been proved by now [4-7]. Population surveys revealed no significant association of atherothrombotic events with hemostatic system hereditary impairment in initially healthy people [8-11]. It is not completely clear if prothrombotic mutations and polymorphisms can be regarded as additional risk factors in patients with clinical findings of atherothrombosis.

The aim of the study was to evaluate influence of genetic risk factors associated with thrombosis on cardiovascular complications occurrence in patients with stable IHD based on five-year prospective study results.

## Material and methods

Patients over 35 with stable IHD were enrolled into the study. Either anamnesis data (previous episode of acute coronary syndrome (ACS) more than one month ago or myocardium revascularization) or stress testing and coronary angiography verified diagnosis of IHD. Examination of patients included angina pectoris functional class estimation (in accordance with classification adopted by Canadian Cardiovascular Society) and heart failure functional class evaluation (in accordance with New York Heart Association classification). All patients received 12-lead ECG monitoring and echocardiography examination with left ventricle ejection fraction detection.

Patients were also examined for CVD and periph-

Заболевания сердечно-сосудистой системы, обусловленные атеротромбозом, прежде всего ишемическая болезнь сердца (ИБС) и цереброваскулярная болезнь (ЦВБ), являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения развитых стран. Так, в Европе на их долю приходится около половины всех случаев смерти и 23% случаев утраты трудоспособности [1].

Стандартные шкалы (SCORE, PROCAM, PRIME и др.), учитывающие, как правило, только клинические показатели, не позволяют полностью охарактеризовать степень риска сердечно-сосудистых осложнений (ССО) и выявить всех лиц, нуждающихся в активной профилактике [1]. Определение генетических полиморфизмов, которые могли бы быть связаны с возникновением атеротромбоза, безусловно, окажется полезным для оценки индивидуального риска этого заболевания. В настоящее время активно изучается прогностическая значимость полиморфизмов генов, кодирующих различные классы белков, участвующих в патогенезе атеросклероза (аполипопротеины, кинезины, интегрины, факторы воспаления и т.д.) [2,3]. Учитывая тесную взаимосвязь процессов атерогенеза и тромбообразования, особое внимание привлекает полиморфизм генов системы гемостаза.

На сегодняшний день доказана связь некоторых из них (в первую очередь – мутации фактора V Лейден и полиморфизма гена протромбина) с возникновением венозных тромбозов и эмболий, а также системных тромбоэмболических осложнений мерцательной аритмии [4-7]. Что касается атеротромботических событий, то популяционные исследования не обнаружили значимой ассоциации врожденных нарушений системы гемостаза с их развитием у исходно здоровых лиц [8-11]. Могут ли протромботические мутации и полиморфизмы рассматриваться в качестве дополнительных факторов риска (ФР) у больных с уже имеющимися клиническими проявлениями атеротромбоза, до конца неясно.

Цель работы – на основании результатов пятилетнего проспективного наблюдения определить роль генетических ФР, ассоциированных с тромбозами, в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных со стабильной ИБС.

## Материал и методы

Для участия в исследовании отбирались пациенты в возрасте старше 35 лет со стабильным течением ИБС. Диагноз ИБС верифицировался данными анамнеза в виде перенесенного эпизода острого коронарного синдрома (ОКС) более 1 мес назад или реваскуляризации миокарда, или с помощью нагрузочных стресс-тестов и коронароангиографии. Обследование больных включало оценку функционального класса стенокардии (согласно классификации Канадского кардиологического общества) и явлений недостаточности кровообращения (согласно классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации). Всем больным регистрировалась ЭКГ в 12 отведениях и проводилась эхокардиография с оценкой фракции выброса левого желудочка.

eral artery occlusive disease (PAOD). The CVD diagnostic criteria were as follows: previous ischemic stroke (IS) or transitory ischemic attack (TIA) more than two months ago, revascularization in carotid system, carotid stenosis >50% (including asymptomatic) at duplex scanning. The criteria of PAOD were as follows: decrease in ankle-brachial index <0.9 (asymptomatic or with intermittent claudication symptoms) or previous revascularization of peripheral arteries.

Atherosclerotic lesion extent was estimated along with "classic" cardiovascular risk factor, such as arterial hypertension, smoking, diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, and renal insufficiency.

Exclusion criteria were recent episodes either of ACS (less than 1 month ago) or of IS/TIA (less than 2 months ago), and signs of severe angina pectoris (functional class IV) or of heart failure (NYHA IV).

Patients with severe comorbidities which could autonomously impact prognosis, such as active oncologic process, lung diseases (type II-III respiratory failure), renal failure (creatinine clearance <30 ml/min), and hepatic failure (more than three times increase in activity of transaminases and/or in total bilirubin level) were also excluded from the study.

All patients were genotyped for allelic variants of genes encoding the following hemostatic system elements: coagulation factor V (Leiden mutation, G1691A), prothrombin (G20210A), fibrinogen  $\beta$ -chain (455 G>A) and platelet glycoprotein IIIa receptor for fibrinogen (1565 T>C Leu33Pro).

We also studied polymorphisms in genes encoding key enzymes of homocysteine conversion cycle. Prevalence of the following allelic variants of genes was estimated: methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) C667 T, MTHFR A1298C, methionine synthase (MTR) A2756G, methionine synthase-reductase (MTRR) A66G, and transcobalamin (TCN) C776G. We also estimated folate and vitamin B<sub>12</sub> levels in plasma, which are main cofactors of reactions catalyzed by these enzymes (Fig. 1) [12, 13].

"DNA-Technology" Research and Production Company (Russia) provided a base for genetic research, and commercial sets of reagents. Genotype was detected by the "real time" polymerase-chain reaction (PCR) method with subsequent estimation of amplification products melting curve and allele-specific fluorescent-labeled oligo-nucleotide samples. Not less than 500 genome-equivalents per a reaction were studied. Each sample was tested in two replications. PCR was carried out in detecting amplifier DTprime (DNA-Technology, Russia) in accordance with the following protocol: 94°C – 10 sec, 64°C – 10 sec, 72°C – 10 sec during 45 cycles. Melting curves were obtained after PCR by heating the reaction mixture within interval

Также проводилось обследование на предмет выявления ЦВБ и атеросклеротического поражения артерий нижних конечностей (АПАНК). Критериями диагноза ЦВБ служили анамнез ишемического инсульта (ИИ) или транзиторной ишемической атаки (ТИА) более 2 мес назад, ревазуляризация в бассейне сонных артерий, а также наличие каротидного стеноза >50% (в т.ч. бессимптомного), выявляемого при дуплексном сканировании. Критериями АПАНК были снижение лодыжечно-плечевого индекса <0,9 (бессимптомное или с клиникой перемежающейся хромоты) либо предшествующая ревазуляризация периферических артерий.

Наряду с определением распространенности атеросклеротического процесса предусматривалась оценка «классических» сердечно-сосудистых факторов риска: артериальной гипертонии, курения, сахарного диабета, ожирения, нарушений липидного обмена, почечной недостаточности.

Критериями невключения в исследование являлись недавние эпизоды ОКС (менее 1 мес назад) или ИИ/ТИА (менее 2 мес назад), наличие клиники тяжелой стенокардии (IV функциональный класс) либо недостаточности кровообращения (NYHA IV).

Кроме того, не включались больные с тяжелой сопутствующей патологией, способной оказать самостоятельное влияние на прогноз, в том числе с активным онкологическим процессом, выраженными нарушениями функции органов дыхания (дыхательная недостаточность 2-3 степени), почек (клиренс креатинина <30 мл/мин) или печени (более чем трехкратное повышение активности трансаминаз и/или уровня общего билирубина).

Все больные были генотипированы по аллельным вариантам генов, кодирующих следующие компоненты системы гемостаза: V фактор свертывания (мутация Лейден, G1691A), протромбин (G20210A),  $\beta$ -цепь фибриногена (455 G>A) и гликопротеин IIIa тромбоцитарного рецептора фибриногена (1565 T>C Leu33Pro).

Также изучались полиморфизмы генов, кодирующих ключевые ферменты цикла обмена гомоцистеина. Изучалась распространенность аллельных вариантов генов метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR C667 T, MTHFR A1298C, метионинсинтазы (MTR) A2756G, метионинсинтазы-редуктазы (MTRR) A66G и транскобаламина (TCN) C776G. Кроме того, определялось содержание в плазме фолиевой кислоты (ФК) и витамина B<sub>12</sub>, являющихся основными кофакторами реакций, катализируемых данными ферментами (рис. 1) [12, 13].

Генетическое исследование было выполнено на базе НПФ «ДНК-Технология» с использованием коммерческих наборов реагентов (ДНК-Технология, Россия). Генотип определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) «в реальном времени» со снятием кривых плавления продуктов амплификации и аллель-специфичных флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных проб после ПЦР. В исследование брали не менее 500 геном-эквивалентов на реакцию. Каж-

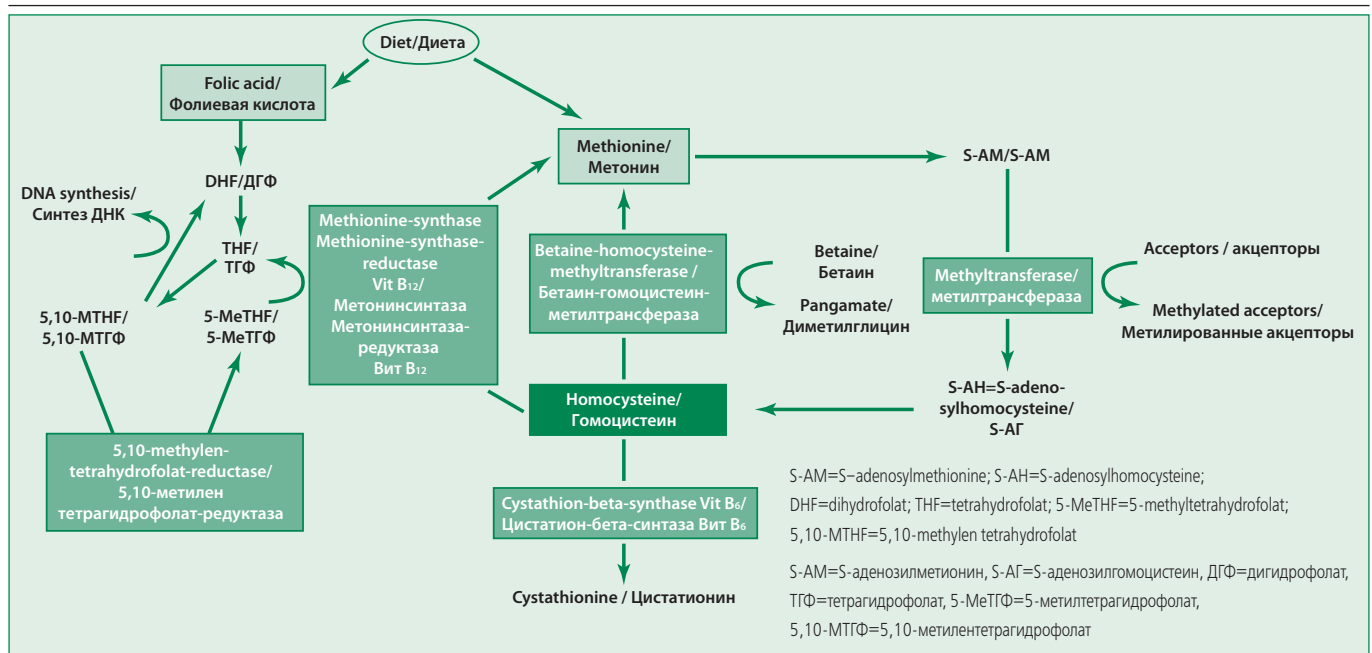


Figure 1. Homocysteine metabolism  
 Рис. 1. Метаболизм гомоцистеина

of 40-94°C. PCR results were analyzed automatically with DTPprime software, version 7.5 (DNA-Technology, Russia).

