

*На правах рукописи*

**Рукин Константин Юрьевич**

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ NO-СИНТАЗ В СТРУКТУРЕ  
ПОДВЕРЖЕННОСТИ РАЗВИТИЮ РЕСТЕНОЗОВ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ  
КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ**

14.03.03 — «Патологическая физиология»

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

член-корреспондент Российской  
академии наук,  
доктор медицинских наук,  
профессор

Огородова Людмила Михайловна

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор,  
директор Института  
персонализированной медицины,  
профессор кафедры кардиологии,  
функциональной и ультразвуковой  
диагностики ФГАОУ ВО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава России  
(Сеченовский Университет), г. Москва

Копылов Филипп Юрьевич;

доктор медицинских наук, доцент Шилов Сергей Николаевич  
кафедры патологической физиологии и  
клинической патофизиологии ФГБОУ  
ВО НГМУ Минздрава России, г.  
Новосибирск

**Ведущая организация:** ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово).

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке СибГМУ и на сайте [www.ssmu.ru](http://www.ssmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) - органическое и функциональное поражение миокарда, широко распространенное заболевание. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) только в 2017 году из 17,3 млн случаев смертей от сердечно-сосудистых заболеваний 7,3 млн произошли по причине ИБС (Wilcox J.N. et al., 2007; Vecoli C. et al., 2012; Juni R.P. et al., 2016; Березикова Е.Н. и др., 2017; Бойцов С.А. и др., 2017; Осипова Е.С. и др., 2018).

Для лечения ИБС, наряду с медикаментозной терапией, широко используют такие малоинвазивные методы, как пункционное (чрескожное) коронарное вмешательство (ЧКВ) и коронарное шунтирование (Мареев В.Ю. и др., 2013; Mendis S. et al., 2013; Гарднер Р.С. и др., 2014). Сегодня этот способ коронарной реваскуляризации в стенозные сегменты коронарных артерий (КА), поражённые атеросклерозом, является штатной манипуляцией. Ангиопластика и установка стентов характеризуются отсутствием абсолютных противопоказаний и малоинвазивностью. Дополнительным плюсом стентирования является незначительный уровень острых осложнений по сравнению с иными инвазивными методами. Главной проблемой сегодня остаются ограничения применения голометаллических эндопротезов при ЧКВ, обусловленные высокой (до 32 %) вероятностью развития в первые 6 месяцев после их установки повторного стеноза, морфологически проявляющегося формированием «неоинтимы» с избыточным количеством внеклеточного матрикса (Beohar N. et al., 2004; Chen A.F. et al., 2011; Byrne R. et al. 2015; Kayhan F.E. et al., 2017).

Внедрение в клиническую практику эндоваскулярного протеза с фармакодинамическим эффектом позволило снизить вероятность повторного сужения артерий в зоне установки стента благодаря лекарственному антипролиферативному покрытию (СЛП) (Мареев В.Ю. и др., 2013). В стентах такого типа лекарственный препарат, являющийся оболочкой эндопротеза, постепенно высвобождается, подавляя пролиферацию эндотелиоцитов сосудов, что тормозит в КА ремоделирование стенки сосуда (Athappan G. et al., 2009; Redwood S.R. et al., 2013; Шамес Д.В. и др., 2017; Forconi S. et al., 2017). Однако, при использовании даже таких видов стентов частота рестеноза может достигать 12 % (Marsh N. et al., 2011; Li J. et al., 2012; Mehran R., 2015). В этом контексте не теряет актуальности поиск новых прогностических параметров, включая генетически обусловленных, которые увеличивают риск рестеноза после стентирования.

### **Степень разработанности темы исследования**

Ассоциация риска развития рестеноза в стенте с полиморфизмами генов систем гемостаза, ренин-ангиотензиновой, противовоспалительной и антиоксидантной, рецептора витамина D (Kastrati A. et al., 2000; Ortlepp J.R. et al., 2001; Ryu S.K. et al. 2002; Chiou K.R. et al., 2005; Wijpkema J.S. et al. 2006; Бузиашвили Ю.И., 2018), а также распределения генотипов и аллелей

полиморфизмов Glu298Aps и -786T/C гена эндотелиальной NO синтазы (*eNOS*, *NOS3*) (Humphries et al., 2002; Suzuki T. et al., 2002; Colombo A. et al., 2008; Dai X. et al., 2016) является предметом пристального изучения во всём мире.

Дисфункция эндотелия как самая ранняя фаза повреждения КА напрямую связана с NO-синтазой. Сегодня этот факт уже является аксиомой. В то же время отсутствуют комплексные исследования, посвященные анализу ассоциации полиморфизмов генов (*eNOS*, *NOS3*), а также индуцибельной NO-синтазы (*iNOS*, *NOS2*) с риском развития рестеноза в стенке.

Данный факт обосновывает актуальность тематики заявленного исследования, поскольку его практические результаты могут предоставить новые знания о роли варибельности полиморфизмов генов NO-синтаз в развитии пролиферации сосудистой стенки стентированных КА у больных с ИБС.

### Цель работы

Установить роль полиморфизмов генов индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз в структуре подверженности русской этнической группы Сибирского региона к рестенозу коронарных артерий после стентирования у больных ишемической болезнью сердца, а также определить молекулярные механизмы их влияния на формирование эндотелиальной дисфункции.

### Задачи исследования

1. Определить частоту полиморфизмов генов *iNOS* (*CCTTT*)*n*, *eNOS* (*G894T*, *VNTR*, *774C/T*, *-786T/C*, *691C/T*) в группе больных ИБС и контрольной группе.
2. Оценить частоту полиморфных вариантов генов *iNOS* (*CCTTT*)*n*, *eNOS* (*G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C*, *691C/T*) в группах пациентов, перенесших стентирование КА, и установить вероятность формирования рестеноза.
3. Выявить основные предрасполагающие этиологические факторы развития рестенозирования коронарных артерий после стентирования у пациентов с ИБС.
4. Изучить механизмы участия полиморфизмов генов NO-синтаз в развитии эндотелиальной дисфункции и рестеноза в стенке методом молекулярно - динамического моделирования.

### Научная новизна

Впервые проведена оценка риска развития ИБС и рестенозирования у пациентов, перенесших стентирование коронарных артерий, носителей полиморфных вариантов генов *iNOS* (*CCTTT*)*n*, *eNOS* (*G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T*). Установлено, что риск развития ИБС достоверно выше у пациентов – носителей полиморфизмов генов синтазы монооксида: *G894T* (гетерозигот *GT* и гомозигот по аллелю *T*), *-T786C* (гомозигот по аллелю *C*), *VNTR* (гомозигот по минорному *a*-аллелю) гена эндотелиальной *NOS* и гена индуцибельной синтазы монооксида - полиморфизм (*CCTTT*)*n* (гетерозигот по аллелю *X*). Риск развития данной нозологии снижен у носителей полиморфизма *G894T* гена *eNOS* (гомозигот по аллелю *G*).

