

Факторы, определяющие уровень гомоцистеина, в когорте российских пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца

О.О. Шахматова¹, А.Л. Комаров¹, Д.В. Ребриков^{2,3}, М.А. Турчанинова², Т.И. Коткина¹, А.В. Болвачева¹, А.Д. Деев⁴, А.Б. Добровольский¹, Е.В. Титаева¹, Е.П. Панченко¹

¹ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий;

²ЗАО "Научно-производственная фирма ДНК-Технология"; ³Институт общей генетики

им. Н. И. Вавилова РАН; ⁴ФГУ Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Росмедтехнологий. Москва, Россия

Factors determining homocysteine levels in Russian patients with stable coronary heart disease

О.О. Shakhmatova¹, A.L. Komarov¹, D.V. Rebrikov^{2,3}, M.A. Turchaninova², T.I. Kotkina¹, A.V. Bolvacheva¹, A.D. Deev⁴, A.B. Dobrovolsky¹, E.V. Titaeva¹, E.A. Panchenko¹

¹Russian Cardiology Scientific and Clinical Complex; ²DNA-Technology Company; ³N.I. Vavilov Institute of General Genetics; Russian Academy of Sciences; ⁴State Research Centre for Preventive Medicine. Moscow, Russia

Цель. Определить факторы, влияющие на уровень гомоцистеина (ГМЦ) в российской популяции пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материал и методы. В исследование включены 506 пациентов (388 мужчин, средний возраст 59,4±12,2 лет) со стабильной ИБС. Были оценены классические факторы риска (ФР) сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), почечная функция (клиренс креатинина по формуле Кокрофта-Гаулта), а также степень атеросклеротического поражения в других сосудистых бассейнах. Были определены уровни ГМЦ, фолата и кобаламина плазмы. Генетический анализ осуществляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. У 432 пациентов (85,4 %) была диагностирована гипергомоцистеинемия. Средний уровень ГМЦ составил 14,3±4,6 мкмоль/л. По данным многофакторного анализа с использованием вложенных моделей, тремя факторами, независимо влияющими на уровень ГМЦ, оказались: уровень фолата (бета-коэффициент -3,86, p<0,0001), уровень кобаламина (бета -5,73, p<0,0001) и генотип MTRR 66AA (бета 10,71, p<0,0005). На уровень ГМЦ влияли такие комбинированные состояния, как аллель MTRR 66G + уровень фолата (бета 1,12, p<0,0001), аллель MTRR 66AA + уровень кобаламина (бета 0,012, p<0,0001), аллель TCN 776G + уровень кобаламина (бета -0,03, p<0,0001), аллель TCN 776G + уровень фолата (бета 0,58, p<0,0009), аллель MTR 2756G + уровень кобаламина (бета 0,004, p<0,002), аллель MTRR 66G + клиренс креатинина <90 мл/мин (бета 0,08, p<0,001) и аллель TCN 776G + клиренс креатинина <90 мл/мин (бета 0,07, p<0,0007).

Заключение. У российских пациентов со стабильной ИБС на уровень ГМЦ влияют уровни фолата, кобаламина, генотип MTRR 66AA, а также носительство аллелей MTR 2756G, MTRR 66G, TCN 776G с учетом концентрации витаминов и функции почек.

Ключевые слова: гомоцистеин, атеротромбоз, фолат, кобаламин, генетический полиморфизм.

Aim. To identify the factors determining homocysteine (HMC) levels in Russian patients with stable coronary heart disease (CHD).

Material and methods. The study included 506 patients (388 men; mean age 59,4±12,2 years) with stable CHD. Classical risk factors (RFs) of cardiovascular disease (CVD), renal function (creatinine clearance by Cockcroft-

© Коллектив авторов, 2010

e-mail: olga.shahmatova@gmail.com

Тел.: (495) 414-67-80, 8-903-107-47-33

[¹Шахматова О.О. (*контактное лицо) — аспирант, ¹Комаров А.Л. — ст.н.с., ^{2,3}Ребриков Д.В. — директор по науке, директор центра коллективного пользования отделения биологических наук, ²Турчанинова М.А. — н.с., ¹Коткина Т.И. — врач высшей категории, руководитель клинико-диагностической лаборатории, ¹Болвачева А.В. — врач высшей категории, ⁴Деев А.Д. — рук. лаборатории биостатистики, ¹Добровольский А.Б. — вед.н.с., ¹Титаева Е.В. — ст.н.с., ¹Панченко Е.П. — руководитель лаборатории клинических проблем атеротромбоза].

Gault formula), and atherosclerotic pathology of other localizations were assessed. The levels of plasma HMC, folate, and cobalamin were measured. Genetic analysis was performed using the real-time polymerase chain reaction method.

Results. In 432 patients (85,4 %), hyperhomocysteinemia was diagnosed. The mean HMC level was $14,3 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/l}$. According to multifactor analysis results, HMC level was independently associated with folate level (beta coefficient $-3,86$, $p < 0,0001$), cobalamin level (beta $-5,73$, $p < 0,0001$), and MTRR 66AA genotype (beta $10,71$, $p < 0,0005$). In addition, HMC concentration was linked to the following combinations: MTRR 66G allele + folate level (beta $1,12$, $p < 0,0001$), MTRR 66AA allele + cobalamin level (beta $0,012$, $p < 0,0001$), TCN 776G allele + cobalamin level (beta $-0,03$, $p < 0,0001$), TCN 776G allele + folate level (beta $0,58$, $p < 0,0009$), MTR 2756G allele + cobalamin level (beta $0,004$, $p < 0,002$), MTRR 66G allele + creatinine clearance < 90 ml/min (beta $0,08$, $p < 0,001$), and TCN 776G allele + creatinine clearance < 90 ml/min (beta $0,07$, $p < 0,0007$).

Conclusion. In Russian patients with stable CHD, HMC level was associated with folate and cobalamin concentrations and MTRR 66AA genotype, as well as with MTR 2756G, MTRR 66G, and TCN 776G alleles combined with vitamin concentrations and renal function.

Key words: Homocysteine, atherothrombosis, folate, cobalamin, genetic polymorphism.