Abbot AxSYM System and commercial set of reagents AxSYM Folate were used to detect folate concentration by the ion trap method. Reference values of folate concentration were 7.2-20 ng/ml.

Abbot AxSYM System and commercial set of reagents AxSYM B<sub>12</sub> were used to estimate vitamin B<sub>12</sub> level by the enzyme immunoassay method. Reference values of cobalamin concentration were 200-1000 pg/ml.

At the beginning of the study drug therapy was evaluated, and, if necessary, it was corrected in line with contemporary evidence-based guidelines. All patients were recommended to take antiplatelet agents (acetylsalicylic acid, clopidogrel or their combination), β-blockers, ACE-inhibitors, and statins if no contraindications were revealed.

The mean follow-up period made up about 5 years (3-7.5 years). The following fatal and nonfatal CVC were registered during the follow-up period: cardiovascular death, ACS, IS, TIA, peripheral arterial thrombosis, and affected vascular system revascularization (coronary bypass, percutaneous coronary intervention, carotid endarterectomy, and lower limbs revascularization).

Statistical analysis was performed in Statistical Analysis System (SAS). The Cox proportional hazards model using SAS PROC PHREG procedure was applied to model survival rate and to estimate significant prognostic indices (clinical, biochemical, genetic). We used a macroprocedure to test significance of many con-

дый образец тестировали в двух повторностях. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия) по следующей программе: 94 °C – 10 сек, 64 °C – 10 сек, 72 °C – 10 сек в течение 45 циклов со снятием кривых плавления после ПЦР путем нагрева реакционной смеси в интервале от 40 до 94 °C. Анализ результатов ПЦР проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения версии 7.5 к прибору ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия).

Концентрацию ФК определяли методом захвата ионов с использованием коммерческого набора реактивов AxSYM Folate на приборе «AxSYM System», Abbott. Референсные значения концентрации ФК 7,2-20 нг/мл.

Уровень витамина B<sub>12</sub> определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора реактивов AxSYM B<sub>12</sub> на приборе «AxSYM System», Abbott. Референсные значения концентрации кобаламина 200-1000 пг/мл.

При включении в исследование проводилась оценка медикаментозной терапии и в случае необходимости — ее коррекция в соответствии с рекомендациями, основанными на современных принципах доказательной медицины. Всем больным при отсутствии противопоказаний был рекомендован прием антиагрегантов (аспирин, клопидогрел или их комбинации), бета-блокаторов, ингибиторов АПФ и статинов.

Продолжительность наблюдения составила от 3 до 7,5 лет (в среднем 5 лет), на протяжении которых регистрировали следующие фатальные и нефатальные ССО: сердечно-сосудистую смерть, ОКС, ИИ, ТИА, периферический артериальный тромбоз, случаи реваскуляризации пораженного сосудистого бассейна (коронарное шунтирование, чрескожное коронарное вмешательство, каротидную

tinuous, categorical and categorized indices, considering influence of indices with proven significance (such as age) that were forcibly included into the model.

Significance of analyzed variables was evaluated by Wald chi-square test. The obtained values are presented in tables and figures as  $n$  (%) and  $M \pm m$ .

## Results

A total of 503 patients (387 men and 116 women) with the mean age of 59.4 were enrolled into the study (Table 1).

High prevalence of atherothrombosis risk factors, including arterial hypertension (89.4%), smoking (36.4%), diabetes mellitus (18.5%), obesity (33.2%), and renal function impairment (53.6%) was observed. Three quarters of the patients suffered from angina pectoris of functional class II-III. More than a half of the patients had experienced episodes of ACS with or without ST-segment elevation, and nearly 20% had severe multivessel impairment of coronary system. Almost a quarter of the patients (24.4%) revealed clinically significant atherosclerotic lesion of more than one vascular basin. 18.5% of the patients revealed IHD in combination with CVD; 24.4% of the patients had both IHD and PAOD; 7.9% of the patients demonstrated widespread damage of all the three main vascular systems.

Genotyping results are summarized in Table 2. Predictably, Leiden mutation and prothrombin gene polymorphism were most rarely found in the examined cohort (in 3.6% and 2.4% of the patients respectively). Majority of the patients were heterozygous for these polymorphisms; homozygous presence of Leiden mutation was found only in one patient.

More than a half of the patients revealed 455 G>A polymorphism in the fibrinogen  $\beta$ -chain gene, which is located in 5'-end noncoding region of the gene and does not cause any structural changes of protein, but leads to increase in its plasma level. One third of the patients shown C1565T polymorphism in gene of platelet fibrinogen receptor IIIa subunit which is responsible for the final stage of platelet aggregation.

Polymorphisms in genes that encode proteins involved in homocysteine metabolism were observed significantly more often. These were: MTHFR C677T – 50.8%; MTHFR A1298C – 54.7%, MTR A2756G – 53.1%, MTRR A66G – 60.1% and TCN C776G – 61.9%.

Follow-up period was 3.5 to 7.5 years (mean duration -  $5.4 \pm 0.1$  years). Cardiovascular complications registered in IHD patients are summarized in Table 3.

Cumulative frequency of endpoint calculated as a sum of all cases of atherothrombosis exacerbation (fa-

эндартерэктомии, реваскуляризацию артерий нижних конечностей).

Статистический анализ данных проводился в системе SAS (Statistical Analysis System). Для моделирования выживаемости и определения прогностически значимых показателей (клинических, биохимических, генетических) использовалась регрессионная модель пропорционального риска (Кокса), реализованная в процедуре SAS PROC PHREG. Была использована макропроцедура, позволяющая тестировать на значимость множество непрерывных, категориальных или категоризованных показателей при учете влияния заведомо значимых показателей (таких как возраст), включаемых в модель насильственно. Значимость тестируемых переменных определялась с помощью асимптотического критерия хи-квадрат Вальда. В таблицах и рисунках полученные значения представлены в виде  $n$  (%) и  $M \pm m$ .

## Результаты

В исследование были включены 503 больных (387 мужчин и 116 женщин), средний возраст которых составил 59,4 лет (табл. 1).

Была выявлена высокая распространенность ФР атеротромбоза, включая артериальную гипертонию (84,9%), курение (36,4%), сахарный диабет (18,5%), ожирение (33,2%) и нарушение функции почек (53,6%). Три четверти пациентов имели стенокардию II–III функционального класса. Более половины больных ранее перенесли эпизод ОКС с подъемом или без подъема сегмента ST, и почти 20% имели тяжелое многосудистое поражение коронарного русла. Почти четверть пациентов (24,4%) характеризовались клинически значимым атеросклеротическим поражением более чем в 1 сосудистом бассейне. Сочетание ИБС с ЦВБ было выявлено у 18,5% пациентов, ИБС с АПАНК – у 24,4%; 7,9% больных имели распространенное поражение всех трех основных сосудистых бассейнов.

Результаты генотипирования представлены в табл. 2. Как и ожидалось, в обследованной когорте реже всего встречались мутация Лейден и полиморфизм гена протромбина (соответственно, у 3,6% и 2,4% пациентов). Большая часть больных была гетерозиготами по указанным полиморфизмам, гомозиготное носительство мутации Лейден было выявлено только у одного пациента.

Почти у половины больных был выявлен полиморфизм 455 G>A в гене  $\beta$ -цепи фибриногена, который локализован в 5'-концевой некодирующей части гена и не вызывает структурных изменений белка, но приводит к повышению его уровня в плазме крови. У трети пациентов обнаружен полиморфизм гена субъединицы IIIa C1565T тромбоцитарного рецептора к фибриногену, ответственного за финальный этап агрегации тромбоцитов.

Значительно чаще встречались полиморфизмы генов белков, участвующих в обмене гомоцистеина: MTHFR C667 T – 50,8%; MTHFR A1298C – 54,7%; MTR A2756G – 53,1%; MTRR A66G – 60,1% и TCN C776G – 61,9%.