Впервые показано, что риск развития рестеноза КА после установки стента у больных ИБС ассоциирован с гомозиготой по минорному аллелю *a* и гетерозиготой *ab* (полиморфизм *VNTR* гена *eNOS*), а также гомозиготой по минорному аллелю *T* и гетерозиготой *GT* (полиморфизм *894 G/T* гена *eNOS*). Носительство гомозиготного варианта по «дикому» аллелю *b* и (или) «дикому» аллелю *G* полиморфизма *VNTR* и *894 G/T* ассоциировано с низким риском рестенозирования КА.

Получены новые данные, что среди страдающих ИБС в русской этнической группе Сибирского региона гаплотип *TCabGT11* является предрасполагающим фактором развития рестеноза в стенте, а при наличии у пациента гаплотипа *TTabGG11* риск рестенозирования достоверно ниже.

Исследование ассоциации носительства аллельных вариантов генов *NO*-синтаз с рестенозом коронарных артерий у больных ИБС после стентирования впервые продемонстрировало, что замена в аминокислотной последовательности *Glu298Asp* приводит к значительным конформационным изменениям отдельных структур внутри фермента. В результате этого количество белка уменьшается, что приводит к недостаточности синтеза эндогенного оксида азота (*NO*) и развитию эндотелиальной дисфункции, ведущей к рестенозу.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты диссертационной работы имеют фундаментальное значение для исследований в области изучения генетических детерминант рестенозирования КА, а также расширяют имеющиеся представления о патогенезе эндотелиальной дисфункции.

Результаты оценки нарушений в зависимости от аллельных вариантов генов *iNOS (CCTTT)<sub>n</sub>*, *eNOS (G894T, VNTR, 774 C/T, -786T/C и 691C/T)* представляются значимыми с позиции новых знаний о механизмах формирования эндотелиальной дисфункции и, как следствие, развития рестеноза в стенте. В дальнейшем для подтверждения данного факта планируется масштабное популяционное исследование.

Выделение ДНК из лейкоцитарной взвеси с последующим определением у пациентов перед стентированием КА полиморфизмов *VNTR* и *894 G/T* гена *eNOS*, а также гаплотипа *TCabGT11* играет важную роль при формировании групп риска с последующей индивидуальной коррекцией у них лечебных и профилактических мероприятий, направленных на предотвращение рестеноза в стенте.

Полученные новые знания о полиморфизме *894G/T* гена *eNOS*, гаплотипах *TCabGT11* и *TTabGG11*, клинических предрасполагающих этиологических факторах рестенозирования (высокая протяженность, степень стеноза коронарных артерии, а также наличие артериальной гипертензии в анамнезе) обосновывают необходимость коррекции дооперационных мероприятий, направленных на исключение использования стентов без лекарственного покрытия. Результаты научного исследования могут служить основой для разработки новых подходов к профилактической терапии, которая направлена на предотвращение развития гиперплазии интимы и эндотелиальной дисфункции.

Результаты работы применяются на кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Министерства здравоохранения РФ в виде лекционного теоретического материала, а также на практических занятиях студентов лечебного и педиатрического факультетов вуза.

### **Методология и методы исследования**

Дизайн клинических исследований, наряду с набором практических методов, позволяет получить релевантную информацию об ассоциации полиморфизмов генов *eNOS* (*G894T*, *-786T/C*, *VNTR*) и *iNOS* (*CCTTT*)<sub>n</sub> с риском развития ИБС и рестенозирования стентов, а также установить патогенетические факторы развития рестеноза. В работе применен комплекс современных методологических приемов и высокоинформативных клинических, инструментальных, молекулярно-биологических методов исследований, а также технологии компьютерного и молекулярного моделирования с анализом трехмерных структур исследуемых ферментов. Многообразие использованных в исследовании методик позволяет получить достоверные данные о типе, характере и механизмах влияния полиморфизмов генов *NO*-синтаз на формирование ИБС и развитие рестенозирования после стентирования коронарных артерий.

Исследование проведено на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт кардиологии» (директор НИИ кардиологии Томского НИМЦ, доктор медицинских наук, академик РАН С.В. Попов), Центральной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заведующий ЦНИЛ доктор медицинских наук, профессор РАН Е.В. Удут).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Риск развития рестеноза коронарных артерий после стентирования связан с полиморфизмами *VNTR* и *G894T* гена *eNOS* при ишемической болезни сердца. Установлено, что данные полиморфные варианты также ассоциированы с риском развития ишемической болезни сердца.

2. Предрасполагающими этиологическими факторами развития рестенозирования после стентирования коронарных артерий являются высокая протяженность и степень стеноза коронарных артерий, артериальная гипертензия в анамнезе, наличие носительства у больных с ИБС полиморфизма *894G/T* гена *eNOS* и гаплотипа *TCabGT11*.

3. Биоинформационное моделирование полиморфизма *894G/T* гена *eNOS* демонстрируют конформационные перестройки внутри фермента, которые сопровождаются разрушением вторичной структуры белка и уменьшением продукции оксида азота.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая достоверность полученных результатов основана на использовании единого протокола обследования больных, высокоинформативных методик, достаточном в аспекте принципов доказательной медицины объеме клинического материала (764 человека) и современной статистической обработке количественных показателей.

### **Апробация работы**

Результаты исследования освещены в постерных докладах на международном конгрессе «The International Conference on Bioinformatics & Computational Biology» (г. Лас-Вегас, 2014); Российском национальном конгрессе кардиологов (г. Екатеринбург, 2016); IX Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз -Россия — 2016» (г. Томск, 2016).

### **Публикации**

По материалам проведенного исследования в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, опубликовано пять полнотекстовых статей.

### **Объем диссертации и её структура**

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок, 9 таблиц и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследования, обсуждение полученных результатов, заключение и выводы. Список литературы содержит 253 библиографических источника, из них 38 отечественные, 215 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Критерии формирования клинических групп**

Данная работа основана на результатах, полученных в ходе обследования 764 представителей русской этнической группы Сибирского региона (Томская, Кемеровская области и Красноярский край), из которых 484 пациента – с верифицированным диагнозом ИБС. Контрольную группу составили 280 человек. Выборка группы проведена из числа пациентов отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца (руководитель – д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник Е.Н. Павлюкова) ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт кардиологии» (директор НИИ кардиологии Томского НИМЦ, доктор медицинских наук, академик Российской академии наук С.В. Попов). Протокол исследования от 16 октября 2018 г. № 6173 согласован и одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Для достижения поставленных целей исследования пациенты разделены на 3 клинические группы.

Клиническую группу I составили 484 пациента со стабильной стенокардией. На основании анализа результатов специальных исследований у пациентов данной группы выполнен первый этап работы — проведена оценка риска развития ИБС в зависимости от генотипа полиморфных вариантов изучаемых генов: выбраны молекулярные мишени, степень ассоциации которых с риском развития рестеноза в стенке определена на втором этапе данного исследования.

Характеристика больных I группы:

- возраст 45–75 лет;
- ИБС, характеризующаяся устойчивой формой стенокардии и достоверно диагностированным коронарным атеросклерозом;
- ангиографически документированный стеноз 1 или 2 магистральных КА (со степенью сужения от 75 до 100 %);
- протяженность стеноза от 6 до 30 мм.