Повышение уровня гомоцистеина (ГМЦ) плазмы является важным и потенциально модифицируемым фактором риска (ФР) сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). По данным мета-анализа, выполненного Homocysteine Studies Collaboration 2002 и включившего > 16 тыс. пациентов, повышение уровня ГМЦ на 25 % приводит к росту риска развития ишемической болезни сердца (ИБС) на 11 %, ишемического инсульта (ИИ) на 19 % [1]. ГМЦ — промежуточный продукт обмена незаменимой серосодержащей аминокислоты метионина. Существует 2 основных пути его метаболизма (рисунок 1): (1) транссульфурирование с участием фермента цистатионин-бета-синтазы; (2) реметилирование с образованием метионина. ГМЦ может быть реметилирован кобаламин-зависимым ферментом метионинсинтазой (MTR), кофактором которой является фолиевая кислота (ФК) в форме метилтетрагидрофолат. Важную роль в этом процессе играют еще 3 белка: метилтетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) — фермент, необходимый для превращения метилтетрагидрофолат в метилтетрагидрофолат; метионинсинтаза-редуктаза (MTRR), восстанавливающая кофактор метионинсинтазы кобаламин I из окисленной формы кобаламин II; транскобаламин (TCN), осуществляющий внутриклеточный транспорт витамина B12. Альтернативным путем является реметилирование с помощью бетаин-гомоцистеинметилтрансферазы (BHMT) [2].

Значительное повышение уровня ГМЦ (до ≥ 100 $\mu\text{mol/l}$) ассоциировано с мутацией в гене цистатионин-бета-синтазы и приводит к развитию такой тяжелой патологии, как гомоцистеинурия [3]. Существенно чаще встречается умеренное повышение ГМЦ (> 10 $\mu\text{mol/l}$). Полагают, что оно может быть обусловлено носительством вариантных аллелей генов, кодирующих белки-компоненты каскада реметилирования ГМЦ. Есть ряд клинических и биохимических факторов, которые рассматриваются в качестве причин повышения ГМЦ, в первую очередь — недостаток витамина B12 и ФК [4].

Целью данного исследования было определение уровня ГМЦ у пациентов с ИБС и изучение клинических и генетических факторов, которые могут оказывать на него влияние.

Материал и методы

В исследование были включены 506 пациентов с хронической ИБС. Критериями диагноза ИБС являлись: наличие стенокардии II-III функциональных классов согласно классификации Канадской ассоциации кардиологов, анамнез острого коронарного синдрома (ОКС) > 30 сут. назад или процедуры реваскуляризации миокарда. Критерии исключения — тяжелые нарушения функций органов, а также факторы, заведомо влияющие на уровень ГМЦ (таблица 1).

У всех пациентов оценивались такие “классические” ФР ССЗ, как возраст, пол, курение, артериальная гипертензия (АГ), гиперлипидемия (ГЛП) и/или прием гиполипидемического препарата, сахарный диабет (СД) и ожирение (Ож). Диагноз цереброваскулярной болезни (ЦВБ) ставился на основании наличия в анамнезе ИИ/транзиторной ишемической атаки (ТИА)/процедуры реваскуляризации, либо стеноза экстракраниального отдела брахиоцефальных артерий ≥ 50 % по данным дуплексного сканирования. Атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей (АПАНК) диагностировалось в случае снижения лодыжечно-плечевого индекса систолического артериального давления (САД) $< 0,9$, наличия перемежающейся хромоты, а также процедуры реваскуляризации/ампутации нижней конечности в анамнезе. Почечная функция оценивалась по клиренсу креатинина (ККр), рассчитанному по формуле Кокрофта-Гаулта. Его снижение до 60–89 мл/мин расценивалось как начальная почечная недостаточность (ПН), до 30–59 мл/мин — как умеренная, < 30 мл/мин — как тяжелая.

У всех пациентов измеряли уровень L-ГМЦ крови методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа с использованием коммерческого набора реактивов AxSYM Homocysteine на приборе “AxSYM System”, Abbott. Повышенным принято считать уровень ГМЦ > 10 $\mu\text{mol/l}$. Уровень ФК определяли методом захвата ионов с использованием коммерческого набора реактивов AxSYM Folate на приборе “AxSYM System”, Abbott; уровень витамина B12 — методом иммуноферментного анализа с использова-

Таблица 1

Критерии исключения из исследования

Состояния, заведомо приводящие к изменению уровня ГМЦ	Предполагаемый дефицит фолата или витамина В12
Креатинин > 160 мкмоль/л	Клинические признаки дефицита
Печеночная недостаточность	ФК или витамина В12
Нарушения функции щитовидной железы (гипо- и гиперфункция)	Анемия (Hb < 120 г/л у мужчин, < 110 г/л у женщин)
Гиперпролиферативные состояния (онкология и коллагенозы)	Заболевания ЖКТ с нарушением всасывания
Прием ряда лекарственных препаратов за 30 сут. до включения в исследование*	

Примечание: * — поливитамины, теофиллины, фибраты, ниацин, секвестранты желчных кислот, оральные контрацептивы, противосудорожные препараты, антифолаты, леводopa, циклоспорин А, сульфасалазин, изониазин.

нием коммерческого набора реактивов AxSYM В12 на приборе “AxSYM System”, Abbott.

Генотипирование образцов по аллельным вариантам генов, кодирующих метилентетрагидрофолатредуктазу MTHFR (С677Т), MTHFR (А1298С), метионинсинтазу MTR (А2756G), метионинсинтазу-редуктазу MTRR (А66G) и транскобаламин (TCN С776G) проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с детекцией накопления продуктов реакции “в реальном времени”.

Статистический анализ данных выполнен в системе SAS (Statistical Analysis System). Однофакторный анализ влияния уровня ФК и кобаламина в плазме на содержание ГМЦ осуществлялся методом линейной регрессии. Многофакторный анализ признаков, определяющих уровень ГМЦ, проводился путем дисперсионно-ковариационного анализа с использованием вложенных моделей. Генотип оценивали 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).

