

---

---

## ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

---

---

### АССОЦИАЦИЯ ГЕННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ НЕКОТОРЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ С ПРОЦЕССАМИ РЕЭНДОТЕЛИЗАЦИИ СТЕНТОВ ПОСЛЕ ПЛАНОВОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

К.Б.Тимижева, М.М.Азова, А.Аит Аисса,  
А.В.Агаджанян, Л.В.Цховребова, М.Л.Благонравов

*ФГАОУ ВО РУДН, Москва, РФ*

Рестеноз остаётся основным осложнением, возникающим после чрескожных коронарных вмешательств по поводу ИБС. К причинам его развития относятся, в частности, генетические факторы. Изучены полиморфные локусы генов эндотелина-1 (*EDNI rs5370*), рецептора к эндотелину-1 (*EDNRA rs5333*), эндотелинпревращающего фермента (*ECE1 rs1076669*), а также эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS rs1549758*, *eNOS rs1799983*, *eNOS rs2070744*) в контексте развития рестеноза внутри стента. Изученные полиморфизмы генов эндотелиновой системы более значимы для лиц старше 65 лет, в то время как полиморфные локусы гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS rs1799983* и *eNOS rs1549758*) преимущественно ассоциированы со сроком развития рестеноза. Полученные результаты могут быть использованы для комплексной оценки факторов риска рестенозирования и выбора тактики лечения пациентов с ИБС до планового оперативного вмешательства.

**Ключевые слова:** чрескожные коронарные вмешательства; рестеноз; полиморфные локусы генов; эндотелий

Чрескожные коронарные вмешательства (ЧКВ) разработаны для уменьшения стеноза или устранения окклюзии и восстановления перфузии миокарда посредством баллонной дилатации и стентирования суженного сегмента артерии при прогрессировании атеросклероза коронарных артерий. Интервенционная хирургия по сравнению с другими современными методиками получила широкое применение в клинической практике благодаря безопасности и эффективности, особенно при патологических состояниях, требующих экстренного вмешательства. Однако подобные вмешательства повреждают

исходный эндотелий, приводя к задержке эндотелизации стента и дисфункции вновь образующегося эндотелиального слоя, что способствует гиперплазии неоинтимы и рестенозу внутри стента (РВС) в отдалённом периоде [8]. Процесс эндотелизации требует баланса между активацией пролиферации гладкомышечных клеток и своевременным её ингибированием [3].

Дисфункция эндотелия является одним из ключевых факторов, способствующих развитию большинства сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, гиперлипидемию, гипертонию, ИБС и хроническую сердечную недостаточность. В последние годы проводятся исследования взаимосвязи эндотелиальных факторов, а также различных одонуклеотидных полиморфизмов кодирующих

**Адрес для корреспонденции:** kalima.bogatyreva@mail.ru.  
Тимижева К.Б.

**doi:** 10.47056/0365-9615-2021-171-2-155-158

их генов с процессом реэндартеллизации стентированных участков коронарных артерий и скоростью репарационного процесса [4,10,12]. Между тем данные литературы имеют противоречивый характер, что может объясняться, с одной стороны, гетерогенностью исследованных групп пациентов, с другой — недостаточной изученностью всех звеньев эндотелиальной системы, что не позволяет выявить общие закономерности патогенеза данного процесса.

Цель данной работы — исследовать ассоциацию полиморфных вариантов генов некоторых эндотелиальных факторов с рестенозом коронарных артерий после имплантации стентов.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании принимали участие 113 пациентов русской национальности обоих полов с ИБС, которым ранее проводилась баллонная ангиопластика со стентированием с использованием стентов с лекарственным покрытием (средний возраст —  $56.6 \pm 10.7$  г). По результатам контрольной ангиографии они были разделены на две группы: пациенты с РВС ( $N=54$ ) и пациенты без рестеноза ( $N=59$ ). Пациенты с РВС были разделены по срокам развития рестеноза (до 12 мес после проведения ЧКВ — 22 человека; более 12 мес после проведения ЧКВ — 32 человека) и возрасту (моложе 65 лет — 36 человек; старше 65 лет — 18 человек). Критерии исключения из исследования: нестабильная стенокардия, сердечная недостаточность на стадии декомпенсации, онкологические заболевания, почечная и печёночная недостаточность.