В клиническую группу II включены 150 человек, подвергшихся стентированию КА без выявления в последующем периоде ангиографических признаков рестеноза (постоперационный период 6–57 месяцев).

Характеристика пациентов группы II:

- возраст 45–75 лет;
- ИБС, характеризующаяся устойчивой формой стенокардии и достоверно диагностированным коронарным атеросклерозом;
- стентирование эндопротезами голометаллическими или СЛП;
- локализация импланта преимущественно в проксимальных артериальных отделах;
- пролиферация неоинтимы на интактном участке от 0 до 25 %;
- отсутствие ангиографических и клинических признаков рестенозирования в стенке через 6–57 месяцев.

Клиническая группа III объединила 62 пациента, у которых диагностированы ангиографические признаки сосудистого ремоделирования с рестенозом проксимального отдела коронарной артерии более чем на 50 % в течение 2,5–65 месяцев после установки стента.

Характеристика пациентов группы III:

- возраст 45–75 лет;
- ИБС со стабильной формой стенокардии и верифицированным коронарным атеросклерозом;
- локализация стента преимущественно в проксимальных отделах артерий;
- пролиферация неоинтимы на интактном участке от 50 до 90 %;
- ангиографические и клинические признаки рестенозирования в стенке через 2,5–65 месяцев.

**В исследование не включались пациенты со следующими признаками:**

- острый инфаркт миокарда и постинфарктные осложнения, нуждающиеся в хирургическом вмешательстве;



- выраженная сердечная недостаточность или отек легких;
- операция аортокоронарного шунтирования в анамнезе;
- сопутствующая патология сердечно-сосудистой системы (клапанные пороки сердца, аневризма аорты и т.п.), являющаяся показанием к хирургическому лечению;
- тяжелые нарушения проводимости и ритма сердца (атриовентрикулярная блокада II–III степени, частые полиморфные желудочковые экстрасистолы, пароксизмы желудочковой тахикардии, мерцательная аритмия, имплантированный искусственный водитель сердечного ритма);
- наследственные гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия;
- сахарный диабет (СД) I типа или декомпенсированный II типа;
- онкологическое заболевание;
- печеночная и (или) почечная недостаточность;
- злоупотребление алкоголем и никотином;
- прием антиоксидантных препаратов;
- отказ пациента от исследования.

Пациенты до и после операции принимали препараты, входящие в терапию, определенную стандартным протоколом: бета-адреноблокаторы, аспирин, статины, при наличии показаний пациентам назначали антагонисты кальция и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента. При проведении операции по поводу ангиопластики всем пациентам интракоронарно вводились 250 мкг глицеринтринитрата и внутриаартериально 70 Ед/кг гепарина натрия. Пациентам был назначен клопидогрела гидросульфат в форме II в течение 3–5 суток до 12 месяцев после операции по поводу стентирования. Взятие крови осуществлялось с соблюдением преаналитических требований.

В контрольную группу включены 280 человек обоих полов в возрасте 49 – 70 лет без нарушений здоровья: их обследование показало отсутствие сердечно - сосудистых заболеваний, а сопутствующие хронические болезни других систем организма были в стадии ремиссии.

## Методы исследования

**Подготовка венозной крови для молекулярно-биологических исследований.** Венозную кровь смешивали с 3 % ЭДТА в пропорции 4:1, затем в течение 45–60 минут инкубировали при температуре 37 °С. Пастеровской пипеткой осторожно собирали слой плазмы, образовавшийся над эритроцитами, и переносили плазму в стерильную пробирку. Затем добавляли 0,9 % раствор NaCl в пропорции 1:1, центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 10 минут и удаляли супернатант с последующим повторением процедуры. Для дальнейшего исследования использовали только осадок (Херрингтона С. и др., 2000).

**Выделение геномной ДНК.** Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты из цельной крови осуществляли стандартным методом экстракции смесью фенол-хлороформа (Куба, А.А., 2015; Херрингтона С. и др., 2000).

**Полимеразная цепная реакция.** Амплификацию осуществляли в микропробирках «эппендорф» объемом 0,5 мл на четырехканальном ДНК - амплификаторе «Терцик» и ДТ-96. Смесь представляла собой (50 мкл): 67 мМ Трис-НСl, рН = 8,8; 16,7 мМ сульфат аммония; 1,5 мМ хлорид магния; по 0,2 мМ каждого нуклеозидтрифосфата; 0,1 % твин-20; 2 ед. tag-полимеразы; 50–100 нг ДНК матрицы; по 5 пМ каждого из специфических праймеров:

**eNOS (894G/T):**

f5'-GGCTGGACCCCAGGAAA-3',  
r5'-CCACCCAGTCAATCCSTTTG - 3';

**eNOS (VNTR):**

f5'-GGCAGGTGTGAGGAGCATCC-3',  
r5'-GCCTCCGTTGTTCTCAGGTA-3';

**eNOS (-786 T/C):**

f5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3',  
r5'-GCCTCCACCCACCCCTGTC-3'

**NOS3 (774 C/T):**

f5'-AGGCGGGGCTCTGACCAGCTCTTCCCCAT-3',  
r5'-ACCTTGGGGACACCCTCATGGGTGGCC-3';

**NOS3 (691 C/T):**

f5'-CAGCCCTAGTCTCTCTGCTGACTGCGGCCC-3',  
r5'-CCACAGGGACCTCTAGGGTCATGCAGGTTTC-3';

**NOS2 (CCTTT)n:**

f5'-ACCCCTGGAAGCCTACAAC-3',  
r5'-GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA-3',

Детекцию проводили в режиме реального времени в 2 % агарозном геле с использованием ТБ-буфера (5,4 г Трис; 2,75 г борной кислоты; 0,46 г ЭДТА; dH<sub>2</sub>O до 1 л, рН = 8,3) с бромистым этидием (2 мкл/100 мл буфера). Электрофорез проводили при напряжении 20 В/см в течение 10 минут (Херрингтона С. и др., 1999). Визуализацию результатов проводили на видеосистеме BIOTEST-D.

**ПДРФ-анализ.** Гидролиз полученного амплификата осуществляли с помощью рестриктазы на протяжении 24 часов при необходимой температуре. eNOS (774C/T): Fok I, NOS3 (-786T/C): Msp I, NOS3 (894G/T): Frio I, NOS3 (691C/T): BsoFI. Состав смеси для рестрикции включал от 5 до 7 мкл амплификата, 1,0–1,2 мкл буфера для рестрикции, и 1 - 5 единиц активности фермента. Полученные продукты рестрикции разгоняли в 3 % агарозном геле или 6 % полиакриламидном геле (при использовании агарозного геля - 30 минут, напряжение 120 В, в полиакриламидном геле - 120 минут, напряжение 160 В). После окраски интеркалирующим агентом EtBr участки дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) визуализировали в ультрафиолетовом свете с использованием видеосъемки и прибора «UV-VIS Imager-II».