Table 1. Clinical characteristics of patients with stable IHD included into the study (n=503)

Табл. 1. Клиническая характеристика больных стабильной ИБС, включенных в исследование (n=503)

Parameter/Параметр	Value*/Значение*
Men/Мужчины	387 (76.9)
Age, years/Возраст, годы	59.4±0.4
"Classic" risk factors/«Классические» факторы риска	
• Arterial hypertension/Артериальная гипертензия	427 (84.9)
• Smoking in anamnesis/currently/Курение в анамнезе/в настоящее время	183 (36.4)/118 (23.5)
• Diabetes mellitus/Сахарный диабет	93 (18.5)
• Total cholesterol, mmol/l/Общий холестерин, ммоль/л	5.2±0.06
• Triglycerides, mmol/l/Триглицериды, ммоль/л	1.9±0.04
• Hypercholesterolemia**/Гиперхолестеринемия**	405 (80.5)
• BMI, kg/m <sup>2</sup> /ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	28.5±0.19
• Overweight (BMI 25.0–29.9 kg/m <sup>2</sup> )/Obesity (BMI ≥30.0 kg/m <sup>2</sup> )/ Избыточная масса тела (ИМТ 25,0–29,9 кг/м <sup>2</sup> )/Ожирение (ИМТ ≥30,0 кг/м <sup>2</sup> )	226 (44.9)/167 (33.2)
Mild to moderate renal insufficiency (creatinine clearance 30–89 ml/min)/ Начальное либо умеренное нарушение функции почек (клиренс креатинина 30–89 мл/мин)	269 (53.6)
Anamnesis of erosive gastritis/Анамнез эрозивного гастрита	73 (14.5)
Angina pectoris of functional class II–III/Стенокардия напряжения II–III функциональный класс	378 (75.1)
Previous ACS with ST elevation/without ST elevation/ОКС в анамнезе с подъемом ST/без подъема ST	291 (57.9)/116 (23.1)
Previous PCI/CB/ ЧКВ/КШ в анамнезе	333 (66.2)/64 (12.7)
Left bundle branch block complete/incomplete/Блокада ЛНПГ полная/неполная	27 (5.37)/11 (2.2)
Chronic heart failure NYHA II–III/Хроническая сердечная недостаточность NYHA II–III	35 (6.96)
LV EF ≤40%/ФВ ЛЖ ≤40%	32 (6.36)
Coronarography results:/Результаты коронарографии:	
• Monovascular lesion/Однососудистое поражение	142 (28.2)
• Bivascular lesion/Двухсосудистое поражение	127 (25.2)
• Lesion of three vessels or of the LCA trunk/Поражение трех сосудов либо ствола ЛКА	95 (18.9)
• Absence of coronarography/Коронарография не выполнялась	139 (27.6)
Concomitant cerebrovascular disease/Сопутствующая цереброваскулярная болезнь	93 (18.5)
• Ischemic stroke >2 months ago/Ишемический инсульт >2 мес назад	32 (6.4)
• TIA >2 months ago/ТИА >2 мес назад	16 (3.2)
• Carotid artery stenosis ≥50%/Стеноз сонной артерии ≥50%	62 (12.3)
• Endarterectomy/angioplasty >2 months ago/Эндартерэктомия/ангиопластика >2 мес назад	12 (2.4)
Concomitant peripheral arteries atherosclerosis/Сопутствующий атеросклероз артерий нижних конечностей	123 (24.4)
• Ankle-brachial index SBP ≤0.9/Лодыжечно-плечевой индекс САД ≤0,9	107 (21.3)
• Intermittent claudication/Перемежающаяся хромота	47 (9.3)
• Peripheral arteries intervention (bypassing/angioplasty) >2 months ago/ Вмешательство на периферических артериях (шунтирование /ангиопластика) >2 мес назад	6 (1.2)
* Data are shown as n (%) or M±SD.	
** One of the following criteria: total cholesterol ≥5.0 mmol/l, cholesterol of low density lipoproteins 3.0 mmol/l or lipid-lowering therapy. BMI – body mass index; ACS – acute coronary syndrome; PCI – percutaneous coronary intervention; CB – coronary bypass; LV EF – left ventricle ejection fraction; LCA – left coronary artery; TIA – transient ischemic attack; SBP – systolic blood pressure.	
* Данные представлены в виде n (%) или M±SD.	
** Один из критериев: уровень общего холестерина ≥5,0 ммоль/л, холестерина липопротеинов низкой плотности 3,0 ммоль/л либо прием гиполипидемических препаратов. ИМТ – индекс массы тела; ОКС – острый коронарный синдром; ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство; КШ – коронарное шунтирование; ЛНПГ – левая ножка пучка Гиса; ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка; ЛКА – левая коронарная артерия; ТИА – транзиторная ишемическая атака; САД – систолическое артериальное давление	

tal and nonfatal) made up 21.1%. Frequency of composite endpoint (a sum of atherothrombosis exacerbation cases and of affected vascular system revascularization cases) was 31%.

The Cox proportional hazards regression model was used to model survival rate and to estimate prognos-

Период наблюдения за пациентами составил от 3,5 до 7,5 лет (в среднем 5,4±0,1 года). Сердечно-сосудистые осложнения, зарегистрированные у больных ИБС, представлены в табл. 3.

Кумулятивная частота конечной точки, определенной как сумма всех случаев обострения атеротромбоза (фатальных

Table 2. Prevalence of the studied genetic polymorphisms in patients with stable IHD (n=503)

Табл. 2. Частота выявления изученных генетических полиморфизмов у больных стабильной ИБС (n=503)

Polymorphism/Полиморфизм	Possible effects/Возможные эффекты	Rate/Частота встречаемости	
		Total/Всего	hetero/homozygotes/ гетеро/гомозиготы
<b>Blood clotting factors/Факторы свертывания крови</b>			
Leiden Factor V/ Фактор V Лейден (G 1691A)	Factor V resistance to activated protein C/Резистентность фактора V к активированному протеину C [14-15]	18 (3.6)	17 (3.4)/1 (0.2)
Prothrombin gene/ Ген протромбина (G20210A)	Increase in prothrombin expression, rise of prothrombin serum level/Повышение экспрессии протромбина, увеличение содержания протромбина в крови [16]	12 (2.4)	12 (2.4)/–
Gene of fibrinogen $\beta$ -chain/ Ген $\beta$ -цепи фибриногена (455 G>A)	Increase in fibrinogen expression, rise of fibrinogen serum level/Повышение экспрессии фибриногена, увеличение содержания фибриногена в крови [17, 18]	218 (43.4)	184 (36.6)/34 (6.8)
<b>Fibrinogen platelet receptor/Тромбоцитарный рецептор фибриногена</b>			
GP1IIa (C1565T)	Increase in sensibility to aggregation inducers/Увеличение чувствительности к индукторам агрегации [19, 20]	158 (31.4)	132 (26.2)/26 (5.2)
<b>Enzymes involved in homocysteine metabolism/Ферменты, участвующие в обмене гомоцистеина [21-30]</b>			
MTHFR (C667 T)	Decrease in enzyme activity due to increase in thermolability, [homocysteine] $\uparrow$ / Снижение ферментативной активности за счет большей термолабильности, $\uparrow$ [гомоцистеина]	255 (50.8)	213 (42.4)/42 (8.4)
MTHFR (A1298C)	Decrease in enzyme activity (?), homocysteine level – (?)/ Снижение ферментативной активности (?), уровень гомоцистеина – (?)	275 (54.7)	213 (42.4)/62 (12.3)
MTR (A2756G)	Decrease in enzyme activity (?)/ Снижение ферментативной активности (?)	267 (53.1)	182 (36.2)/85 (16.9)
MTRR (A66G)	Decrease in affinity to MTR, homocysteine level – (?)/ Снижение афинности к MTR, уровень гомоцистеина – (?)	302 (60.1)	188 (37.4)/114 (22.7)
TCN (C776G)	Decrease in TCN affinity to vitamin B <sub>12</sub> , lowering of B <sub>12</sub> bioavailability/Снижение афинности TCN к витамину B <sub>12</sub> , уменьшение биодоступности B <sub>12</sub>	309 (61.9)	212 (42.6)/97 (19.3)
Data are shown as n (%) / Данные представлены в виде n (%)			

tic indices. Independent clinical predictors of CVC were defined. These were: angina pectoris of functional class II-III and previous myocardial infarction, three main coronary arteries or the left coronary artery trunk lesion, and concomitant atherothrombosis in cerebral and peripheral vascular systems. Moreover, such factors as high body mass (body mass index (BMI)  $\geq 31.6$  kg/m<sup>2</sup>), renal function impairment (creatinine clearance  $< 67$  ml/min), and erosive gastritis in anamnesis revealed independent influence on prognosis.

We used two models to evaluate influence of genotype on prognosis: dominant (at least one variant allele in comparison with normal homozygote) and recessive (a variant homozygote in comparison with at least one normal allele).

Leiden mutation, which is traditionally associated with venous thrombosis, had no significant impact on incidence of unfavorable cardiovascular outcomes. Probably, its low prevalence (especially in homozygous variant) in studied population of patients with stable IHD

и нефатальных), составила 21,1%. Частота комбинированной точки, объединившей случаи обострения атеротромбоза и реваскуляризации пораженного сосудистого бассейна, составила 31%.

Для моделирования выживаемости и определения показателей, значимых в отношении развития обострения атеротромбоза и потребности в процедурах реваскуляризации, использовалась регрессионная модель пропорционального риска Кокса. Были определены независимые клинические предикторы развития ССО. Ими оказались наличие стенокардии II–III функционального класса и постинфарктного кардиосклероза, поражение трех основных коронарных артерий либо ствола левой коронарной артерии, сопутствующие проявления атеротромбоза в церебральном и периферическом сосудистых бассейнах. Кроме того, независимым влиянием на прогноз обладали такие факторы, как высокая масса тела (индекс массы тела (ИМТ)  $\geq 31,6$  кг/м<sup>2</sup>), нарушение функции почек (клиренс креатинина  $< 67$  мл/мин) и анамнез эрозивного гастрита.

**Table 3. Cardiovascular complications in patients with stable IHD according to the prospective follow-up data (n=503)**

**Табл. 3. Сердечно-сосудистые осложнения у больных стабильной ИБС, по данным проспективного наблюдения (n=503)**

Cardiovascular complications / Сердечно-сосудистые осложнения	n
Cardiovascular death/Сердечно-сосудистая смерть	25
• Sudden death/Внезапная смерть	19
• Fatal myocardial infarction/Фатальный инфаркт миокарда	6
Nonfatal atherothrombotic complications / Нефатальные атеротромботические осложнения	81
• Myocardial infarction/Инфаркт миокарда	18
• Unstable angina pectoris/Нестабильная стенокардия	37
• Ischemic stroke/Ишемический инсульт	10
• Transient ischemic attack/Транзиторная ишемическая атака	14
• Peripheral arteries thrombosis/Тромбоз периферических артерий	2
Cardiovascular death /ACS /IS /TIA /peripheral thrombosis/ Сердечно-сосудистая смерть/ОКС/ИИ/ТИА/ периферический тромбоз	106 (21.1%)
Revascularization of the main vascular systems / Реваскуляризация основных сосудистых бассейнов	60
• Percutaneous coronary intervention/Чрескожное коронарное вмешательство	29
• Coronary bypass/Коронарное шунтирование	19
• Carotid endarterectomy/Каротидная эндартерэктомия	10
• Lower limbs arteries bypass/Шунтирование артерий нижних конечностей	2
Cardiovascular death /ACS /IS /TIA /peripheral thrombosis /necessity of the main vascular systems revascularization/ Сердечно-сосудистая смерть/ОКС/ИИ/ТИА/ периферический тромбоз/потребность в реваскуляризации основных сосудистых бассейнов	156 (31.0%)*

\* Analysis was conducted until first event (secondary events were not taken into account), that is why incidence of the composite endpoint was less than that calculated by simple summing up all CVC  
 \* Анализ проводился до наступления первого события (повторные не учитывались), поэтому частота комбинированной конечной точки была меньше, чем при простом суммировании всех ССО

is the reason for that. Prothrombin gene mutation was also rather rare, however even its heterozygous presence increased CVC risk more than twice (odds ratio (OR) = 2.1, 95% confidence interval (CI) 0.9-4.8).