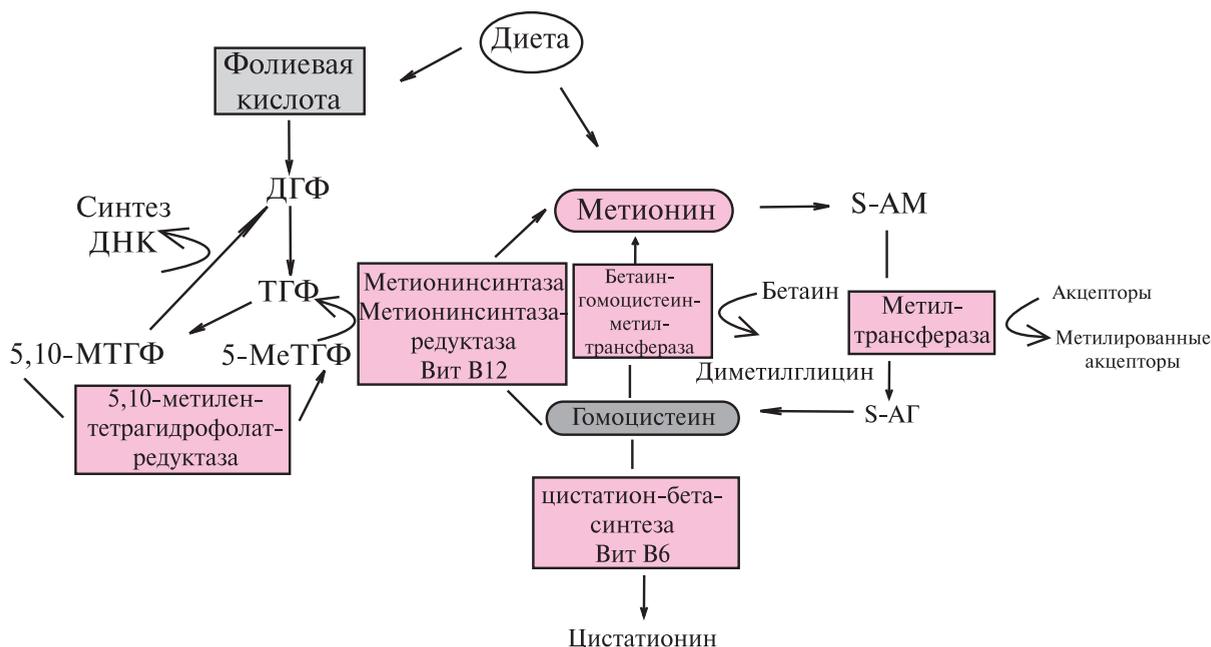
Результаты

Клиническая характеристика пациентов представлена таблице 2. Была выявлена высокая

распространенность “классических” ФР ССЗ: большая часть обследованных пациентов имели АГ (85,2 %) и ГЛП (96,6 %), у трети больных было Ож, СД диагностирован у каждого пятого пациента, 36,4 % больных курили когда-либо, а 23,1 % продолжали курить на момент включения в исследование. У 28,8 % больных было выявлено клинически значимое атеросклеротическое поражение более чем в 1 сосудистом бассейне. Помимо ИБС, 9,3 % пациентов имели сопутствующую ЦВБ, 14,8 % — АПАНК, а у 4,7 % больных диагностировано поражение во всех трех основных сосудистых бассейнах.

Средний уровень ГМЦ в плазме у пациентов составил $14,3 \pm 4,6$ мкмоль/л, при этом у 432 (85,4 %) он превышал референсные значения (рисунок 2).

Были исследованы следующие факторы, потенциально влияющие на уровень ГМЦ: содержание ФК в плазме, содержание кобаламина в плазме, функция почек, наличие СД, распространенность атеросклероза, носительство ряда аллельных вариантов генов, продукты которых принимают участие в реметилировании ГМЦ.



Примечание: S-AM=S-аденозилметионин, S-AH=S-аденозилгомоцистеин, ДГФ=дигидрофолат, ТГФ=тетрагидрофолат, 5-МеТГФ=5-метилтетрагидрофолат, 5,10-МТГФ=5,10-метилентетрагидрофолат.

Рис. 1 Метаболизм гомоцистеина.

Показатели ФК и витамина В12 в плазме.

Содержание ФК < 7,2 нг/мл было обнаружено у 281 (55,5 %) пациента, средний уровень фолата составил $7,6 \pm 3,4$ нг/мл (рисунок 3). Важно подчеркнуть, что сниженный уровень ФК широко распространен у пациентов без клинических признаков дефицита фолата и заболеваний, которые могут к нему привести. Была продемонстрирована достоверная отрицательная корреляция между уровнем ФК и содержанием ГМЦ плазмы (коэффициент корреляции Спирмена — 0,23 [95 % ДИ -0,31; -0,14], $p < 0,0001$).

Содержание витамина В12 в плазме ниже принятой границы нормы (200 пг/мл) имело место у 49 (9,7 %) пациентов, средний уровень составил $393,1 \pm 188,9$ пг/мл (рисунок 4). Также была определена достоверная отрицательная корреляция между уровнями кобаламина и ГМЦ плазмы (коэффициент корреляции Спирмена — 0,24 [95 % ДИ -0,32; -0,15], $p < 0,001$).

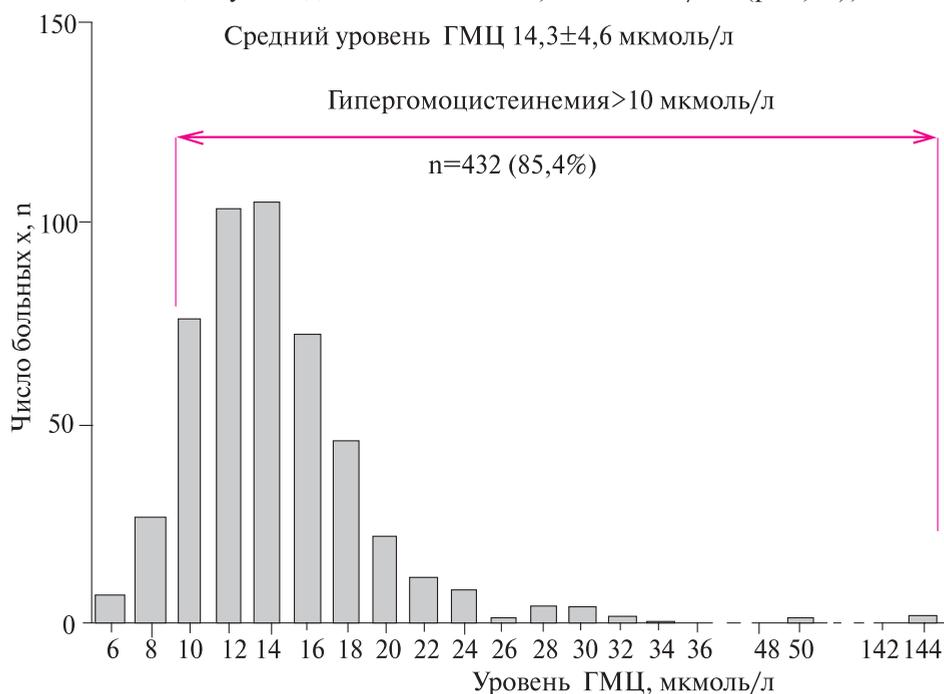
Функция почек. Несмотря на то, что в исследовании не включали пациентов с уровнем Кр плазмы > 160 мкмоль/л, > 50% больных имели нарушение функции почек со снижением ККр < 90 мл/мин (средний уровень — $89,5 \pm 27,4$ мл/мин). Нарушение функции почек достоверно ассоциировалось с повышением концентрации ГМЦ (рисунок 5). Содержание ГМЦ плазмы у пациентов с нормальной функцией почек составил 13,5 мкмоль/л vs 15,2 мкмоль/л у больных с начальной ПН ($p = 0,02$) и 15,9 мкмоль/л у пациентов с умеренной ПН ($p = 0,003$).