Было выполнено генотипирование по полиморфным локусам генов эндотелина-1 (*EDN1 rs5370*), рецептора эндотелина-1 (*EDNRA rs5333*), эндотелинпревращающего фермента (*ECE1 rs1076669*), а также эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS rs1549758*, *rs1799983*, *rs2070744*). Геномная ДНК была выделена из периферической крови. Генотипирование по локусу *EDN1 rs5370* осуществляли методом аллель-специфичной ПЦР с использованием наборов реагентов "SNP-экспресс" (НПФ "Литех"), по полиморфизмам гена *eNOS* — методом ПЦР в режиме реального времени с применением наборов реагентов компании "Синтол" в соответствии с протоколом производителя. Для выявления полиморфных вариантов генов *ECE1* и *EDNRA* применяли метод ПЦР с последующей рестрикцией ДНК. Режим амплификации для *EDNRA rs5333*: начальная денатурация при  $94^\circ\text{C}$  5 мин и далее 30 циклов (денатурация

30 с при  $94^\circ\text{C}$ , отжиг 30 с при  $50^\circ\text{C}$  и элонгация 30 с при  $72^\circ\text{C}$ ). Финальная элонгация проводилась при  $72^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Праймеры — F: 5'-TTTCTCACTTTCTTTAGCG-3', R: 5'-ACСТААGТААТТСАСАТCGG-3'. Рестриктию амплифицированных фрагментов осуществляли с использованием эндонуклеазы *BstAFI* ("СибЭнзим"). Фрагмент, соответствующий аллелю *T*, имел длину 154 п.н., а соответствующие аллелю *C* фрагменты — 67 и 87 п.н. Режим амплификации для *ECE1 rs1076669*: начальная денатурация при  $95^\circ\text{C}$  4 мин и далее 30 циклов (денатурация 30 с при  $95^\circ\text{C}$ , отжиг 30 с при  $64^\circ\text{C}$  и элонгация 30 с при  $72^\circ\text{C}$ ). Финальная элонгация проводилась при  $72^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Праймеры — F: 5'-TAGAGCCCTGGG CCTGTGAGGAGGAGC-3', R: 5'-СТТАССАТСТ GTCGGTTGGTGTGATG-3'. Для рестрикции амплифицированных фрагментов была использована эндонуклеаза *BstYI* ("СибЭнзим"). Фрагменты, соответствующие аллелю *C* — 172 и 38 п.н., аллелю *T* — 111, 61 и 38 п.н. Детекцию продуктов рестрикции выполняли методом вертикального электрофореза в ПААГ.

Для статистического анализа полученных данных использовали язык программирования R и пакет программного обеспечения SPSS Statistics 20. Для сравнения частот генов и генотипов в изучаемых группах применяли критерий  $\chi^2$  и точный тест Фишера. Различия оценивали как достоверные при  $p \leq 0.05$ . Также рассчитывали отношения шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (95%ДИ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полиморфный локус *ENDRA rs5333* ассоциирован с развитием атеросклероза и артериальной гипертензии [9,11], но исследование его значимости для развития РВС ранее не проводилось. При изучении распределения генотипов были выявлены достоверные различия в подгруппах пациентов с РВС моложе и старше 65 лет ( $p=0.025$ ) (таблица). Минорная гомозигота *CC* значимо чаще встречалась в подгруппе пациентов с РВС старше 65 лет, чем в подгруппе моложе 65 лет (ОШ 4.918; 95%ДИ 1.328-18.218) и в группе без рестеноза ( $p=0.004$ , ОШ 14.754; 95%ДИ 1.866-116.670).

Анализ данных по миссенс-варианту *ECE1 rs1076669* также показал достоверное различие между возрастными подгруппами ( $p=0.003$ ). Гомозигота *TT* достоверно чаще встречалась в подгруппе пациентов старше 65 лет по сравнению с младшей подгруппой (ОШ 6.343; 95%ДИ

1.780-22.607) и группой без РВС ( $p=0.021$ , ОШ 3.704; 95%ДИ 1.295-10.595). Как и в случае с вышеописанным полиморфным локусом, исследований, посвящённых данному полиморфизму, мало [7], и у пациентов с рестенозом он не рассматривался.

Полиморфизм гена *EDN1 rs5370* в настоящее время уже достаточно широко изучен, показана его ассоциация с дислипидемией, ИБС и артериальной гипертензией [2]. Анализ распределения генотипов и аллелей по указанному полиморфизму выявил достоверные отличия между пациентами с РВС, развившимся ранее 12 мес после ЧКВ и позднее ( $p=0.005$ ), а также старше и моложе 65 лет ( $p=0.033$ ). Следует отметить, что во всех изученных подгруппах преобладают гетерозиготы *GT*, что особенно

выражено в подгруппе с ранним рестенозом. Минорная гомозигота *TT* достоверно чаще, чем в других подгруппах, встречалась только у пациентов с РВС старше 65 лет.