Of all studied genetic indices polymorphism MTHFR C677T turned out to be the most important one for CVC development (Table 4). Carriage of at least one variant allele MTHFR C667 T increased cardiovascular risk by 60%, and carriage of two such alleles - by 80% (see "dominant" and "recessive" models respectively). Carriage of "wild" genotype turned out to be prognostically unfavorable for two other genes, products of which participate in the homocysteine remethylation cycle (MTHFR A1298C and TCN C776G). On the con-

Влияние генотипа на прогноз оценивалось в виде двух моделей: доминантной (наличие хотя бы одного вариантного аллеля по сравнению с нормальной гомозиготой) и рецессивной (вариантная гомозигота по сравнению с наличием хотя бы одного нормального аллеля).

Носительство мутации Лейден, которую традиционно принято ассоциировать с тромбозами, не оказывало существенного влияния на частоту неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов. Это связано, вероятнее всего, с ее малой распространенностью (особенно в гомозиготном варианте) в изучаемой популяции больных со стабильной ИБС. Мутация в гене протромбина также встречалась достаточно редко, однако даже гетерозиготное ее носительство было сопряжено с более чем двукратным увеличением риска развития ССО (относительный риск (ОР) = 2,1, 95% доверительный интервал (ДИ) 0,9–4,8).

Из всех изученных генетических показателей наиболее важным в отношении развития ССО оказался полиморфизм MTHFR C667 T (табл. 4). Риск развития сосудистых событий достоверно повышался на 60% в случае носительства хотя бы одной, и на 80% в случае носительства двух вариантных аллелей MTHFR C667 T (см., соответственно, «доминантную» и «рецессивную» модели). Для двух других генов, продукты которых участвуют в цикле реметилирования гомоцистеина (MTHFR A1298C и TCN C776G), прогностически неблагоприятным оказалось носительство «дикого» генотипа. Гетеро- и гомозиготное носительство полиморфных аллелей, напротив, ассоциировалось со снижением риска развития ССО в среднем на 30%.

Как указано выше, ФК и кобаламин являются основными кофакторами метаболизма гомоцистеина. Учитывая возможное влияние дефицита ФК и кобаламина на эффекты генотипа, было изучено содержание этих витаминов в крови у всех больных (рис. 2).

Средний уровень ФК в обследованной группе больных составил 7,59±0,15 нг/мл, что превышало принятый уровень верхней границы нормы (7,2 нг/мл). Однако при более детальном анализе оказалось, что свыше половины пациентов имели дефицит этого витамина (рис. 2). В отличие от ФК ситуация с витамином В<sub>12</sub> была более благоприятной. Его средний уровень составил 393,1±188,9 пг/мл (диапазон нормальных значений от 200 до 1000 пг/мл). Дефицит В<sub>12</sub> был отмечен только у 36 (7,2%) пациентов. Следует подчеркнуть, что снижение уровней ФК и кобаламина во всех случаях было латентным, т.е. ни у одного из больных не было клинических признаков гиповитаминоза, а также симптомов заболеваний, которые потенциально могли к нему привести.

Из всех изученных клинических факторов наиболее значимым в отношении развития дефицита фолата оказался пол больных. Содержание ФК было снижено преимущественно у мужчин, тогда как у женщин оно было нормальным: 6,9±0,2 нг/мл против 8,3±0,3 нг/мл



Table 4. Cardiovascular complications\* development depending on carriage of polymorphic alleles of the studied genes  
Табл. 4. Развитие сердечно-сосудистых осложнений\* в зависимости от носительства полиморфных аллелей изученных генов

Polymorphism/ Полиморфизм	Cardiovascular complications* rate (%)/ Частота сердечно-сосудистых осложнений* (%)			Odds ratio (CI 95%); p/ Относительный риск (95% ДИ); p	
	"Wild" genotype/ «Дикий» тип	Heterozygote/ Гетерозиготы	Homozygote/ Гомозиготы	"Dominant" model/ «Доминантная» модель	"Recessive" model/ «Рецессивная» модель
Leiden Factor V/ Фактор V Лейден (G 1691A)	30.5	29.4	100 (one patient)/ (один больной)	1.0 (0.4-2.2); 0.9	8.5 (1.2-62.1); 0.03
Prothrombin gene/ Ген протромбина (G20210A)	30.4	50.0	-	2.1 (0.9-4.8); 0.07	-
Gene of fibrinogen $\beta$ -chain/ Ген $\beta$ -цепи фибриногена (455 G>A)	31.1	29.9	32.4	1.0 (0.7-1.4); 0.9	0.95 (0.5-1.8); 0.9
GP1IIa (C1565T)	32.1	27.3	26.9	0.8 (0.6-1.2); 0.2	0.7 (0.3-1.5); 0.3
MTHFR (C667 T)	24.3	35.2	55.6	1.6 (1.2-2.3); 0.003	1.8 (1.1-2.9); 0.02
MTHFR (A1298C)	35.2	27.7	24.2	0.7 (0.5-0.9); 0.02	0.8 (0.4-1.3); 0.3
MTR (A2756G)	34.7	29.7	21.2	0.9 (0.7-1.2); 0.5	0.8 (0.5-1.3); 0.6
MTRR (A66G)	25.5	30.3	40.4	1.1 (0.8-1.6); 0.6	1.3 (0.9-1.9); 0.2
TCN (C776G)	36.5	29.3	22.7	0.7 (0.5-1.0); 0.05	0.7 (0.4-1.3); 0.1

\* Cardiovascular death, ACS, IS/TIA, necessity of the main vascular systems revascularization. Results of the one-factor analysis are presented. Calculations are performed with adjustment for sex and age. CI – confidential interval.  
The "dominant" model assumed comparison of homozygous carriers of a "wild" genotype with carriers of at least one polymorphic allele. The "recessive" model assumed comparison of homozygous carriers of polymorphic alleles with carriers of at least one allele of a "wild" genotype.  
\* Осложнения: сосудистая смерть, ОКС, ИИ/ТИА, потребность в реваскуляризации пораженных сосудистых бассейнов. Представлены результаты однофакторного анализа. Расчеты выполнены с учетом поправки на пол и возраст. ДИ – доверительный интервал.  
«Доминантная» модель предполагала сравнение гомозиготных носителей «дикого» генотипа с носителями хотя бы одной полиморфной аллели. «Рецессивная» модель предполагала сравнение гомозиготных носителей полиморфных аллелей с носителями хотя бы одной аллели «дикого» генотипа.

trary, hetero- and homozygous carriage of polymorphic alleles associated with reduction in cardiovascular risk by 30% on average.

As it was mentioned above folate and cobalamin are the main cofactors of homocysteine metabolism. Considering possible influence of folate and cobalamin deficiency on genotype effects, we examined plasma concentration of these vitamins in all patients (Fig. 2).

The mean folate level in the studied group made up  $7.59 \pm 0.15$  ng/ml, which exceeded the accepted upper limit of the normal range (7.2 ng/ml). However, more detailed analysis revealed deficiency of this vitamin in more than a half of the patients (Fig. 2). Situation with vitamin B12 was more favorable. Its mean concentration was  $393.1 \pm 188.9$  pg/ml (the normal range is 200-1000 pg/ml). Only 36 (7.2%) patients had B<sub>12</sub>-deficiency. We should highlight that decrease in folate and cobalamin levels was latent in all cases – none of the patients demonstrated clinical findings of vitamin deficiency or any symptoms of diseases that can lead to hypovitaminosis.

Gender was the most significant clinical factor that influenced folate deficiency development. Low folate level was found predominantly in men, while in women it was within the normal range:  $6.9 \pm 0.2$  ng/ml

( $p=0,0001$ ). Еще одним фактором, ассоциировавшимся с дефицитом фолата, являлся социальный статус больных. Так, у лиц с высшим образованием уровень ФК составил  $7,9 \pm 0,2$  нг/мл в сравнении с  $7,3 \pm 0,3$  нг/мл у лиц, имевших лишь среднее или среднее специальное образование ( $p=0,05$ ). Достоверно более низким был уровень фолата у инвалидов/безработных в сравнении с лицами трудоспособного возраста, имевшими постоянную работу:  $7,1 \pm 0,4$  нг/мл против  $8,1 \pm 0,2$  нг/мл ( $p=0,01$ ). Кроме того, обнаружена тенденция к более низкому уровню ФК у больных со сниженным клиренсом креатинина в сравнении с теми, у кого функция почек была нормальной:  $7,2 \pm 0,5$  нг/мл против  $7,9 \pm 0,4$  нг/мл ( $p=0,07$ ).

В нашем исследовании учитывался также факт регулярного (не менее 1 года) приема больными поливитаминных препаратов, содержащих физиологические дозы ФК и кобаламина, который был начат уже после включения в исследование. Таких больных было 97 человек. При дальнейшем анализе дефицитом витаминов считался исходно низкий их уровень при отсутствии регулярной заместительной медикаментозной терапии. Таким образом, в соответствии с нашими критериями, дефицитными по ФК оказались 217 больных (43,1%), а по кобаламину – всего 28 больных (5,6%).