**Биоинформационная модель.** Использованы методы молекулярного моделирования с анализом трехмерных структур исследуемых ферментов. Трехмерные структурные модели пространственной организации исследуемых белков найдены в банке данных PDB (<http://www.pdb.org>) и банке моделей ModBase (<http://modbase.compbio.ucsf.edu>). Необходимые замены внесены в аминокислотную последовательность при помощи программы SwissPDB Viewer. Исследование молекулярной динамики проводили при помощи пакета программ GROMACS 4.6. Анализ полученных траекторий молекулярной динамики проводили различными алгоритмами по следующим параметрам: анализ количество водородных связей, RMSD (среднеквадратичное отклонение положения атомов молекулы во времени), RMSF (измерение отклонения конкретной частицы (атома, остатка) от ее первоначального состояния), DSSP (площадь поверхности атомов во вторичной структуре белка), SAS (измерение

площади поверхности молекулы, доступной для растворителя). Значения, полученные в ходе симуляций модифицированных ферментов, сравнивались с соответствующими значениями, полученными при симуляции молекулярной динамики нормальной NO-синтазы.

**Статистическая обработка данных.** Расчёт статистических показателей проводили в программной среде R версии v3.2.0 (R Core Team, 2017). За уровень статистической значимости принято значение  $p < 0,05$ .

Для оценки нормальности распределения по величинам показателей использовали критерий Шапиро – Уилка. Описательные статистики рассчитывали по общепринятым методикам:

- для количественных признаков при нормальном распределении рассчитывали среднее (M) и стандартное ( $\sigma$ ) отклонение;
- при отклонении распределения от нормального вычисляли медиану (Me) и 25 %–75 % квантили;
- качественные показатели определяли в абсолютной частоте и относительных долях (в %) встречаемости значений.

Для сравнения пациентов по количественным признакам при их нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента. Сравнение по количественным признакам при отличном от нормального распределения происходило по критерию Манна – Уитни.

Для сравнения частот распределения по качественным признакам между группами использовали таблицы сопряженности и критерий  $\chi^2$  (с поправкой Йетса при ожидаемых частотах менее 10, но более 5) или точный критерий Фишера (при ожидаемых частотах, равных 5 и менее). Для долей встречаемости отдельных гаплотипов у пациентов в группах дополнительно рассчитывали 95 % доверительные интервалы.

Попарное сравнение частот генотипов и аллелей в группах больных и здоровых лиц производили по критерию хи-квадрат для таблиц сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность.

Соответствие наблюдаемых частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга осуществляли с использованием критерия  $\chi^2$  ( $\chi^2 = \sum (H - O)^2 / O$ , где H - наблюдаемое значение; O - ожидаемое значение;  $\Sigma$  - символ, обозначающий суммирование по всем сериям эксперимента).

Для поиска зависимостей исхода от величин разных показателей и с целью поиска предикторов осуществлялся анализ с использованием однофакторной логистической регрессии. Оценка чувствительности и специфичности предикторов проводилась посредством ROC - кривых.

Расчет гаплотипов осуществлялся при помощи программы Arleguin 3.1.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В исследование было включено 764 представителя русской этнической группы Сибирского региона, из которых 484 пациента с ИБС, а 280 человек составили контрольную группу.

Средний возраст пациентов с ИБС составил  $61,1 \pm 9,04$  года. Среди них 74,9 % (363 чел.) – лица мужского пола и 25,1 % (121 чел.) - женского. Артериальной гипертензия в анамнезе установлена у 51,86 % (251 чел.), компенсированный сахарный диабет II типа — у 5,79 % (28 чел.). В среднем степень сужения артерии составила  $80,52 \pm 15,88$  %. Сравнительная характеристика пациентов I и контрольной клинических групп представлена в таблице 1.

**Таблица 1 – Сравнительная характеристика пациентов I и контрольной клинических групп**

Показатель	Группа I (с ИБС), n=484	Контрольная группа, n= 280	p
Возраст, лет	61,1±9,04	60,81±6,80	0,59
Мужчины	363 (74,9 %)	190 (67,9 %)	0,040
Женщины	121 (25,1 %)	90 (32,1 %)	0,040
АГ	251 (51,86 %)	0 (0 %)	< 0,001
СД	28 (5,79 %)	0 (0 %)	< 0,001
ИМ	238 (49,17 %)	0 (0 %)	< 0,001

Примечание. АГ — артериальная гипертензия в анамнезе; СД — сахарный диабет II типа в анамнезе; ИМ — инфаркт миокарда

По возрасту пациенты этих групп между собой не различались. Доля мужчин была выше в группе I по сравнению с контрольной (74,9 % против 67,9 %), доля женщин – ниже (25,1 % против 32,1 %). У всех пациентов контрольной группы в анамнезе отсутствовали АГ, СД и ИМ.

Общее количество пациентов, направленных на стентирование, составило 212 чел. Из них в группу пациентов без рестеноза вошло 150 чел. (II группа), с рестенозом – 62 чел. (III группа).

В группе без рестеноза средний возраст пациентов составил  $58,9 \pm 8,85$  лет, число мужчин - 84 % (126 чел.), женщин - 16 % (24 чел.). Артериальную гипертензию в анамнезе имели 25,33 % (40 чел.) и 8 % (12 чел.) - компенсированный сахарный диабет II типа. Медиана степени сужения артерии составила 75 (75;100) %; средняя степень сужения артерии -  $82,95 \pm 11,42$  %. Медиана длины пораженного участка - 16 (10,5;21,75) мм; средняя длина пораженного участка -  $16,47 \pm 6,92$  мм (см. таблицу 2).

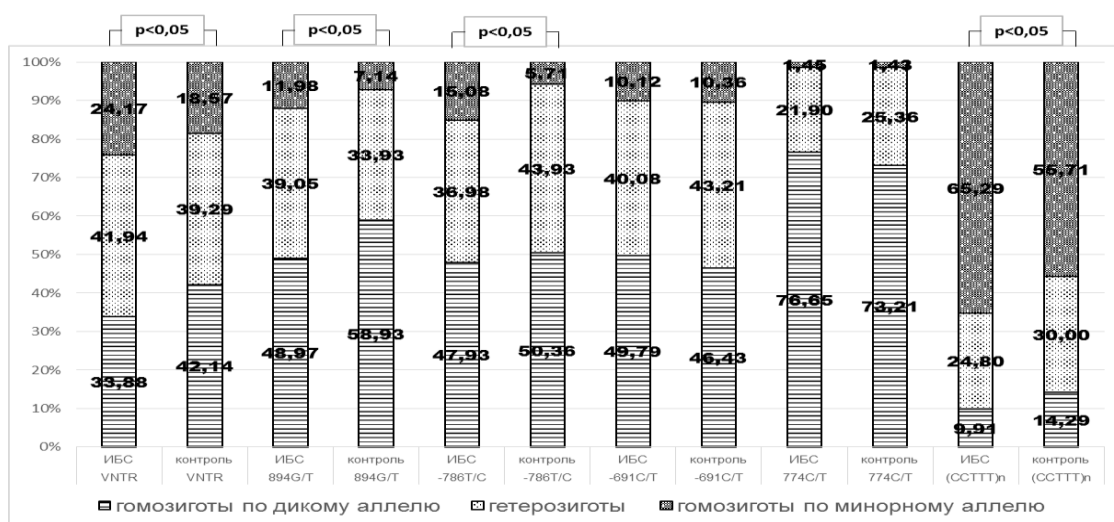
В группе с рестенозом средний возраст составил  $59,1 \pm 9,65$  лет, число лиц мужского пола - 77,42 % (48 чел.), женского - 22,58 % (14 чел.). В группе с рестенозом 59,68 % обследованных имели в анамнезе артериальную гипертензию и 9,68 % (6 чел.) - сахарный диабет II типа. Медиана степени сужения артерии составила 75 (75;75) %; средняя степень сужения артерии -  $67,31 \pm 31,67$  %.