В ряде исследований продемонстрирована значимая роль полиморфизмов *eNOS rs1799983* и *rs2070744* в развитии атеросклероза, артериальной гипертензии, стенокардии и острого инфаркта миокарда, гипергомоцистеинемии [5,6]. Существуют отдельные исследования, показавшие ассоциацию аллеля *C* по полиморфизму *rs2070744* с развитием РВС у пациентов после имплантации стентов с лекарственным покрытием [12] и наличие взаимосвязи гетерозиготного генотипа *GT rs1799983* с рестенозом [1]. Анализ распределения генотипов по полиморфизму *eNOS rs1549758*, проведённый в рамках

Частоты генов и генотипов (%) по полиморфным локусам генов эндотелина-1 (*EDN1 rs5370*), рецептора к эндотелину-1 (*EDNRA rs5333*), эндотелинпревращающего фермента (*ECE1 rs1076669*) и эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS rs1549758*, *rs1799983* и *rs2070744*) в исследованных группах

Полиморфный локус	Генотипы и аллели	Группа с РВС (N=54)	Группа без РВС (N=59)	Подгруппы с РВС			
				младше 65 лет (N=36)	старше 65 лет (N=18)	ранее 12 мес после ЧКВ (N=22)	позднее 12 мес после ЧКВ (N=32)
<i>EDNRA rs5333</i> (H323H)	<i>TT</i>	70	75	75	61	64	75
	<i>TC</i>	24	24	22	27	27	22
	<i>CC</i>	6	1	3	12**	9	3
	<i>T</i>	82	87	86	74.5	77.5	86
	<i>C</i>	18	13	14	25.5	22.5	14
<i>ECE1 rs1076669</i> (Thr341Ile)	<i>CC</i>	72	73	75	67	73	72
	<i>CT</i>	20	22	22	16	23	19
	<i>TT</i>	8	5	3	17**	4	9
	<i>C</i>	82	84	86	75	84.5	81.5
	<i>T</i>	18	16	14	25	15.5	18.5
<i>EDN1 rs5370</i> (Lys198Asn)	<i>GG</i>	30	25	33	22	18	38
	<i>GT</i>	65	70	64	67	77°	56
	<i>TT</i>	5	5	3	11**	5	6
	<i>G</i>	62.5	60	65	55.5	56.5	66
	<i>T</i>	37.5	40	35	44.5	43.5	34
<i>eNOS rs1549758</i> (C774T)	<i>CC</i>	30	36	25	39	18	37.5
	<i>CT</i>	28	20	33*	17*	41*°	19
	<i>TT</i>	42	44	42	44	41	43.5
	<i>C</i>	44	46	41.5	47.5	38.5	47
	<i>T</i>	56	54	58.5	52.5	61.5	53
<i>eNOS rs1799983</i> (Glu298Asp)	<i>GG</i>	54	53	50	61	45	59
	<i>GT</i>	37	37	39	33	50°	28
	<i>TT</i>	9	10	11	6	5°	13
	<i>G</i>	72.5	71.5	69.5	77.5	70	73
	<i>T</i>	27.5	28.5	30.5	22.5	30	27
<i>eNOS rs2070744</i> (T-786C)	<i>TT</i>	39	34	39	39	41	37.5
	<i>TC</i>	39	44	36	44	36	41
	<i>CC</i>	22	22	25	17	23	21.5
	<i>T</i>	58.5	56	57	61	59	58
	<i>C</i>	41.5	44	43	39	41	42

Примечание.  $p \leq 0.05$  по сравнению \*с группой без РВС, \*с подгруппой РВС младше 65 лет, °с подгруппой РВС позднее 12 мес после ЧКВ.

нашего исследования, выявил достоверно более высокую частоту гетерозиготных носителей в подгруппе с ранним РВС, чем с поздним ( $p=0.0005$ ) и группой без рестеноза ( $p=0.001$ , ОШ 2.78; 95%ДИ 1.478-5.227). Достоверные различия выявлены также между пациентами с РВС моложе и старше 65 лет ( $p=0.016$ ). Гетерозиготы чаще встречались в младшей подгруппе по сравнению как с подгруппой старше 65 лет (ОШ 2.405; 95%ДИ 1.233-4.689), так и с группой без РВС (ОШ 1.97; 95%ДИ 1.035-3.749). Анализ данных по полиморфизму *eNOS rs1799983* не выявил достоверной связи с рестенозом в целом, но распределение генотипов в подгруппах с ранним и поздним рестенозом достоверно различалось ( $p=0.003$ ): в подгруппе с поздним РВС чаще встречались минорные гомозиготы, но была ниже встречаемость гетерозигот. Полученные результаты позволяют полагать, что данный полиморфный локус может иметь прогностическую ценность при определении возможных сроков развития РВС при наличии прочих предрасполагающих факторов. Ассоциации полиморфизма *eNOS rs2070744* с рестенозом в данном исследовании выявлено не было.