Больные с дефицитом ФК имели худший прогноз по сравнению с теми, кто имел исходно нормальный ее уро-

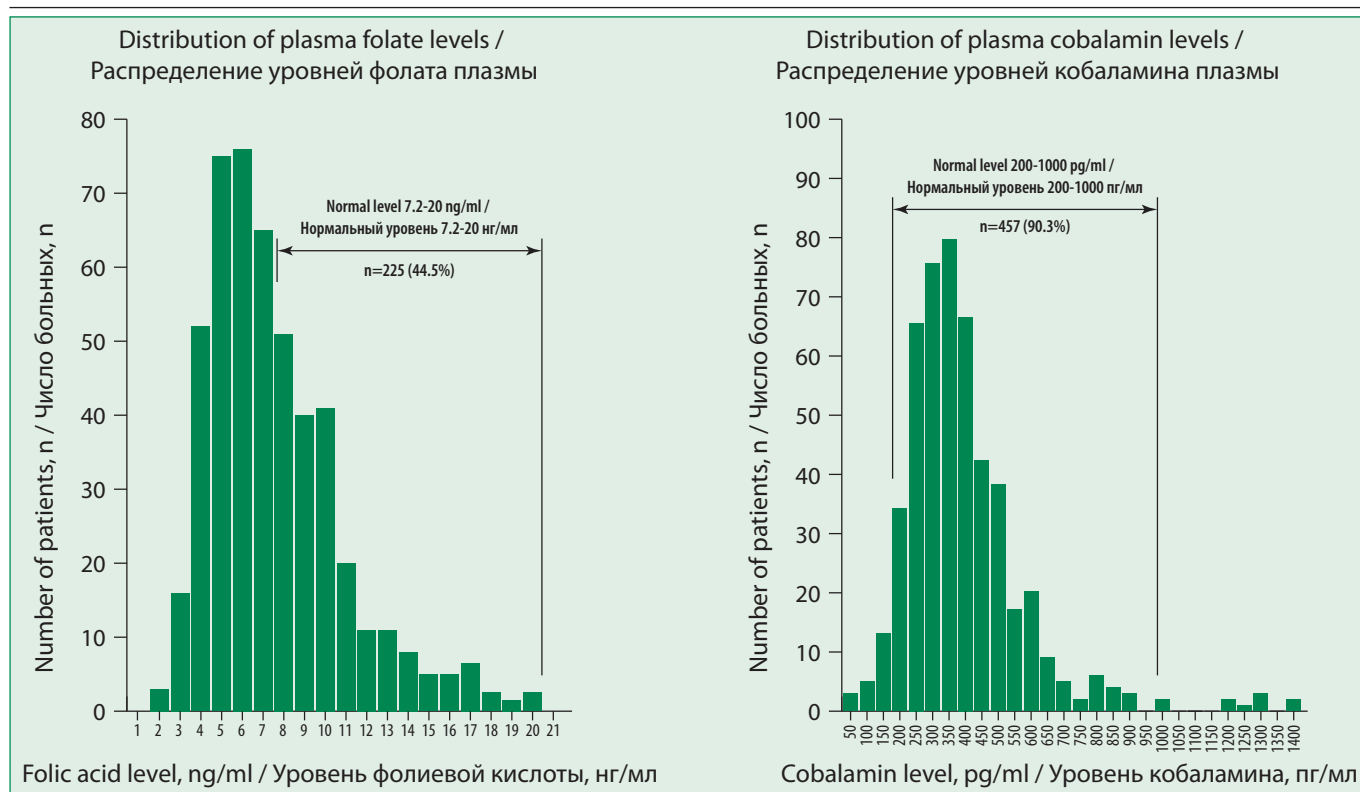


Figure 2. Folic acid and cobalamin levels in the examined patients

Рис. 2. Уровни фолиевой кислоты и кобаламина у обследованных больных

vs  $8.3 \pm 0.3$  ng/ml ( $p=0.0001$ ). Patient's social status was also associated with folate deficiency. Patients with higher education had folate level  $7.9 \pm 0.2$  ng/ml compared with  $7.3 \pm 0.3$  ng/ml in patients with secondary or specialized secondary education ( $p=0.05$ ). Disabled and unemployed patients had significantly lower folate level compared with patients of working age who were permanently employed:  $7.1 \pm 0.4$  ng/ml vs  $8.1 \pm 0.2$  ng/ml ( $p=0.01$ ). Moreover, a tendency towards low folate level was revealed in patients with decreased creatinine clearance in comparison with patients with normal renal function:  $7.2 \pm 0.5$  ng/ml vs  $7.9 \pm 0.4$  ng/ml ( $p=0.07$ ).

We also took into account regular (not less than 1 year) intake of multivitamins containing physiological doses of folic acid and cobalamin which was started after the beginning of the study. There were 97 such patients in our study. Further analysis envisaged that initially low levels of these vitamins with no regular drug replacement therapy were regarded as vitamin deficiency. So, according to these criteria 217 patients (43.1%) had folate-deficiency and only 28 (5.6%) patients – cobalamin-deficiency.

Prognosis of patients with folate deficiency was worse compared with those who initially had normal folate level or received regular vitamin treatment. Incidence of atherothrombosis exacerbation (death, ACS, IS/TIA) made up 17.5% vs 25.8% in the compared groups ( $p=0.02$ ), and summarized rate of all CVC

was 8.3% vs 11.5% ( $p=0.0001$ ). Frequency of atherothrombosis exacerbation (death, ACS, IS/TIA) in compared groups was 17.5% vs 25.8% ( $p=0.02$ ), and summarized rate of all CVC – 26.2% vs 37.3% ( $p=0.008$ ). When analyzing the population as a whole, prognostic significance of folate deficiency was completely leveled in the Cox model (OR=1.1; 95% CI=1.8–1.5;  $p=0.5$ ), which is fully explainable, taking into account the strong link of the indicated indicator with sex and clinical risk factors (see above). It should be noted that for men, folate deficiency retained a borderline significance even in the multifactorial risk model: OR=1.4; 95% CI=0.95–2.0;  $p=0.08$ .

Folate deficiency, which was encountered sufficiently rarely, was not significantly associated with the development of vascular events. The frequency of CVC in groups of patients with normal and with a lower level of this vitamin was 31.4% and 25% ( $p=0.4$ ).

It turned out that the prognostic significance of polymorphisms of MTHFR in a significant degree was determined by the level of folate, which is the main cofactor of this enzyme. As shown in Fig. 3, the presence of one or two variant alleles of MTHFR C667 T was associated with a higher frequency of CVC. However, at a normal level of folate, the increase in the risk of unfavorable outcomes did not reach the criteria of statistical significance, therefore, for further statistical analysis all patients without folate deficiency were combined into one reference group. In the conditions of the simultaneous deficiency

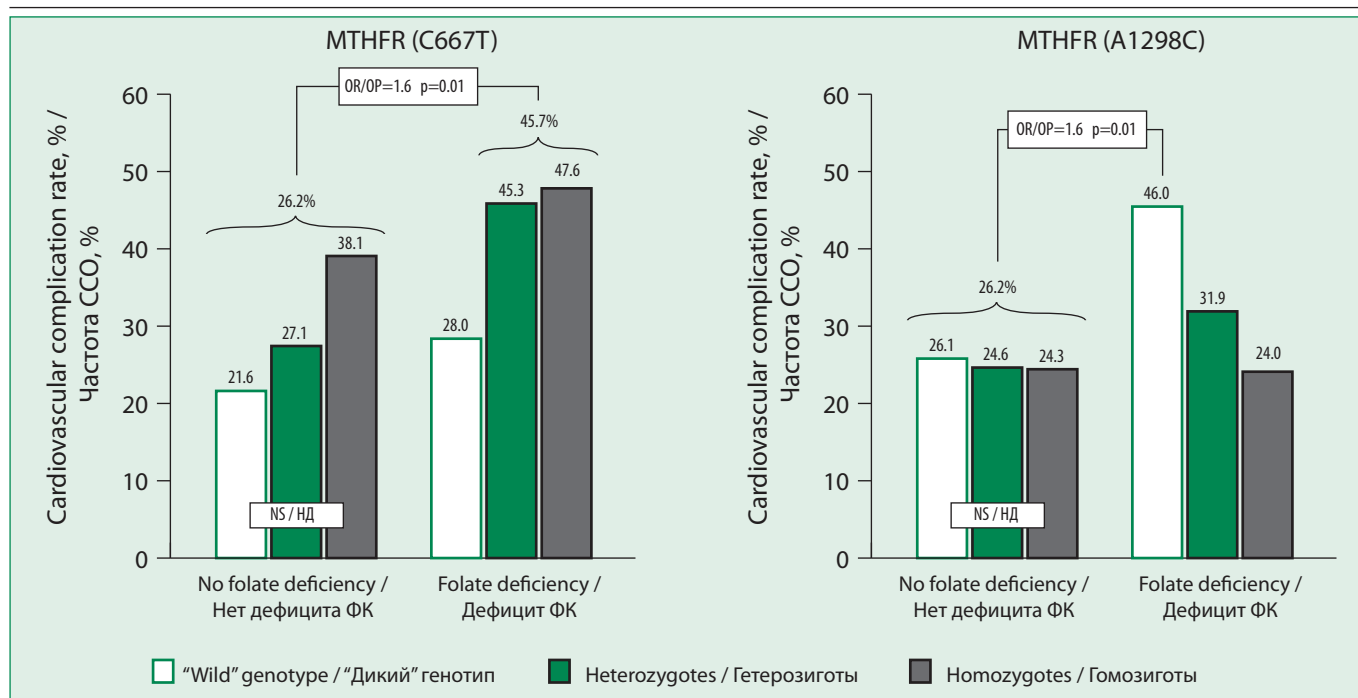


Figure 3. Cardiovascular complications (death, ACS, IS/TIA, necessity revascularization of the impaired vascular system) rate depending on the estimated genetic factors and folate level in patients with stable IHD

Рис. 3. Частота сердечно-сосудистых осложнений (смерть, ОКС, ИИ/ТИА, потребность в ревазуляризации пораженного сосудистого бассейна) в зависимости от изучаемых генетических факторов и уровня фолата у больных стабильной ИБС

was 26.2% vs 37.3% ( $p=0.008$ ). Prognostic value of folate deficiency was almost completely leveled in the Cox model ( $OR=1.1$ ; 95%  $CI=1.8-1.5$ ;  $p=0.5$ ) when making analysis of the whole population. This can be explained by strong correlation of this index with gender and clinical risk factors. We should note that folate deficiency in men preserved marginal significance even in the multifactor risk model:  $OR=1.4$ ; 95%  $CI=0.95-2.0$ ;  $p=0.08$ .

Cobalamin deficiency, which was found rather seldom, did not demonstrate significant correlation with cardiovascular events. CVC in patients with normal and reduced level of this vitamin developed in 31.4% and 25% of cases respectively ( $p=0.4\%$ ).

It turned out that prognostic value of MTHFR polymorphisms was to a great degree determined by folate level which was the main cofactor of this enzyme. As Figure 3 shows carriage of one or two MTHFR 667 T variant alleles was associated with higher rate of CVC. However normal folate concentration did not significantly increase cardiovascular risk. That is why all patients without folate deficiency were united into the separate reference group for further statistical analysis. Prognostic significance of MTHFR C667 T polymorphism was considerably higher with concomitant folate deficiency: odds ratio with allowance for gender and age made up 1.6 (95%  $CI 1.1-2.2$ ;  $p=0.02$ ) for patients with at least one variant allele compared with the ref-

та ФК прогностическая значимость полиморфизма MTHFR C667 T существенно возрастала: при сравнении с референсной группой относительный риск ССО для носителей хотя бы одной вариантной аллели, определенный с поправкой на пол и возраст, составил 1,6 (95% ДИ 1,1–2,2;  $p=0,02$ ).