СД. СД страдали 96 (19 %) обследованных больных, при этом компенсация углеводного обмена

наблюдалась лишь в 22,2 % случаев. 69,8 % пациентов получали медикаментозную гипогликемическую терапию. Несмотря на достаточно тяжелый контингент пациентов, наличие СД не приводило к повышению ГМЦ (концентрация ГМЦ плазмы у пациентов с СД — $13,3 \pm 4,4$ мкмоль/л, у пациентов без СД — $14,5 \pm 4,6$ мкмоль/л ($p < 0,02$)).

Распространенность атеросклеротического процесса. Как было описано ранее, почти у трети больных диагностировано клинически значимое атеросклеротическое поражение более чем в 1 сосудистом бассейне (таблица 2). Содержание ГМЦ плазмы у пациентов с поражением одного (изолированная ИБС), двух (ИБС+ЦВБ, или ИБС+АПАНК) и трех (ИБС+ЦВБ+АПАНК) сосудистых бассейнов достоверно не различалось и составило $14,5 \pm 8,3$ мкмоль/л, $14,6 \pm 4,6$ мкмоль/л и $14,5 \pm 4,2$ мкмоль/л, соответственно.

Генетические факторы. При генотипировании была обнаружена высокая распространенность изучаемых аллельных вариантов генов: по крайней мере, 1 вариантный аллель по каждому из генов встречался у > 50 % пациентов. Частота определения (гетеро-/гомозиготы) составила: МТНFR 677 Т — 43,3/8,5 %, МТНFR 1298 С 43,3/12,4 %, МTR 2756 G 37,0/17,2 %, МTRR 66 G 38,7/23,6 %, TCN 776 G 44,7/22,3 %. Носительство изученных аллелей не оказывало влияния на ГМЦ. Его концентрация в плазме у носителей “дикого” типа гена в сравнении с носителями вариантных аллелей составила: МТНFR С677Т — 13,9 мкмоль/л vs 15,1 мкмоль/л ($p < 0,07$), МТНFR А1298С — 15,3 мкмоль/л vs 13,9 мкмоль/л ($p < 0,06$), МTR А2756G —



Примечание: средний уровень ГМЦ $14,3 \pm 4,6$ мкмоль/л.

Рис. 2 Уровень ГМЦ плазмы у обследованных больных.

Таблица 2

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование (n=506)

Пол (муж./жен.)	388/118
Возраст, годы (M±m)	59,4±12,2
“Классические” ФР	
АГ	85,2 %
ГЛП*	96,6 %
Курение	36,4 %
в анамнезе	23,1 %
в настоящее время	33,6 %
Ож (ИМТ> 30 кг/м ²)	19 %
СД	92,3±14,9
Кр, мкмоль/л (M±m)	
ИБС	100 %
Стенокардия напряжения II-III функциональных классов	74,5 %
ОКС>1 мес. назад	68 %
ЧКВ/АКШ в анамнезе	75,1 %
ЦВБ	14 %
ИИ/ТИА > 2 месяцев назад	8,7 %
Стеноз сонной артерии > 50 %	5,9 %
Эндартерэктомия/ангиопластика > 2 мес. назад	2,4 %
АПАНК	19,6 %
ЛПИ САД<0,9	17,2 %
Переменяющаяся хромота	9,3 %
Ампутация нижних конечностей	0,2 %
Шунтирование/ангиопластика > 2 мес. назад	1 %

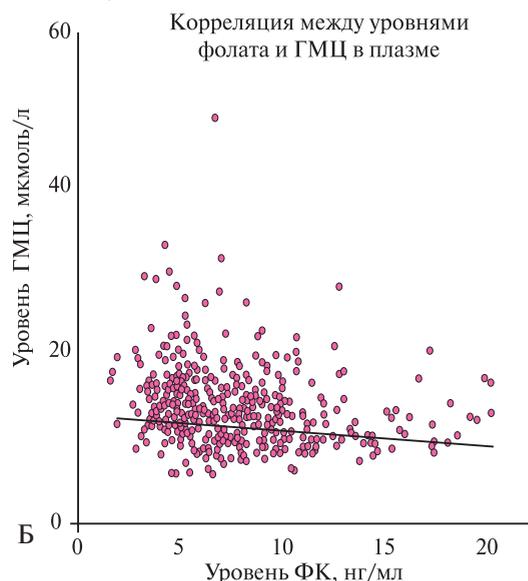
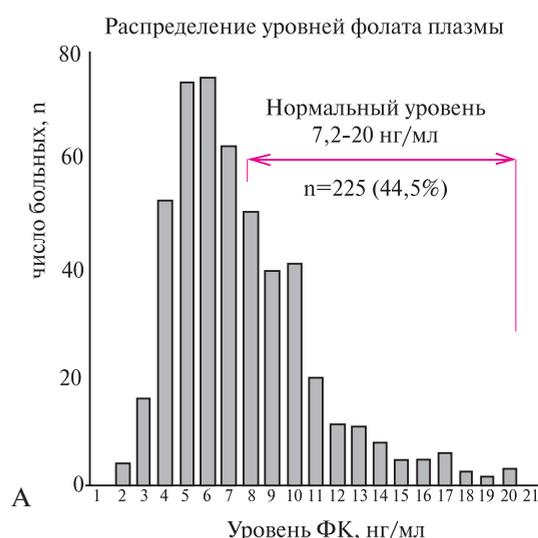
Примечание: ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство, АКШ — аортокоронарное шунтирование, ЛПИ — лодыжечно-плечевой индекс.