Результаты проведенного исследования продемонстрировали гетерогенность выборки пациентов с РВС и необходимость их стратификации по возрасту и срокам развития рестеноза. Установлено, что изученные полиморфные локусы генов эндотелиновой системы более значимы для лиц старше 65 лет. Гомозиготный минорный генотип по полиморфизмам *EDN1 rs5370*, *EDNRA rs5333*, *ECE1 rs1076669* достоверно чаще встречается у пациентов старшей возрастной группы с РВС. Полиморфизмы гена эндотелиальной NO-синтазы преимущественно ассоциированы со сроком развития рестеноза. Гетерозиготность по полиморфным локусам *eNOS rs1799983* и *eNOS rs1549758* предрасполагает к раннему развитию рестеноза, в то время как гомозиготность по минорному аллелю *T eNOS rs1799983* ассоциирована с рестенозом, развивающимся более чем через 1 год после ЧКВ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Огородова Л.М., Рукин К.Ю., Винтизенко С.И., Петрова И.В. Полиморфизм гена eNOS как фактор риска рестенозирования в стенте // Вестник РАМН. 2017. Т. 72, № 2. С. 120-125. doi: 10.15690/vramn796
2. Ahmed M., Rghigh A. Polymorphism in endothelin-1 gene: an overview // Curr. Clin. Pharmacol. 2016. Vol. 11, N 3. P. 191-210. doi: 10.2174/1574884711666160701000900
3. Hirschi K.K., Ingram D.A., Yoder M.C. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008. Vol. 28, N 9. P. 1584-1595. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.155960
4. Hu H., Jiang C., Li R., Zhao J. Comparison of endothelial cell- and endothelial progenitor cell-derived exosomes in promoting vascular endothelial cell repair // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2019. Vol. 12, N 7. P. 2793-2800.
5. Levinsson A., Olin A.C., Björck L., Rosengren A., Nyberg F. Nitric oxide synthase (NOS) single nucleotide polymorphisms are associated with coronary heart disease and hypertension in the INTERGENE study // Nitric Oxide. 2014. Vol. 39. P. 1-7. doi:10.1016/j.niox.2014.03.164
6. Oliveira-Paula G.H., Lacchini R., Tanus-Santos J.E. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases // Nitric Oxide. 2017. Vol. 63. P. 39-51. doi:10.1016/j.niox.2016.08.004
7. Seremak-Mrozikiewicz A., Barlik M., Perlik M., Kurzawińska G., Drews K. Genetic variability of endothelin-1 system in gestational hypertension and preeclampsia // Ginekol. Pol. 2011. Vol. 82, N 5. P. 363-370.
8. Sprague E., Luo J., Palmaz J.C. Static and flow conditions: endothelial cell migration onto metal stent surfaces // J. Long Term Eff. Med. Implants. 2017. Vol. 27, N 2-4. P. 97-110. doi: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.v27.i2-4.10
9. Sugawara J., Tomoto T., Noda N., Matsukura S., Tsukagoshi K., Hayashi K., Hieda M., Maeda S. Effects of endothelin-related gene polymorphisms and aerobic exercise habit on age-related arterial stiffening: a 10-yr longitudinal study // J. Appl. Physiol. (1985). 2018. Vol. 124, N 2. P. 312-320. doi: 10.1152/jappphysiol.00697.2017
10. Xu B.Y., Xiang M.X., Wang J.A. Endothelial progenitor cells and in-stent restenosis // Curr. Stem Cell Res. Ther. 2015. Vol. 10, N 4. P. 364-371. doi: 10.2174/1574888x10666150204150430
11. Yasuda H., Kamide K., Takiuchi S., Matayoshi T., Hanada H., Kada A., Yang J., Miwa Y., Yoshii M., Horio T., Yoshihara F., Nakamura S., Nakahama H., Tei C., Miyata T., Kawano Y. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension // J. Hum. Hypertens. 2007. Vol. 21, N 11. P. 883-892. doi: 10.1038/sj.jhh.1002234
12. Zeng W.P., Zhang R., Li R., Luo J.F., Hu X.F. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene T786C polymorphism with in-stent restenosis in chinese han patients with coronary artery disease treated with drug-eluting stent // PLoS One. 2017. Vol. 12, N 1. ID e0170964. doi:10.1371/journal.pone.0170964