Носительство аллелей «дикого» генотипа MTHFR 1298 AA не оказывало какого бы то ни было негативного влияния на исходы у больных с нормальным уровнем ФК. В условиях сопутствующего дефицита фолата относительный риск ССО у гомозигот дикого типа MTHFR 1298 AA достоверно повышался до 1,6 (95% ДИ 1,1–2,3;  $p=0,02$ ).

Для полиморфизма TCN C776G достоверных ассоциаций между уровнем ФК и прогнозом больных обнаружено не было.

Значимость тестируемых генетических показателей сохранялась и при многофакторном анализе, в который были включены клинические признаки, исходно продемонстрировавшие свое влияние на прогноз (табл. 5).

## Обсуждение

Врожденные нарушения системы гемостаза, ассоциированные с тромбозами, стали предметом активного изучения с середины прошлого столетия. Так, в 1965 году был описан врожденный дефицит антитромбина III [31], а два десятилетия спустя охарактеризованы врожденные дефекты других компонентов противосвертывающей системы – протеинов C [32] и S [33-35]. Следует, однако, отметить, что эти состояния

Table 5. Clinical and genetic predictors of cardiovascular complications in patients with stable IHD

Табл. 5. Клинические и генетические предикторы сердечно-сосудистых осложнений у больных стабильной ИБС

Index/Показатель	OR/OP	CI 95%/ДИ 95%	p
Sum of clinical risk factors*/Сумма клинических факторов риска*			
• 3 risk factors/3 фактора риска	1.9	1.3 – 2.9	<0.001
• 4 risk factors/4 фактора риска	3.1	1.9 – 4.9	<0.001
• 5 risk factors/5 факторов риска	3.2	1.5 – 6.6	0.001
• 6 risk factors/6 факторов риска	5.3	1.9 – 15.2	0.001
Prothrombin gene/Ген протромбина (G20210A)			
• one polymorphic allele/одна полиморфная аллель	1.54	0.7 – 3.5	0.3
MTHFR (C677T) + folate deficiency/дефицит фолата			
• at least one polymorphic allele/хотя бы одна полиморфная аллель	1.64	1.2 – 2.3	0.003
MTHFR (A1298C) + folate deficiency/дефицит фолата			
• wild genotype (homozygote)/дикий генотип (гомозигота)	1.63	1.2 – 2.3	0.006
TCN (C776G)			
• wild genotype (homozygote)/дикий генотип (гомозигота)	1.37	1.001 – 1.89	0.04
* Risk factors: angina pectoris of FC II-III and previous myocardial infarction, impairment of three main coronary arteries or of the left coronary artery trunk, concomitant manifestation of atherothrombosis in cerebral and peripheral vascular systems, high body mass (BMI $\geq$ 31.6 kg/m <sup>2</sup> ), renal function impairment (creatinine clearance <67 ml/min), and erosive gastritis in anamnesis. OR – odds ratio; CI – confidential interval			
* Факторы риска: наличие стенокардии II–III функционального класса и постинфарктного кардиосклероза, поражение трех основных коронарных артерий либо ствола левой коронарной артерии, сопутствующие проявления атеротромбоза в церебральном и периферическом сосудистых бассейнах, высокая масса тела (ИМТ $\geq$ 31,6 кг/м <sup>2</sup> ), нарушение функции почек (клиренс креатинина <67 мл/мин), анамнез эрозивного гастрита. ОР – относительный риск; ДИ – доверительный интервал			

erence group.

Carriage of “wild” genotype alleles MTHFR 1298 AA had no negative influence on outcomes in patients with normal folate level. Concomitant folate deficiency significantly increased relative risk of CVC in homozygotes of “wild” type MTHFR 1298 AA to 1.6 (95% CI 1.1 – 2.3; p=0.02).

TCN C776G polymorphism did not demonstrate significant correlation between folate level and prognosis of patients.

Tested genetic indices were also significant in multifactor analysis which included clinical signs that initially had demonstrated prognostic value (Table 5).

## Discussion

Hereditary disorders of hemostatic system associated with thrombosis have been actively studied since the middle of the last century. Congenital antithrombin III deficiency was described in 1965 [31], and congenital defects of other anticoagulative system components – proteins C [32] and S [33-35] were characterized twenty years later. However these deficiencies are rather rare (for example, incidence of antithrombin III deficiency does not exceed 0.2%), so, they can not be a reason for majority of thrombotic cases with genetic etiology.

Enhancement of molecular-genetic testing allowed to identify thrombosis associated locus mutations in genes encoding key proteins of hemostatic system. In 1994 it was proved that the only mutation in the 10th exon of clotting Factor V gene is the main reason of Factor Va resistance to activated protein C

встречаются редко (распространенность дефицита анти-тромбина III, например, не превышает 0,2%) и поэтому не могут быть ответственными за большинство случаев тромбозов, имеющих наследственную природу.

Совершенствование методов молекулярно-генетического исследования позволило идентифицировать ассоциированные с тромбозами локусные повреждения генов, кодирующих ряд ключевых белков системы гемостаза. Сравнительно недавно, в 1994 г., было установлено, что единственная мутация в 10-м экзоне гена фактора V свертывания крови является основной причиной устойчивости фактора Va к активированному протеину C (APC) [14, 15]. В результате этой мутации, названной мутацией Лейден, происходит замена G→A в положении 1691 вышеупомянутого гена, что в свою очередь приводит к замещению Arg-506→Gln в полипептидной цепи фактора V. При этом полипептид утрачивает один из сайтов расщепления APC, что приводит к формированию фенотипа APC-резистентности, сопровождаемого повышенной свертываемостью крови. Двумя годами позже (1996 г.) была описана еще одна мутация, ассоциированная со склонностью к тромбообразованию [16]. Это мутация G20210A в гене протромбина, которая локализована в 3'-концевой некодирующей части гена. Мутация не вызывает изменения структуры молекулы протромбина, но приводит к повышению его уровня в плазме крови.

Хорошо известно, что носительство мутации Лейден и полиморфизма гена протромбина сопровождается увеличением риска венозных тромбозов и эмболий не менее чем в 3–5 раз [4-7, 36]. В отличие от общей популяции частота встречаемости указанных мутаций в когортах больных с венозными тромбозами и эмболиями может достигать 20–60% [37-39], что делает обоснованным проведение у

(APC) [14,15]. This mutation (called Leiden mutation) results in G→A exchange in site 1691 of the above mentioned gene, which in turn leads to Arg-506→Gln replacement in Factor V polypeptide chain. At that polypeptide loses one of the sites of APC cleavage, which results in APC-resistant phenotype formation with increased blood clotting. Two years later (1996) another mutation associated with disposition to thrombosis was described [16]. It was G20210A mutation in the prothrombin gene, which is located in 3'-end noncoding region of gene. The mutation causes no changes in molecular structure of prothrombin, but increases its plasma level.

It is well known that carriage of Leiden mutation and prothrombin gene polymorphism increases risk of venous thrombosis and embolism not less than 3-5 times [4-7, 36]. Prevalence of these mutations in patients with venous thrombosis and embolism can reach 20-60% [37-39], which justifies genetic testing of such patients in order to detect thrombophilia. On the contrary, risk of atherothrombotic events associated with Leiden mutation and mutation in the prothrombin gene is considered relatively low. According to data of meta-analyses of "case-control" population studies it makes up about 20% [8-11]. According to contemporary guidelines, it is not recommended to use genetic analysis (including detection of prothrombotic mutations) in initially healthy people to estimate atherothrombosis risk [40].

Total amount of prothrombotic mutations in the examined group of patients did not exceed 6%, which was in line with data of other research works, that studied population of the European region [41,42]. However, we revealed rather high CVC risk associated with at least one of these mutations – mutation in prothrombin gene. Unlike population studies our study included IHD patients with high frequency of risk factors and previous acute thrombotic episodes. We can suppose that prothrombotic mutations in regard to CVC development are more significant in patients with high risk caused by activation of blood clotting in vessels affected by atherosclerosis than in population on average. We should also note that in some regions (such as Middle East, Cyprus, south of Sweden and some others) hereditary thrombophilias occur 2-3 times more often than in Russia [41,42]. Consequently, genotype studies are more important for residents of those regions with different manifestations of atherothrombosis.

Detection of genome changes associated with atherothrombosis development traditionally includes analysis of polymorphisms in genes that control homocysteine metabolism. The following enzymes play the key role in this process: MTHFR, MTR, MTRR, and TCN II [12,13,21-30].

таких пациентов генетического исследования, направленного на поиск тромбофилий. Риск развития атеротромботических событий, ассоциированный с мутациями Лейден и в гене протромбина, напротив, считается относительно невысоким. Так, по данным мета-анализов популяционных исследований типа случай-контроль, он составляет около 20% [8-11]. В соответствии с существующими рекомендациями, изучение генотипа (в т.ч. и протромботических мутаций) для оценки риска атеротромбоза у исходно здоровых лиц не рекомендуется [40].

В изучаемой когорте больных суммарная частота носительства протромботических мутаций не превышала 6% (что в целом соответствовало данным, полученным другими исследователями при анализе населения европейского региона) [41, 42]. Тем не менее, нам удалось продемонстрировать достаточно высокий риск развития ССО, ассоциированный, по крайней мере, с одной из них – в гене протромбина. Напомним, что в отличие от популяционных исследований в нашу работу включались больные с ИБС, характеризовавшиеся высокой частотой ФР и перенесенными острыми тромботическими эпизодами. Можно предположить, что в условиях высокого риска, обусловленного активацией свертывания крови в атеросклеротически измененных сосудах, значимость протромботических мутаций в отношении развития ССО оказывается выше, чем в среднем в популяции. Обсуждая проблему врожденных тромбофилий уместно также напомнить, что в некоторых регионах (например, на Ближнем Востоке, на Кипре, на юге Швеции и др.) их носительство встречается в 2-3 раза чаще, чем в РФ [41, 42]. Соответственно, изучение генотипа для проживающих там лиц с различными проявлениями атеротромбоза представляется более актуальным.

Поиск генетических ассоциаций с развитием атеротромбоза традиционно включает анализ полиморфизмов генов, контролирующих обмен гомоцистеина. Как уже упоминалось (рис. 1), в метаболизме гомоцистеина ключевую роль играют следующие ферменты: MTHFR, MTR, MTRR, а также TCN II [12, 13, 21-30].

По данным литературы, наиболее значимым в отношении прогноза ССО считается полиморфизм гена MTHFR C667T. При анализе различных популяций больных было продемонстрировано увеличение риска развития таких событий, как сосудистая смерть, инфаркт миокарда, инсульт и потребность в реваскуляризации миокарда, ассоциирующееся с носительством полиморфного генотипа MTHFR C667T [42-49]. Как и в нашей работе, наиболее неблагоприятным являлось гомозиготное носительство двух полиморфных аллелей (генотип MTHFR 667 TT). Что касается других изученных полиморфизмов, то полученные нами результаты, свидетельствующие о взаимосвязи ишемических событий с носительством «дикого» генотипа по локусу MTHFR 1298 AA, в целом совпадают с данными литературы [50]. Достоверных данных о влиянии на прогноз для генотипа TCN в доступной литературе найдено не было.