14,3 мкмоль/л vs 14,7 мкмоль/л (p<0,5), MTRR A66G — 14,4 мкмоль/л vs 14,7 мкмоль/л (p<0,6), TCN C776G — 13,8 мкмоль/л vs 14,9 мкмоль/л (p<0,08), соответственно.

Таким образом, по результатам однофакторного анализа влияли на уровень ГМЦ такие параметры, как концентрация ФК и витамина В12 в плазме, а также функция почек. Поскольку содержание ГМЦ у конкретного пациента зависит от множества факторов, был проведен дисперсионно-ковариационный анализ, в который были включены все выше-

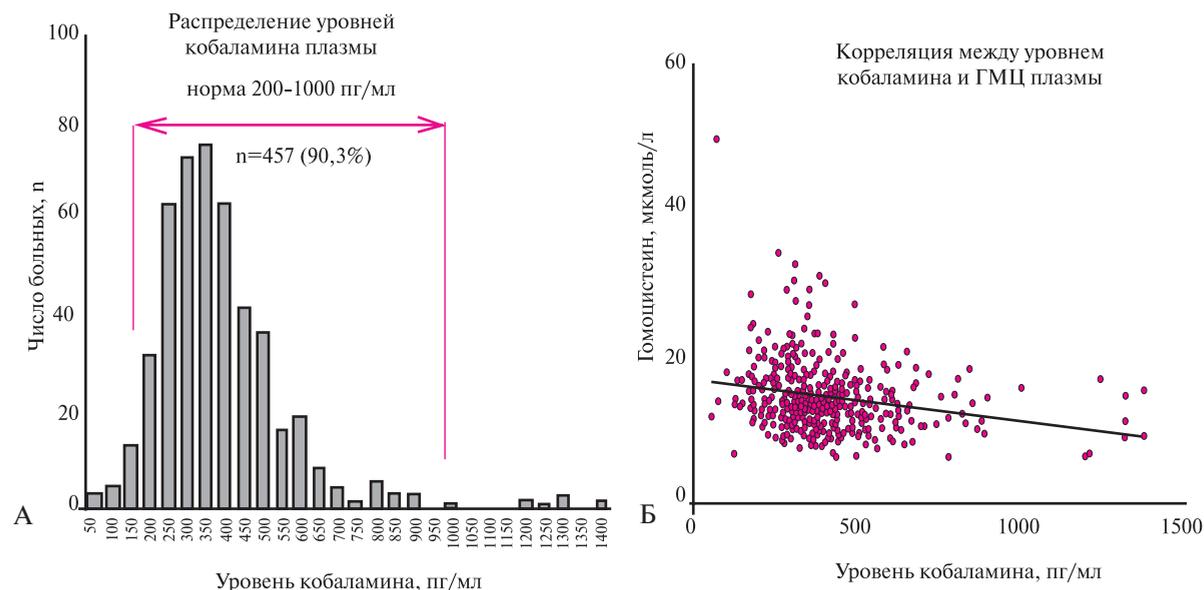
перечисленные факторы по отдельности и вложенные модели, учитывающие влияние носительства изученных аллельных вариантов в зависимости от уровня ФК, витамина В12 и ККр. Результаты многофакторного анализа представлены в таблице 3.

Из факторов, которые традиционно рассматриваются в качестве ассоциирующихся с гипергомоцистеинемией, независимо влияют на концентрацию ГМЦ только такие параметры, как уровень ФК — β-коэффициент-3,86 (p=0,0001) и витамина



Примечание: А. Распределение уровней фолата плазмы. Средний уровень ФК 7,6±3,4 нг/мл. Б. Корреляция между уровнями фолата и ГМЦ в плазме. Коэффициент корреляции Спирмена — 0,23 [95% ДИ-0,31; -0,14], p<0,0001.

Рис. 3 Содержание ФК и уровень ГМЦ в плазме (однофакторный анализ).



Примечание: А. Распределение уровней кобаламина плазмы. Средний уровень кобаламина $393,1 \pm 188,9$ пг/мл. Б. Корреляция между уровнями кобаламина и ГМЦ плазмы. Коэффициент корреляции Спирмена $-0,24$ [95% ДИ $-0,32; -0,15$], $p < 0,001$.

Рис. 4 Содержание кобаламина и уровень ГМЦ в плазме (однофакторный анализ).

В12 — β -коэффициент $-5,73$ ($p=0,0001$). Носительство “дикого” генотипа MTRR 66AA также достоверно повышает уровень ГМЦ — β -коэффициент $10,71$ ($p=0,0005$), т. е. полиморфизм по данному локусу является “защитным”.

Данные генетического тестирования необходимо рассматривать не изолированно, а в контексте ряда сопутствующих факторов как внешней, так и внутренней среды организма. В этой связи в многофакторный анализ были включены так называемые вложенные модели: влияние носительства того или иного аллельного варианта каждого из изучаемых генов оценивалось с учетом значения уровня ФК, витамина В12 и функции почек у конкретного пациента. Таким образом, был определен ряд комбинированных состояний, достоверно влияющих на содержание ГМЦ. Носительство аллельного варианта TCN 776 (G) с учетом уровней ФК (β -коэффициент $0,58$, $p=0,0009$), кобаламина (β -коэффициент $-0,03$, $p=0,0001$), либо при умеренном снижении функции почек (β -коэффициент $0,07$, $p=0,0007$) повышает уровень ГМЦ. Наличие хотя бы одной аллели MTRR 66 (G) с учетом уровня ФК (β -коэф-

фициент $1,12$, $p=0,0001$) и при сниженной почечной функции (β -коэффициент $0,08$, $p=0,001$) также влияет на уровень ГМЦ. С учетом уровня кобаламина, на содержание ГМЦ незначительно влияет и носительство аллели MTR 2756 (G) (β -коэффициент $0,004$, $p=0,02$).

Сделана попытка проанализировать влияние на ГМЦ различных комбинаций аллелей по всем пяти изучаемым локусам, однако в связи с недостаточным количеством наблюдений модель вырождалась, и достоверных результатов получить не удалось.