Медиана длины пораженного участка - 21 (12,5;28) мм; средняя длина пораженного участка -  $21,2 \pm 9,61$  мм (см. таблицу 2).

Частота страдающих АГ была выше в группе пациентов с рестенозом - 59,68 % против 25,33 % в группе пациентов без рестеноза.

Для выявления или исключения ассоциации полиморфизма генов NOS с ИБС исследованы пять полиморфизмов гена eNOS (*G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T*) и один полиморфизм гена iNOS (*CCTTT*)<sub>n</sub>.

Генотипы полиморфизмов *774 C/T* и *691C/T* гена eNOS находились в соответствии с равновесием Харди - Вайнберга. Обнаружены статистически значимые отклонения распределения генотипов полиморфизма *G894T*, *VNTR*, *-786T/C* гена eNOS ( $p < 0,05$ ) и статистически значимое ( $p < 0,05$ ) отклонение распределения генотипов полиморфизма (*CCTTT*)<sub>n</sub> гена iNOS от равновесия Харди-Вайнберга. Нами изучено распределение частот генотипов полиморфизмов генов NOS (рис. 1).



**Рисунок - Распределение генотипов полиморфизмов *G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T* гена eNOS и полиморфизм (*CCTTT*)<sub>n</sub> гена iNOS**

Носители гомозигот по *T*-аллелю (генотип *TT*) полиморфизма *G894T* гена eNOS чаще встречались в группе пациентов с ИБС (11,88% против 7,14%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля. Расчет показал достоверно более высокие риски развития ИБС у пациентов-гетерозигот *GT* и гомозигот *TT* ( $OR = 1,25$  и  $1,77$ ,  $p < 0,05$ ) соответственно.

Сходные данные получили наши коллеги из Китая. Согласно результатам метаанализа, проведенного у 2994 пациентов с ИБС и 3130 лиц контрольной группы, установлена важная роль полиморфизма *G894T* гена eNOS в развитии ИБС среди лиц азиатской популяции. Авторы предположили, что форма eNOS, в которой находится мутантный аллель *T*, и, соответственно, аспарагиновая аминокислота, расщепляется внутриклеточно с образованием двух фрагментов, что может привести к снижению активности фермента у носителей аллеля *T* (гомозигот *TT*) и способствует уменьшению эндотелий-зависимой дилатации сосудов (K. Zhang et al. 2012). В тоже время F.E. Kayhan и соавтор. предположили,

что реализация эффектов полиморфизма *G894T* гена *eNOS* (гомозигот *TT*) связана с опосредуемым генотипами взаимодействием гена *eNOS* с регуляторным белком кавеолином-1 и сниженной диссоциацией фермента из комплекса с пептидом (примерно на 35%) (F.E. Kayhan et al., 2016).

Согласно результатам наших исследований, частота гомозигот в группе ИБС по аллелю *C* полиморфизма *-T786C* гена *eNOS* достоверно выше (15,08 % против 5,71 %,  $p < 0,05$ ). Расчётные данные свидетельствуют о достоверно более высоком риске формирования ИБС у пациентов - гомозигот по аллелю *C* ( $OR = 2,93$ ,  $p < 0,05$ ).

Молекулярный механизм данной ассоциации связан с инактивацией промотора посредством репрессорного репликационного белка A1. Он известен как белок, обладающий способностью к связыванию с одноцепочечными молекулами ДНК и необходимый для репарации, репликации и рекомбинации. За счет связывания с белком репликации A1 снижается активность промотора в случае замены тимина (*T*) на цитозин (*C*) (*T (-786) C*), что ведет к уменьшению количества информационных РНК *eNOS* и белковых молекул *eNOS* и снижению синтеза NO (S. Forconi. et al., 2017).

Нами установлено, что носители гомозигот по минорному *a*-аллелю (генотипы *aa*) полиморфизма *VNTR* гена *eNOS* чаще свойственны для группы обследованных с ИБС (24,17 % против 18,57 %,  $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля. Риск формирования ИБС достоверно выше у гомозигот по аллелю *a* ( $OR = 1,4$ ,  $p < 0,05$ ). Частота генотипа *XX* полиморфизма (*CCTTT*)*n* гена *iNOS* в группе ИБС достоверно выше (65,15 % против 55,71 %,  $p < 0,05$ ). Риск формирования ИБС достоверно выше у гомозигот по аллелю *X* ( $OR = 1,49$ ,  $p < 0,05$ ).

Считается, что наличие аллеля *a* (генотип *aa*) полиморфизма *VNTR* гена *eNOS* ассоциировано с большим числом малых (коротких) интерферирующих РНК и меньшим – мРНК, что сопровождается снижением количества активных молекул фермента и снижением продукции NO. Следствием этого является уменьшение эндотелий-зависимой вазодилатации коронарных артерий, что определяет развитие ИБС (Matyar S. et al., 2013; Ахминеева А.Х., 2014).

Можно предположить, что ингибирующее влияние на активность *iNOS*, обусловленное исследуемым полиморфизмом, связано с эндотелиальной дисфункцией и усиленной продукцией эндотелина-1. Последний относится не только к мощным вазоконстрикторным эндотелиальным факторам, но и обладает митогенными и хемотоксическими свойствами, что индуцирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов. В то же время, эндотелин-1 через эндотелиновые рецепторы типа А может ингибировать активность *iNOS* и продукцию NO, вызываемую провоспалительным интерлейкином-1 (Dai X. et al., 2016).

Основную роль в развитии рестеноза играют клетки эндотелия КА, а также их дисфункция, которая определяется уровнем синтеза NO, и контролируется генами *eNOS*. Патологические изменения синтеза оксида азота стимулируют процесс пролиферации гладкомышечных клеток артериальной стенки, который

является рилизинг-фактором в формировании «неоинтимы» - причины рестеноза в стенке (T. Le Tourneau et al., 2000; L. Tomas, 2016).

В соответствии с целью и задачами исследования нами установлена ассоциация ряда полиморфизмов генов *NOS* с рестенозом стентов. Распределение частот генотипов исследуемых полиморфизмов в группе с рестенозом представлены на рисунке 2.