According to published data polymorphism of C667T in MTHFR gene is most significant in regard to CVC prognosis. Analysis of different populations of patients showed that carriage of MTHFR C667 T polymorphic genotype associates with increased risk of such events as: vascular death, myocardial infarction, stroke, and necessity for myocardial revascularization [42-49]. Homozygous carriage of two polymorphic alleles was proved to be most unfavorable (MTHFR 667 TT genotype). Our studies of other polymorphisms revealed correlation between ischemic events and carriage of the "wild" genotype in locus MTHFR 1298 AA, which is in line with other published data [50]. We did not find any reliable data about TCN genotype prognostic influence in available references.

Prognostic associations of the discussed polymorphisms are traditionally considered in context of "homocysteine hypothesis" of atherosclerosis. Indeed, carriage of a number of polymorphisms, in the first place – MTHFR C667T, is associated with moderate hyperhomocysteinemia [51,52]. These data were first obtained about 20 years ago, and since then have been repeatedly confirmed in studies in various populations and groups of patients, including our examination of patients with stable IHD [53].

Recently attitude to homocysteine as to a cardiovascular risk factor has changed significantly. Increased level of homocysteine is considered now primarily as a marker of atherothrombotic process severity but not as a risk factor [54-58]. Due to the "crash" of the homocysteine hypothesis many researchers now deny a prognostic role of polymorphisms in genes responsible for its metabolism. However, it would be wrong to consider effects of the discussed genes only in regard to homocysteine level. Proteins encoded by these genes are involved in the so-called metabolism of one-carbon fragments, including methylation. S-adenosylmethionine, which transforms into S-adenosylhomocysteine, is a donor of the methyl group – see Fig. 1. It is important to note that methylation plays the key role in DNA replication. Thereafter, genetically-dependent abnormalities in DNA synthesis can result in various unfavorable effects which include dysregulation of proliferative processes and cell apoptosis. In particular, many research works show that carriage of polymorphisms in the MTRR, MTHFR and TCN genes associates with increased risk of different oncologic diseases and of congenital defects of development in children [59,60]. Perhaps, it is DNA hypomethylation but not hyperhomocysteinemia that determines unfavorable cardiovascular effects in patients with the studied polymorphisms.

We demonstrated that genetic polymorphisms of remethylation cycle can influence outcomes mainly if

Прогностические ассоциации для обсуждаемых полиморфизмов традиционно принято рассматривать в контексте «гомоцистеиновой гипотезы» атеросклероза. Действительно, носительство ряда полиморфизмов, и в первую очередь MTHFR C667T, ассоциируется с умеренной гипергомоцистеинемией [51, 52]. Эти данные впервые были получены около 20 лет назад и с тех пор неоднократно воспроизводились в различных популяциях и подгруппах пациентов, в том числе и нами при анализе когорты больных стабильной ИБС [53].

В последние годы отношение к гомоцистеину как к сердечно-сосудистому ФР существенно изменилось. Повышенный уровень гомоцистеина стали рассматривать в первую очередь не как ФР, а как маркер тяжести атеротромботического процесса [54-58]. «Крах» гомоцистеиновой гипотезы фактически привел к отрицанию многими исследователями прогностической роли полиморфизмов генов, ответственных за его метаболизм. Однако было бы в корне неправильным сводить эффекты обсуждаемых генов исключительно к уровню гомоцистеина. Белки, кодируемые данными генами, принимают участие в так называемом метаболизме одноуглеродных фрагментов, в частности метилировании. Донором метильной группы при этом служит S-аденозилметионин, превращающийся в S-аденозилгомоцистеин (рис. 1). Важно отметить, что метилирование играет ключевую роль в процессах репликации ДНК. Соответственно, генетически-обусловленные нарушения синтеза ДНК могут приводить к разнообразным неблагоприятным последствиям, в том числе к дисрегуляции пролиферативных процессов и апоптозу клеток. В частности, в большом количестве работ показано, что носительство полиморфизмов генов MTRR, MTHFR и TCN ассоциируется с увеличением риска различных онкологических заболеваний, а также врожденных дефектов развития у детей [59,60]. Возможно, именно гипометилирование ДНК (а не гипергомоцистеинемия) лежит в основе неблагоприятных сердечно-сосудистых эффектов у носителей изученных нами полиморфизмов.

Мы показали, что влияние на исходы для генетических полиморфизмов цикла реметилирования реализуется преимущественно в условиях дефицита основного кофактора, которым является ФК. Подобные данные в отношении наиболее значимого полиморфизма MTHFR C667T были получены и другими исследователями. Так, в крупном метаанализе Klerk с соавт. [49] было показано, что носительство полиморфных аллелей данного гена не влияло на прогноз больных с нормальным уровнем ФК, в то время как при низком фолатном статусе риск основных коронарных событий был повышен: на 32% у гетерозиготных носителей и на 44% у гомозиготных носителей аллели 667 T. Следует отметить, что, как и в нашем исследовании, тенденция к повышению ССО была отмечена даже у носителей потенциально благоприятного «дикого» генотипа, имевших сопутствующий дефицит ФК.

deficiency of basic cofactor (folate) is observed. Other researchers obtained similar data concerning the most significant polymorphism - MTHFR C667T. For instance, the large-scale meta-analysis conducted by Klerk and coauthors [49] demonstrated no influence of polymorphic alleles carriage on prognosis in patients with normal folate level, while low folate status increased coronary risk by 32% in 667 T heterozygotes and by 44% in 667 T homozygotes. At that, even patients with the potentially favorable "wild" genotype, but with concomitant folate deficiency, revealed tendency to more frequent CVC, which is in line with our study.

It is well known that folate deficiency associates with CVC risk increase [61-63]. Our study confirmed this fact one more time. At that we should highlight that more than a half of the patients had low folate level with no obvious reasons for that, which defines peculiarity of the studied population in Russia. It is in line with data provided by Institute of Nutrition RAMS. According to these data prevalence of folate deficiency in adult population of the Russian Federation makes up 40-80% [64]. This can be explained by peculiarities of nutrition, which lacks proper products of animal origin and green vegetables, and also by high rate of alcohol abuse. That is why our study showed significantly lower folate concentration in men and patients with low social status.

Many developed countries (for example the USA and Canada) have introduced state programs, which require food products to be enriched with folic acid. This resulted not only in folate deficiency decrease but also in lowering of cardiovascular complications frequency, mainly – of ischemic strokes [65,66]. Considering this fact we could expect that addition of folic acid and some other B group vitamins to the food could be an efficient measure of atherothrombotic events prevention in patients with cardiovascular diseases. Unfortunately, none of the large-scale randomized studies revealed reliable effect of food additives containing these vitamins [67,68]. Negative results can be partly explained by high doses of the vitamins (which significantly exceeded daily requirement) and also by the fact that majority of studies included patients with no initial folate deficiency.

In 2010 the BMJ journal published results of a research, which was supposed to close a discussion about necessity of routine preventive care with vitamins in patients with atherothrombotic anamnesis. The study was carried out only in France, where routine addition of folic acid to food products is not practiced, and that was an advantage of the study. Like in our study, the mean folate level was rather low – 6.7-7.0 ng/ml. Despite initial folate deficiency treatment of patients with this vitamin in doses close to daily requirement did not prevent unfavorable cardiovascular outcomes. So,

Хорошо известно, что дефицит ФК ассоциируется с увеличением риска развития ССО [61-63]. Этот факт был еще раз подтвержден в нашем исследовании. При этом необходимо отметить особенности изученной российской популяции, в которой более половины больных имели низкую концентрацию фолата без явных к тому клинических предпосылок. Такой результат хорошо согласуется с данными Института питания РАМН, согласно которым распространенность дефицита ФК среди взрослого населения РФ составляет 40-80% [64]. Указанный факт может быть связан как с особенностями рациона, характеризующегося недостаточным количеством полноценных продуктов животного происхождения и зеленых овощей, так и с высокой частотой злоупотребления алкоголем. Не удивительно поэтому, что достоверно более низкие показатели ФК отмечались нами у мужчин, а также у больных, имевших низкий социальный статус.

Уместно напомнить, что во многих развитых странах (например, в США и Канаде) действуют государственные программы обогащения продуктов питания ФК, введение которых сопровождалось не только уменьшением частоты встречаемости дефицита этого витамина, но и существенным снижением числа сердечно-сосудистых осложнений, в первую очередь ишемических инсультов [65,66]. Исходя из этих предпосылок можно было бы надеяться на эффективность профилактики атеротромботических событий с помощью добавления в пищу ФК и других витаминов группы В у пациентов, исходно страдающих сосудистой патологией. К сожалению, достоверного эффекта от назначения пищевых добавок, содержащих эти витамины, не было обнаружено ни в одном крупном рандомизированном исследовании [67,68]. В качестве возможных причин отрицательных результатов назывались высокие дозы витаминов (значительно превышающие суточную потребность), а также проведение большинства исследований на популяциях больных, не имевших исходного дефицита фолата.

В 2010 г. в журнале BMJ [69] были опубликованы результаты исследования, которое, по всей видимости, должно было поставить точку в решении вопроса о необходимости рутинной витаминпрофилактики у больных с анамнезом атеротромбоза. Одним из достоинств было проведение испытания только во Франции, где нет практики обязательного добавления ФК в пищу. Как и в нашем исследовании, средний уровень фолата у больных был достаточно низким: 6,7–7,0 нг/мл. Несмотря на наличие исходного дефицита ФК, назначение этого витамина в дозах, близких к суточной потребности, не предотвращало развитие неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов. Таким образом, основные положения нормативных документов по вопросам профилактики атеротромбоза вряд ли претерпят какие-либо изменения. Рутинное назначение витаминов всем пациентам не показано; необходимо рекомендовать пациентам диету, богатую ФК и другими витаминами группы В.

В соответствии с нашими данными можно предполагать, что дефицит фолата не является самостоятельным факто-

main guidelines for atherothrombosis prevention are unlikely to be changed. Routine therapy with vitamins in all patients is not justified. Patients should be recommended a diet rich in folic acid and other B group vitamins.