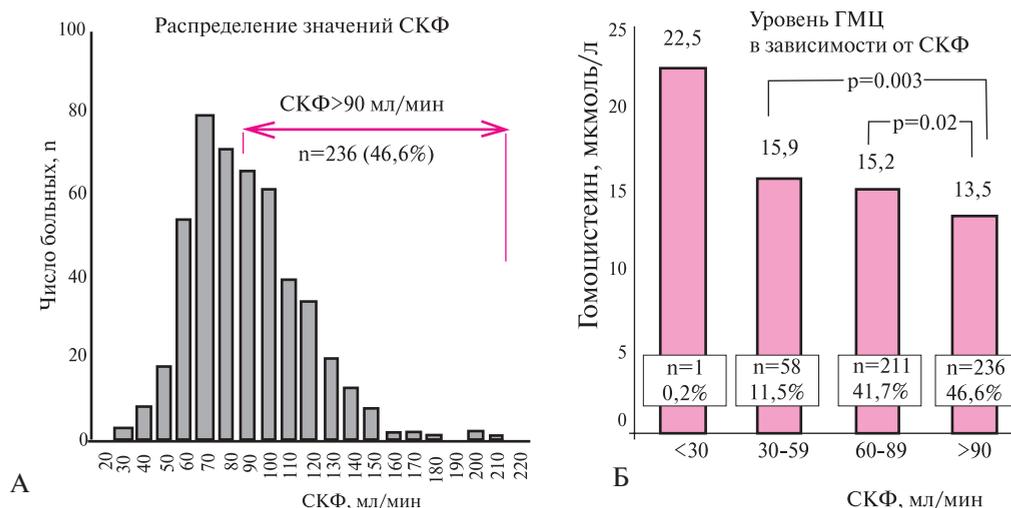
Обсуждение

В настоящее время существуют две принципиально различные точки зрения в отношении роли умеренной гипергомоцистеинемии в патогенезе сосудистой патологии. Ряд авторов считают ГМЦ не причиной, а маркером, “свидетелем” процессов атеротромбоза: чем больше атеросклероз распространен у больного, тем выше показатель ГМЦ. Другие полагают, что умеренная гипергомоцистеинемия является независимым предиктором разви-

Таблица 3

Факторы, влияющие на уровень ГМЦ (результаты дисперсионно-ковариационного анализа)

Параметр, влияющий на уровень ГМЦ	β -коэффициент уравнения регрессии	Значение p
Уровень ФК (в логарифмической шкале)	-3,86	0,0001
Уровень кобаламина (в логарифмической шкале)	-5,73	0,0001
Генотип MTRR 66 AA	10,71	0,0005
TCN 776 (G)+ФК	0,58	0,0009
TCN 776 (G)+кобаламин	-0,03	0,0001
TCN 776 (G)+ККр	0,07	0,0007
MTRR 66 (G)+ФК	1,12	0,0001
MTRR 66 (G)+ККр	0,08	0,001
MTR 2756 (G)+кобаламин	0,004	0,02



Примечание: А. Распределение значений ККр. Средний уровень ККр $89,5 \pm 27,4$ мл/мин. Б. Уровень ГМЦ в зависимости от ККр.
 Рис. 5 Функция почек и уровень ГМЦ в плазме (однофакторный анализ).

тия ИБС и ЦВБ [5,6]. По результатам настоящего исследования уровень ГМЦ у больных ИБС не зависит от распространенности атеросклеротического процесса, что противоречит гипотезе о “маркерной” роли ГМЦ.

В изученной выборке российской популяции пациентов с ИБС уровень ГМЦ плазмы оказался повышен в большинстве случаев (85,4 %). Для сравнения, в различных европейских и североамериканских популяциях распространенность умеренной гипергомоцистеинемии у больных ИБС составляет 10-40 % [4]. Причина этих различий кроется в тех факторах, которые влияют на ГМЦ.

Выбранные для анализа клинические и биохимические параметры (функция почек, СД, концентрация ФК и витамина В12 в плазме) изучены ранее и считались заведомо значимыми в отношении содержания ГМЦ [4].

ПН часто встречается у больных ИБС и связана с атеросклеротическим поражением почечных артерий, сопутствующей АГ. У 53 % обследованных пациентов было выявлено снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) < 90 мл/мин. В норме ~ 70 % клиренса ГМЦ осуществляется почками. Очевидно, что нарушение их функции у больных ИБС должно приводить к повышению содержания ГМЦ. Эти соображения легли в основу теории, согласно которой этот метаболит расценивается как маркер нарушения кровоснабжения почек, типичного для пациентов с распространенным атеросклерозом, в т.ч. и с ИБС [7,8]. У обследованных больных ИБС наличие начальной и умеренной ПН не является независимым предиктором для ГМЦ, приводя к повышению его концентрации только в случае сопутствующего носительства ряда генетических полиморфизмов. Это обусловлено, по-видимому, особенностью обследуемых пациентов, среди которых заведомо отсутствовали пациенты со значительными нарушениями функции почек.

Согласно полученным результатам наличие СД не влияет на содержание ГМЦ в плазме. По всей видимости, выявленная в предшествующих исследованиях взаимосвязь была обусловлена нарушением функции почек у больных СД, а, как уже было сказано выше, пациентов с тяжелой почечной дисфункцией в настоящее исследование не включали.

В изученной выборке более половины больных имеют сниженный уровень ФК плазмы без явных к тому клинических предпосылок. Такой результат коррелирует с данными Института питания РАМН, согласно которым распространенность дефицита ФК среди взрослого населения РФ составляет 40-60 % [9]. Сложившаяся ситуация может быть связана как с особенностями питания, так и с высокой частотой злоупотребления алкоголем.

В 1998г в США и Канаде стартовала программа по обогащению продуктов питания ФК. По данным Фремингемского исследования, описанные мероприятия имели высокую эффективность в отношении устранения дефицита этого витамина в популяции: за год среднее содержание ФК в плазме крови взрослого населения возросло с 6,4 до 10,0 мкмоль/л, количество пациентов со сниженным уровнем фолата плазмы снизилось с 22 % до 1,7 %, средний уровень ГМЦ уменьшился с 10,1 до 9,4 мкмоль/л. За год функционирования программы было предотвращено 13 тыс. смертей от инсульта (в то время как в странах, не участвующих в программе — Англии и Уэльсе — подобное снижение отсутствовало) [10,11]. Как было показано, сниженный уровень ФК плазмы является фактором, независимо влияющим на ГМЦ. По-видимому, частота гипергомоцистеинемии у российских пациентов более чем в 2 раза превышает таковую в западных популяциях по причине колоссальных различий в фолатном статусе.