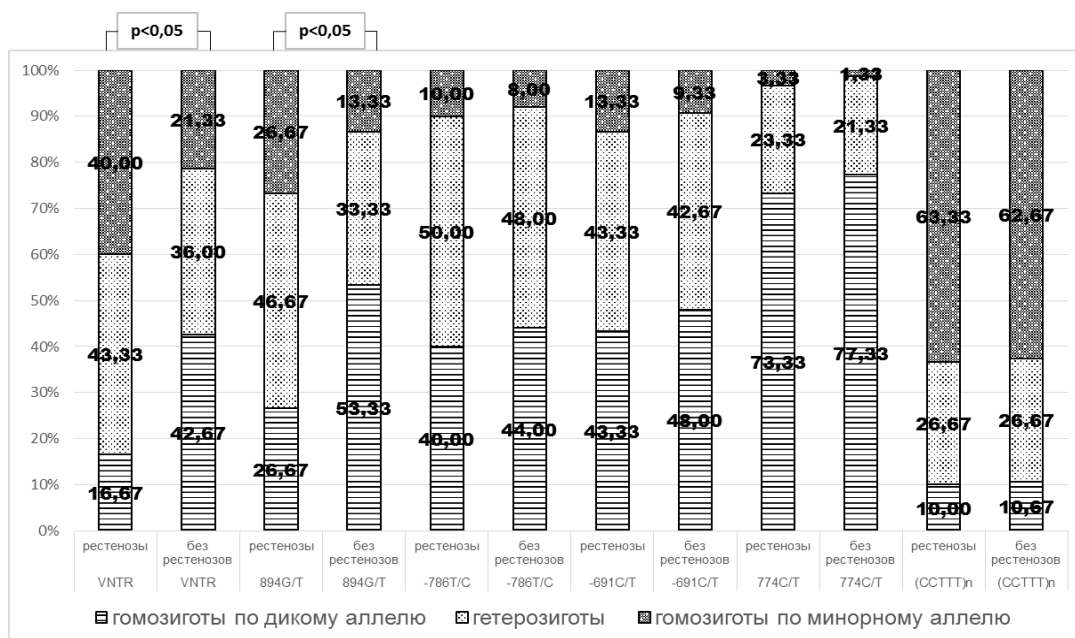


Рисунок 2 – Распределение генотипов полиморфизмов *G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T* гена *eNOS* и полиморфизм *(CCTTT)n* гена *iNOS*

Нами изучено распределение генотипов полиморфизмов генов *NOS* в группе больных рестенозом и в контрольной группе и выявлено достоверное различие между частотами генотипов полиморфизма *VNTR* гена *NOS3* в группе с рестенозом и в контрольной группе ( $\chi^2 = 17,23$ ,  $p < 0,05$ ).

Расчёт рисков подтверждает статистически значимо более высокий риск рестеноза у пациентов носителей минорного аллеля *a*. При этом наличие гомозиготы по дикому аллелю *b* является фактором низкого уровня риска развития повторного сужения КА.

К. Jones с соавт. (2016) в ходе исследования, проведенного в репрезентативной группе (1850 пациентов), перенесших стентирование коронарных артерий, выявили статистически значимую ассоциацию встречаемости генотипов полиморфизма *VNTR* гена *NOS3* с частотой рестеноза в стенке, что совпадает с результатами наших исследований.

Анализ данных исследования полиморфизма *894 G/T* гена *eNOS* выявил статистически значимые различия между частотами генотипов в группе с рестенозом и контрольной группе ( $\chi^2 = 13,16$ ,  $p < 0,05$ ).

Расчет рисков показал достоверно высокую предрасположенность к рестенозу у пациентов носителей минорного аллелю *T* и генотипа *GT*, при этом носительство генотипа *GG* снижает вероятность рестеноза в стенке.

Возможно, молекулярный механизм формирования рестеноза у носителей, гомозиготных по минорному аллелю *T*, и гетерозигот *GT* полиморфизма 894 *G/C* гена eNOS связан с активацией эндотелиновых рецепторов типа А эндотелином-1 (ЭТ-1). Это приводит к повышенному образованию супероксид-аниона и пероксинитрита в эндотелиальных клетках и как следствие снижению активности eNOS. Gopalakrishna D. et al., 2016 в своих экспериментах на животных подтвердили, что опосредованная эндотелином-1 повышенная вазоконстрикция и эндотелиальная дисфункция, обеспечивается частично за счет супероксидных радикалов, образуемых как NADPH-оксидазой, так и разобщенной eNOS (Gopalakrishna D. et al., 2016).

Наше мнение о значимости различных вариантов полиморфизма генов eNOS разделяют как отечественные, так и зарубежные исследователи.

Согласно результатам исследования M.G. Colombo и соавт. (2003), проведенного у 226 пациентов жителей Великобритании после успешного стентирования коронарных артерий, у пациентов - носителей *C* аллеля полиморфизма -786*T/C* и *T* аллеля полиморфизма *G894T* гена eNOS диагностирована статистически значимая большая частота рестенозов по сравнению с *GG* - гомозиготами. При исследовании вариантов полиморфизма гена eNOS у 226 пациентов, которым выполнено стентирование коронарных артерий по поводу ИБС, установлена взаимосвязь полиморфизма *Glu298Asp* гена с повышенной вероятностью развития рестеноза в стенке. Аллель *298Asp* (минорный аллель) полиморфизма *Glu298Asp* гена eNOS достоверно чаще, чем гомозиготы по аллелю *Glu298* (дикий аллель), наблюдался у пациентов с рестенозом (А.Н. Gomma et al. 2002; Ю.А. Шувалова и др., 2008; К.Л. Козлов и др., 2017). Т. Suzuki и соавт. (2012) также наблюдали стойкую ассоциацию полиморфизма *Glu298Asp* гена eNOS с рестенозированием стента коронарной артерии.

С помощью таблицы сопряженности и точного критерия Фишера были проанализированы частоты встречаемости отдельных гаплотипов в группах пациентов без рестеноза и с рестенозами после стентирования. По результатам анализа видно, что пациенты в группах с рестенозами и без рестенозов после стентирования статистически значимо различались между собой. Можно выделить два отдельных гаплотипа, наиболее часто встречающихся у больных с благоприятными или неблагоприятными исходами: *TCabGT11* - наиболее часто встречается у больных с неблагоприятными исходами (21 % против 1,3 % у больных без рестенозов); *TTabGG11* - встречается только у больных с благоприятными исходами (в 13,3 % случаев).