According to our data folate deficiency can not be regarded as an independent risk factor. Folate level strongly depends on some clinical characteristics (male gender, social ill-being, renal function impairment) which have an independent impact on prognosis. We think that was the reason why routine folate prescription had no expected positive effects in randomized studies. At the same time folate deficiency can significantly enhance negative genetic effects caused by impaired activity of remethylation cycle enzymes (in particular, MTHFR).

None of the previous studies took into account possible genetic impairment of remethylation cycle, while our study demonstrated its significance. Besides, some peculiarities of population of atherothrombotic patients in Russia do not allow to extrapolate international guidelines to it to the full extent. Absence of program for food products enrichment with folic acid, low social status of many patients with insufficient amount of proper products of animal origin in their diet, and alcohol abuse make it doubtful if routine diet measures can have sufficient efficiency.

## Conclusion

Thus, in our study we defined independent CVC predictors in patients with stable IHD. In addition to clinical risk factors such genetic indices as carriage of some genotypes of homocysteine remethylation cycle proteins - TCN 776 CC, MTHFR 667 TT/CT and 1298 AA, had independent influence on prognosis. Influence of the last two genetic polymorphisms manifested provided folate deficiency was concomitant.

We hope that results of our work will promote further research in order to study efficacy of vitamin treatment in atherothrombotic patients with due consideration of such factors as baseline level of main cofactors (vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> and folate) and polymorphisms in genes that control homocysteine metabolism.

ром риска. Уровень ФК сильно зависит от клинических показателей (мужской пол, социальное неблагополучие, нарушение функции почек), обладающих самостоятельным влиянием на прогноз. Нам представляется, что именно поэтому рутинное профилактическое назначение ФК не оказало ожидаемого положительного действия в рандомизированных исследованиях. В то же время, дефицит фолата способен в значительной степени усиливать негативные генетические эффекты, связанные с нарушенной активностью ферментов цикла реметилирования (в частности MTHFR).

Следует, однако, отметить, что ни в одном из исследований не учитывались возможные генетические нарушения цикла реметилирования, значимость которых была продемонстрирована в нашем исследовании. Кроме того, в российской популяции пациентов с атеротромбозом есть ряд особенностей, не позволяющих экстраполировать на нее международные рекомендации в полном объеме. Отсутствие программы фортификации продуктов ФК, низкий социально-экономический статус многих пациентов, приводящий к недостаточному количеству полноценных продуктов животного происхождения в рационе, злоупотребление алкоголем заставляют усомниться в достаточной эффективности стандартных диетических мероприятий.

## Заключение

Таким образом, результаты нашей работы позволили определить независимые предикторы развития ССО у больных со стабильными проявлениями ИБС. Помимо совокупности клинических факторов риска независимым влиянием на прогноз обладали такие генетические показатели, как носительство определенных генотипов белков цикла реметилирования гомоцистеина TCN 776 CC, а также MTHFR C667 TT/CT и 1298 AA. Действие двух последних генетических полиморфизмов проявлялось в условиях сопутствующего дефицита фолиевой кислоты.

Мы надеемся, что данные нашей работы будут способствовать организации исследований, в которых эффективность терапии витаминами у больных атеротромбозом будет изучена с учетом множества факторов, включая исходный уровень основных кофакторов (витаминов B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> и ФК) и полиморфизм генов, контролирующих обмен гомоцистеина.

## References/Литература

1. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Journal of Cardiovascular prevention and Rehabilitation* 2007; 14: E1-40.
2. Lotta LA, Peyvandi F. Addressing the complexity of cardiovascular disease by design. *Lancet* 2011;377:356-358.
3. Iakoubova OA, Tong CH, Rowland CM et al. Association of the Trp719Arg polymorphism in kinesin-like protein 6 with myocardial infarction and coronary heart disease in 2 prospective trials: the CARE and WOSCOPS trials. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(4):435-443.
4. Dahlback B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-614.
5. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999;353:1167-1173.
6. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism: pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls: Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:809-816.
7. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-708.
8. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995;332:912-917.
9. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, et al. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart Study and 2 metaanalyses. *Blood* 2002;100:3-10.



10. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003;146(6):948-957.
11. Ye Z., Liu E., Higgins J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66.155 cases and 91.307 controls. *The Lancet* 2006; 367:651-658.
12. Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4(2):143-150.
13. Di Minno MN, Tremoli E, Coppola A, et al. Homocysteine and arterial thrombosis: Challenge and opportunity. *Thromb Haemost* 2010;103(5):942-961.
14. Dahlback B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1396-1400.
15. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994; 369:64-67.
16. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-3703.
17. Van't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, et al. Two common functional polymorphisms in the promoter region of the  $\alpha_2$ -fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:3063-3070.
18. Brown ET, Fuller GM. Detection of a complex that associates with the B $\alpha$  fibrinogen G-455-A polymorphism. *Blood*. 1998;92:3286-3293.
19. T. Byzova, E. Plow. The PIA2 allele and cardiovascular disease: the pro33 and con. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000;105(6); 697-698.
20. Bennett JS. Structural biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Trends Cardiovasc Med*. 1996;16:31-36.
21. Frosst P, Blom H.J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
22. Laraqui A., Allami A., Carrié A. et al. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol*. 2006;61:51-61.
23. Kerkeni M., Addad F., Chaufert M. et al. Hyperhomocysteinaemia, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of coronary artery disease. *Ann Clin Biochem*. 2006;43:200-206.
24. Huh H.J., Chi H.S., Shim E.H. et al. Gene-nutrition interactions in coronary artery disease: correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population. *Thromb Res*. 2006;117:501-506.
25. Guéant-Rodriguez R.M., Juillié Y., Candito M. et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost*. 2005;94:510-515.
26. Brandalize A.P.C., Bandinelli E., Borba J.B. et al. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:787-791.
27. Doolin M.T., Bardaux S., McDonneli M. et al. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 2002;71:1222-1226.
28. Hubner R.A., Muir K.R., Liu J.F. et al. Folate Metabolism Polymorphisms influence risk of colorectal adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1607-1612.
29. Alessio A.C.M., Höehr N.F., Siqueira L.H. et al. Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G polymorphisms in healthy children. *Thrombosis research* 2007;119:571-577.
30. Namour F., Olivier J.L., Abdelmoutaleb I. et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97:1092-1098.
31. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965;13:516-530.
32. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*. 1981;68:1370-1373.
33. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med*. 1984;311:1525-1528.
34. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest*. 1984;74:2082-2088.
35. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood*. 1984;64:1297-1300.
36. Nicolaidis AN, Breddin HK, Carpenter P, et al. Thrombophilia and venous thromboembolism. International consensus statement. Guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol*. 2005;24(1):1-26.
37. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood*. 1993;82:1989-1993.
38. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H. et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet*. 1993;342:1503-1506.
39. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med*. 1994;330:517-522.
40. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2010 21;122(25):584-636.
41. Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost*. 2007;98:530-542.
42. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995;346:1133-1134.
43. Nakai K., Itoh C., Nakai K. et al. Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *Am J Cardiovasc Drugs* 2001;1:353-361.
44. Kim R.J., Becker R.C. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J*. 2003;146:948-957.
45. Cronin S., Furie K.L., Kelly P.J. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke: evidence from a cumulative meta-analysis. *Stroke* 2005;36:1581-1587.
46. Botto N., Andreassi M.G., Rizza A. et al. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a risk factor of adverse events after coronary revascularization. *Int J Cardiol*. 2004;96:341-345.
47. Kosokabe T., Okumura K., Sone T. et al. Relation of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation and plasma homocysteine with intimal hyperplasia after coronary stenting. *Circulation*. 2001;103:2048-2054.
48. Kölling K., Ndrepepa G., Koch W. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2004 15;93:1201-1206.
49. Klerf M., Verhoef P., Clarke R. et al. MTHFR 677C-T Polymorphism and risk of coronary heart disease. *JAMA*. 2002;288:2023-2031.
50. Mendonça M.I., Dos Reis R.P., Freitas A.I. et al. Gene-gene interaction affects coronary artery disease risk. *Rev Port Cardiol*. 2009;28:397-415.
51. Frosst P, Blom H.J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
52. Albert CM, Cook NR, Gaziano JM et al. Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk of cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA* 2008;299(17):2027-2036.
53. Shahmatova O.O., Komarov A.L., Rebrikov D.V. et al. Factors determining homocysteine level in Russian patients with stable ischemic heart disease. Cardio-vascular therapy and prevention, 2010; 4:49-58. (In Russian). / Шахматова О.О., Комаров А.Л., Ребриков Д.В. и соавт. Факторы, определяющие уровень гомоцистеина, в когорте российских пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца. Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2010; 4:49-58.
54. Durand P., Prost M., Loreau N. et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81:645-672.
55. Guttormsen A.B., Ueland P.M., Svarstad E., Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997;52:495-502.
56. Bostom A., Brosnan J.T., Hall B. et al. Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995;116:59-62.
57. Stehouwer C.D., Gall M.A., Hougaard P. et al. Plasma homocysteine concentration predicts mortality in non-insulin diabetic patients with and without albuminuria. *Kidney Int* 1999;55:308-314.
58. Moat S.J., Doshi S.N., Lang D. et al. Treatment of coronary heart disease with folic acid: Is there a future? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:1-7.
59. Chen K., Song L., Jin M.J. et al. Association between genetic polymorphisms in folate metabolic enzyme genes and colorectal cancer: a nested case-control study. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2006;28:429-432.
60. Hazra A., Wu K., Kraft P. et al. Twenty-four non-synonymous polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway and risk of colorectal adenoma in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis* 2007;28:1510-1519.
61. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 1996;275:1893-1896.
62. Rimm EB, Willett WC, Hu FB. et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998;279:359-364.
63. He K, Merchant A, Rimm EB et al. Folate, vitamin B6, and B12 intakes in relation to risk of stroke among men. *Stroke* 2004;35:169-174.
64. Spirichev V.B. Theoretic and practical items of contemporary vitaminology. *Nutrition questions* 2005;74:32-40. (In Russian). / Спиричев В.Б. Теоретические и практические аспекты современной витаминологии. *Вопросы питания* 2005;74:32-40.
65. Jacques P.F., Selhub J., Bostom A.G. et al. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;34:1449-1454.
66. Rader J.I. Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. *J Nutr* 2002;132:2466-2470.
67. Bazzano L.A., Reynolds K., Holder K.N., He J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006;296:2720-2726.
68. Wald D.S., Wald N.J., Morris J.K., Law M. Folic acid, homocysteine and cardiovascular disease: Judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ* 2006;333:1114-1117.
69. P. Galan, E. Kesse-Guyot, S. Czernichow et al. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. *BMJ* 2010;341:6273-6282.

Received/Поступила 16.05. 2011  
Accepted/Принята в печать 18.05. 2011