Другим фактором, определяющим уровень ГМЦ, является концентрация кобаламина. Основными причинами дефицита витамина В12 счи-

Характеристика изученных аллельных вариантов генов, продукты которых принимают участие в трансметилировании ГМЦ

Аллельный вариант	MTHFR C667T	MTR A2756G	MTRR A66G	TCN C776G
Белок	Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR)	Метионинсинтаза (MTR)	Метионинсинтаза-редуктаза (MTRR)	Транскобаламин II (TCN)
Функция белка	Синтез донора метильной группы для реметилирования гомоцистеина	Реметилирование гомоцистеина	Восстановление кофактора метионинсинтазы кобаламина I из окисленной формы кобаламина II	Перенос витамина B12 в клетку
Изменение функции белка у носителей аллельного варианта	Термоллабильность У гомозигот — 35 % от ферментативной активности “дикого” генотипа, у гетерозигот — 70 %	Нет данных	↓ аффинность к MTR	↓ аффинность транскобаламина II к витамину B12 и его транспортная способность

тают вегетарианскую диету, злоупотребление алкоголем и пожилой возраст (за счет дефицита внутреннего фактора и развития синдрома мальабсорбции). К снижению кобаламина (до 14 %) может приводить сопутствующий прием метформина [12]. В реальной клинической практике распространенность синдрома мальабсорбции не превышает 7 % у пациентов > 60 лет (средний возраст включенных в настоящее исследование пациентов составляет 59 лет) [13]. Обследуемая группа пациентов формировалась таким образом, что больных с известной патологией желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в нее не включали. С другой стороны, порядка 7 % пациентов получали метформин по поводу СД. Совокупное влияние описанных факторов привело к тому, что снижение уровня кобаламина плазмы у обследованных пациентов встречалось довольно часто — в 9,7 % случаев.

Особого внимания заслуживают результаты, касающиеся влияния генетического полиморфизма на содержание ГМЦ. Выбор генетических параметров был основан на следующих принципах: (1) на литературных данных о влиянии на ГМЦ или ФК (как правило, весьма разноречивых); (2) на высокой распространенности выбранного аллельного варианта в различных популяциях в совокупности с данными о снижении функциональной активности соответствующего белка, участвующего в трансметилировании ГМЦ (таблица 4) [14-21].

Наиболее изученным является аллельный вариант гена метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR C667T. В ряде работ было показано, что носительство хотя бы одного аллеля T ассоциируется как с повышением уровня ГМЦ, так и с достоверно большим риском ССЗ [14, 17]. Эти данные впервые были получены ~ 20 лет назад, и с тех пор неоднократно воспроизводились в различных популяциях и у пациентов. Ситуация изменилась в конце 90-начале 2000 гг. Были опубликованы результаты крупных исследований, согласно которым влияние полиморфизма MTHFR C667T на ГМЦ и прогноз пациентов с сердечно-сосуди-

стой патологией было либо незначительным, либо вообще отсутствовало [22]. Однако в 2002г был выполнен мета-анализ, объединивший результаты 40 наблюдательных исследований, в которые были включены суммарно 24 тыс. пациентов с ИБС. При учете всех больных, включенных в мета-анализ, относительный риск ИБС у пациентов — гомозигот по аллельному варианту MTHFR C677T (TT) относительно гомозигот по “дикому” аллелю (CC) составил 1,16 (95 % ДИ 1,05-1,28). Была выявлена существенная разница в результатах, полученных на североамериканской и европейской популяциях: относительный риск составил 0,87 (95 % ДИ 0,73-1,05) и 1,14 (95 % ДИ 1,01-1,28), соответственно. Авторы объяснили гетерогенность результатов различным уровнем ФК в крови пациентов и предположили, что генотип TT ассоциируется с риском ИБС только у тех больных, у которых отмечается сниженный фолатный статус [23].

Исходя из этих данных, были использованы вложенные модели, учитывающие взаимодействие генотипа с сопутствующими уровнями ФК, витамина B12 или нарушенной функции почек у конкретного больного.

Довольно неожиданными оказались результаты, согласно которым в изученной выборке пациентов генетический полиморфизм метилентетрагидрофолатредуктазы не оказывал влияния на содержание ГМЦ. Единственным генетическим фактором, независимо приводящим к умеренной гипергомоцистеинемии, оказалось носительство “дикого” варианта гена, кодирующего метионинсинтазу-редуктазу (MTRR). Сходные результаты были получены и другими [24]. При изучении того же набора генетических полиморфизмов было показано, что “дикий” генотип MTRR 66AA — единственный генетический параметр, который ассоциировался как с умеренной гипергомоцистеинемией, так и с развитием ИБС [24].

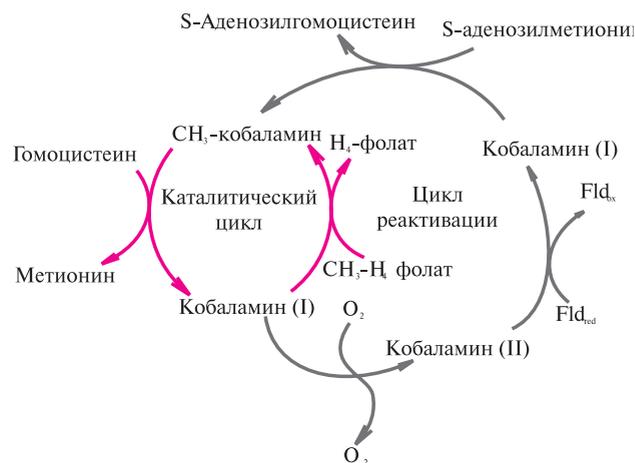
Учет дополнительных факторов показал, что полиморфизм генов транскобаламина (TCN) и метионинсинтазы (MTR) также оказывает влияние на уро-

вень ГМЦ. Полученные данные свидетельствуют о том, что носительство аллельных вариантов генов-участников метаболизма ГМЦ, которое не приводит к грубым дефектам кодируемого белка, проявляется фенотипически при наличии дополнительных условий (уровень основных кофакторов и почечная функция). В случае отсутствия подобных дополнительных условий, умеренно сниженной активности белков, кодируемых вариантными аллелями, оказывается вполне достаточно для адекватной утилизации ГМЦ. Например, сниженный уровень витамина В12 плазмы на фоне недостаточной транспортной активности транскобаламина у носителей аллеля TCN 776G, вероятно, приводит к выраженному падению внутриклеточной концентрации кобаламина, и, как следствие, нарушению функционирования кобаламин-зависимого этапа утилизации ГМЦ. При нормальной концентрации витамина В12 в плазме его внутриклеточное содержание, по всей видимости, оказывается достаточным, несмотря на умеренное снижение активности транскобаламина.