Единичные работы посвящены ассоциации гаплотипов полиморфных вариантов генов NO-синтаз с сердечно-сосудистыми заболеваниями. N. Martinelli и соавт. в бразильской популяции (n = 145) определили протективный относительно прогноза и госпитализации по поводу хронической сердечной недостаточности гаплотип *786C/4b/Asp298*. Авторы объясняют такой результат преобладанием пациентов негроидной расы (N.C. Martinelli et al. 2016). М. Tardelli с соавт. в результате проведенных исследований делают вывод о том, что для

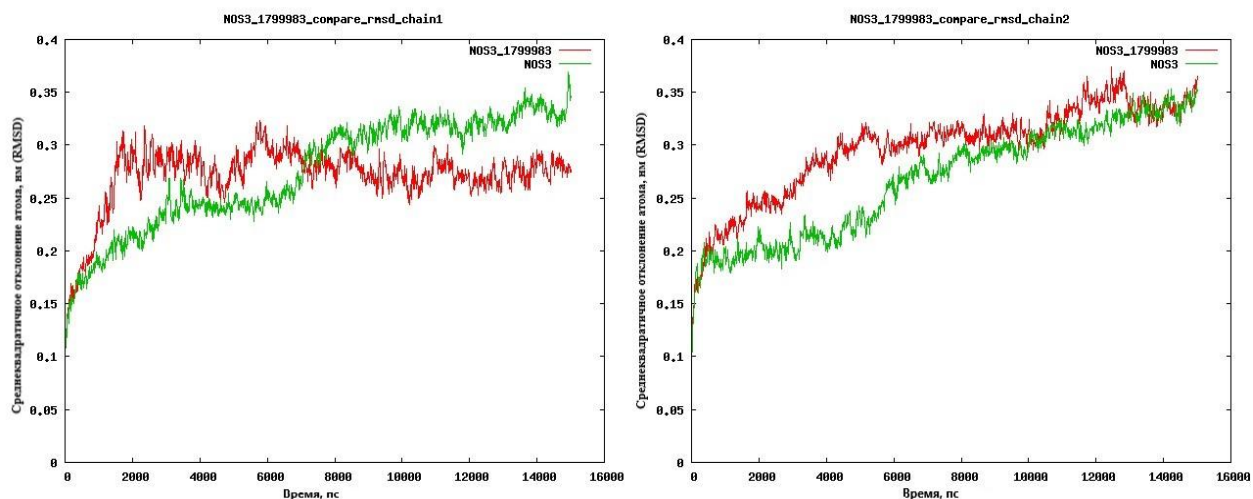


итальянской популяции два типа полиморфизма гена eNOS связаны с существенными ангиографическими изменениями. Ученые предполагают, что сочетание двух типов полиморфизма - *T 786C* и *Glu298Asp* — в одном геноме связано с большим риском развития ИБС по сравнению с одним типом.

В нашем исследовании также проведен анализ риска развития рестеноза на основе 5 предрасполагающих этиологических (эндогенных) факторов, а также определены их чувствительность и специфичность при помощи ROC-кривых (New York, NY: John Wiley and Sons Inc., 1966).

Результаты исследования указывают на разный вклад факторов в риск рестеноза. Увеличение показателя «протяженность стеноза» (в мм) (AUC 63%,  $p < 0,05$ ), «степень стеноза» (в %) (AUC 61,78 %,  $p < 0,05$ ), наличие артериальной гипертензии в анамнезе (AUC 68,2 %,  $p < 0,05$ ), носительство пациентом с ИБС генотипов *GT* и *TT* (AUC 65,30 %,  $p < 0,05$ ) и гаплотипа *TCabGT11* (AUC 59,70 %,  $p < 0,05$ ) увеличивают вероятность рестенозирования.

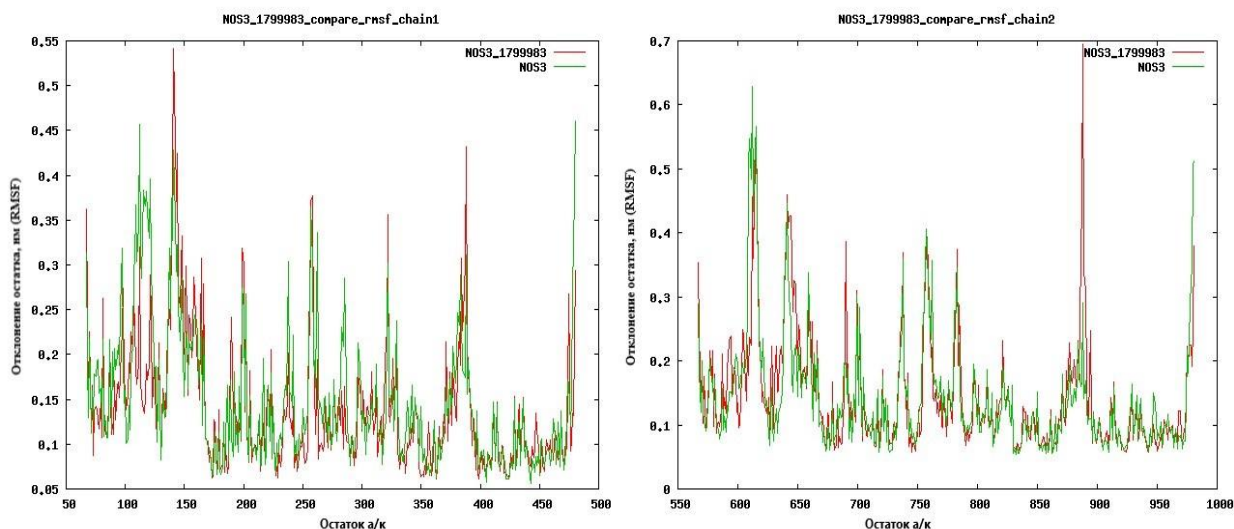
Нами изучен механизм формирования эндотелиальной дисфункции и рестеноза стентов у больных ИБС с наличием полиморфного варианта *G894T*. При данной модификации происходит замена гидрофильного, полярного, отрицательно заряженного глутамина на аспарагин. Установлено, что при симуляции молекулярной динамики (МД) среднеквадратичные отклонения (RMSD) а.о. обоих мономеров оксигеназного домена NOS3 резко увеличивались до 3,5 Å. Значения выходили на «плато» после примерно 6–7 нс. симуляции (рис. 3). При внесении мутации значения RMSD а.о. мономера 1 значительно быстрее выходили на «плато». Это свидетельствует о жесткости структуры модифицированного мономера 1.



**Рисунок 3 – Среднеквадратичное отклонение положения атомов а.о. обоих мономеров в ходе симуляции молекулярной динамики. Значения среднеквадратичных отклонений а.о. мономера 1(слева) и мономера 2 (справа). Зеленая линия — нормальный фермент, красная — фермент с мутацией**

На рисунке 4 показано, что при внесении мутации выделялись два пика в районе 185 (685) а.о. и 390 (890) а.о. Первый попадал в участок, окружающий гем, второй – в участок контакта двух мономеров. В случае мономера 1 при внесении

мутации происходило уменьшение флуктуаций остатков, попадающих в участок «гибкой руки».