Согласно результатам настоящего исследования был выявлен феномен, который требует отдельного обсуждения. У носителей ряда генетических полиморфизмов (TCN 776 (G), MTRR 66 (G) и MTR 2756 (G)) повышение кобаламина и/или фолата в плазме приводит к увеличению концентрации ГМЦ. Достоверное объяснение этого феномена в литературе отсутствует. Помимо прочего, в доступных публикациях нет однозначных данных о ферментативной активности метионинсинтазы и метионинсинтазы-редуктазы у носителей полиморфных аллелей генов, кодирующих эти белки. Встречаются единичные сообщения о снижении активности этих ферментов *in vitro* [25]. Можно лишь высказать предположение, основанное на механизмах реакций в каскаде метаболизма ГМЦ (рисунок 6).

В реакции реметилирования ГМЦ метилкобаламин является косубстратом — разновидностью кофактора, который сам вступает в химическую реакцию. Поэтому избыток кобаламина в той форме, в которой он поступает в клетку (лишенным метильной группы), может сместить равновесие реакции в сторону образования ГМЦ. По всей видимости, этот механизм реализуется только в случае сниженной ферментативной активности метионинсинтазы у носителей аллеля MTR 2756 (G), тогда как при нормальном функционировании фермента реакция протекает в обычном направлении, несмотря на некоторый избыток кобаламина.

Примерно каждые 2000 реакций происходит окисление кобаламина, что требует его реактивации, осуществляемой метионинсинтазой-редуктазой. Снижение ее активности у носителей полиморфизма MTRR 66 (G) приводит к недостаточной реактивации кобаламина. Тетрагидрофолат является вторым продуктом реакции образования метилированного кобаламина. Поэтому его избыток также может сместить равновесие реакции в сторону, противоположную образованию метилкобаламина. Кобаламин метилируется



Примечание: Fldox — окисленный флаводоксин, Fldred — восстановленный флаводоксин.

Рис. 6. Цикл реакции, катализируемый метионинсинтазой. По [26] с изменениями.

только в восстановленной форме, поэтому именно комбинация состояний, приводящих к умеренным нарушениям метилирования кобаламина и его реактивации, может приводить к накоплению ГМЦ. Схожую ситуацию можно наблюдать у носителей полиморфизма TCN 776 (G) в сочетании с повышенным уровнем ФК. По описанному выше механизму происходит умеренное снижение метилирования кобаламина, концентрация которого у этих пациентов в клетке исходно несколько снижена в силу нарушения функционирования транскобаламина II. Эти изменения по отдельности недостаточны, чтобы вызвать клинически значимое повышение ГМЦ, тогда как в комбинации могут вызывать гипергомоцистеинемию. Следует подчеркнуть, что приведенные выше объяснения носят теоретический характер, и механизм данного феномена требует дальнейшего изучения.

Заключение

Важным в практическом отношении представляется то обстоятельство, что уровень ГМЦ частично определяется факторами, которые могут быть устранены — дефицитом ФК и витамина В12. По этой причине гипергомоцистеинемию можно рассматривать как потенциально модифицируемый ФР ССЗ, по крайней мере, у части пациентов. С другой стороны, избыток витаминов у носителей аллельных вариантов TCN 776 (G), MTRR 66 (G) и MTR 2756 (G) также может повышать содержание ГМЦ, поэтому рутинное назначение больших, нефизиологичных доз ФК и витамина В12 является, по всей видимости, неоправданным. В свете этого представляется целесообразным проведение в российской популяции крупных исследований, направленных на изучение эффективности витамина В12 и ФК в отношении прогноза у больных ИБС. Витаминотерапию при гипергомоцистеинемии следует назначать с учетом уровней фолата и витамина В12 в плазме, а также результатов генетического тестирования.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке гранта № 8/3—409н-09 Правительства г. Москвы.

Литература

1. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288(16): 2015-22.
2. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Ann Rev Nutr* 1999; 19: 217-46.
3. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.
4. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, et al. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(11): 1392-403.
5. Kothekar MA. Homocysteine in cardiovascular disease: A culprit or an innocent bystander? *Indian J Med Sci* 2007; 61: 361-71.
6. Fácila L, Nuñez JE, Sanchis J, et al. Early determination of homocysteine levels in acute coronary syndromes, is it an independent prognostic factor? *Int J Cardiol* 2005; 100(2): 275-9.
7. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 495-502.
8. Bostom A, Brosnan JT, Hall B, et al. Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995; 116: 59-62.
9. В. Б. Спиричев Теоретические и практические аспекты современной витаминологии. *Вопр питания* 2005; 74: 32-40.
10. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, et al. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 34: 1449-54.
11. Rader JI. Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. *J Nutr* 2002; 132: 2466-70.
12. Allen LH. The most common explanations for poor vitamin B12 status are low dietary intake of animal-source foods, alcohol consumption, stomach ulcers (*helicobacter pylori* infection), lactation and poor gut absorption. Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull* 2008; 29(2 Suppl): S20—34; discussion S35-7.
13. Homocysteine, folic acid and B vitamins as secondary prophylaxis. A commentary on current therapy trials by Olaf Stanger. (German, Austrian, and Swiss Homocysteine Society; www.dach-liga-homocystein.org).
14. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
15. 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(1): 51-61.
16. Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, et al. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of coronary artery disease. *Ann Clin Biochem* 2006; 43(Pt 3): 200-6.
17. Huh HJ, Chi HS, Shim EH, 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(5): 501-6.
18. Guéant-Rodriguez RM, 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(3): 510-5.
19. Brandalize APC, Bandinelli E, Borba JB, 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: 787-91.
20. Doolin MT, 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: 1222-6.
21. Hubner RA, Muir KR, Liu JF, et al. Folate Metabolism Polymorphisms influence risk of colorectal adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(9): 1607-12.
22. 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; 93: 1201-6.
23. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, et al. MTHFR 677C-T Polymorphism and risk of coronary heart disease. *JAMA* 2002; 288: 2023-31.
24. Guéant-Rodriguez RM, 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: 510-15.
25. Olteanu H, Munson T, Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochem* 2002; 41: 13378-85.
26. Koutmos M, Dattaa S, Patridgea KF, et al. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(44): 18527-32.

Поступила 29/12—2009