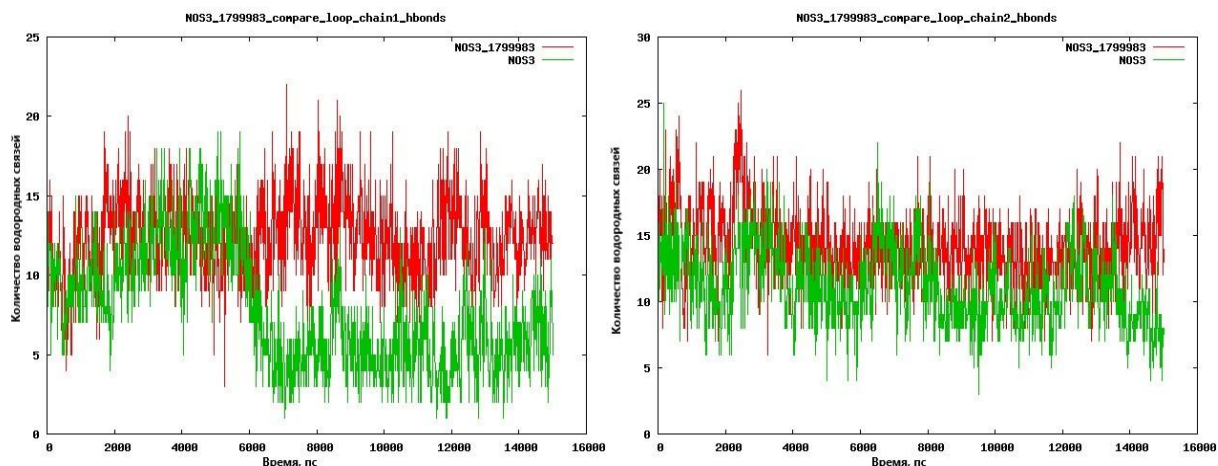


**Рисунок 4 – Значение флуктуаций аминокислотных остатков нормальных и модифицированных мономеров NOS3 в ходе симуляции молекулярной динамики**

Анализ отклонений только остатков «гибкой руки» показал соответствие предыдущим результатам. Результаты оценки RMSD остатков «гибкой руки» сопоставимы с представленными на рис. 4. Действительно, при симуляции мутированной NO-синтазы происходила стабилизация остатков 105–125 в мономере 1. Значения RMSD оставались на уровне 3,5 Å, в то время как при симуляции нормальной NOS3 «гибкая рука» значительно отклонялась после 6 нс симуляции.

Оценка количества водородных связей между остатками 105–125 показала, что при изменении положения «гибкой руки» в нормальной синтазе происходит уменьшение водородных связей (рисунок 5). При внесении мутации этого не происходит.

При внесении замены 298 *Glu>Asp* в аминокислотную последовательность NOS3 происходит временное увеличение числа водородных связей между мономерами фермента. Для оценки возможной перестройки остатков в месте контактов между мономерами были оценены значения RMSD. Установлено, что отличия RMSD при внесении мутации достаточно значительны (около 4 Å). Так же, как и RMSD при внесении модификации, происходило увеличение площади контакта в ходе симуляции.



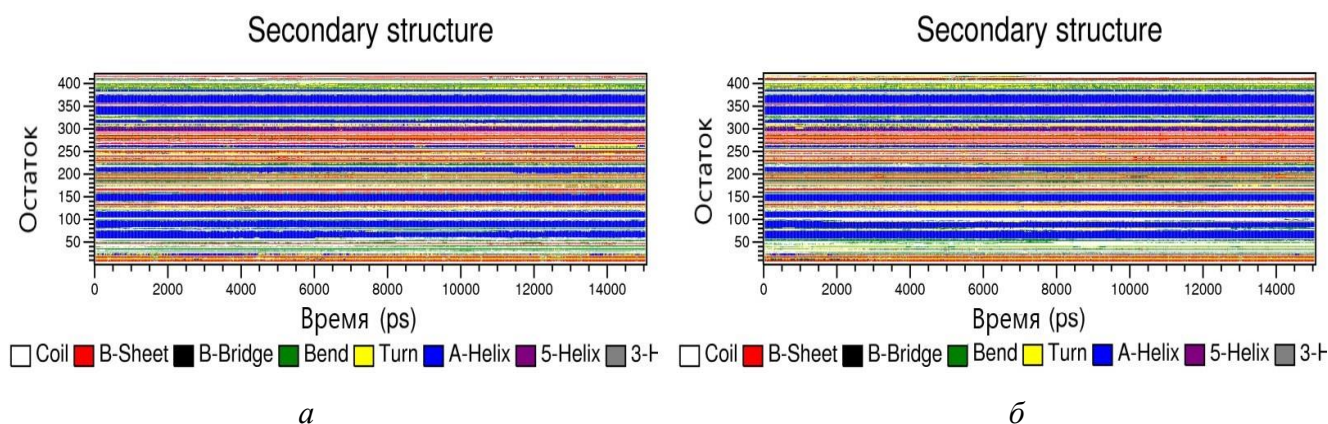
**Рисунок 5 – Динамика количества водородных связей между остатками 105–125 и другими а.о. мономера**

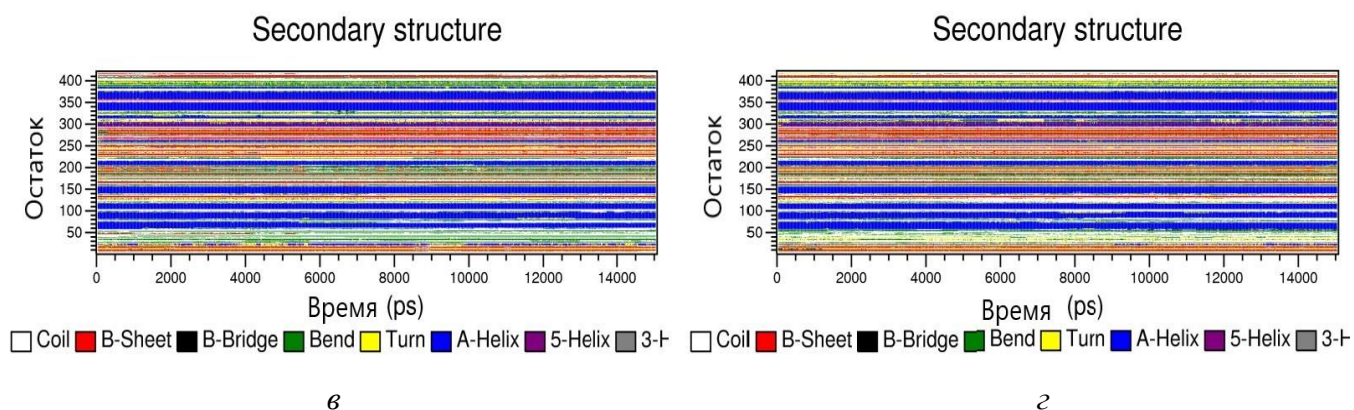
Для оценки конформационных перестроек внутри молекулы белка использовали алгоритм DSSP (рисунок 6).

В ходе симуляций в нормальной NOS3 перестроек не обнаружено. Однако в мутантной NOS3 отмечается разрушение элементов вторичной структуры. Также были заметны «шумы» на N-конце мономера 2 NOS3 при внесении модификации.

Важными факторами, влияющими на каталитическую активность NOS3, являются структура сайта связывания субстрата и окружение кармана с коферментом — гемом. Исследованы 3 участка: окружение гема, вход в активный центр и место связывания субстрата. Для данных участков измерена динамика изменения площади поверхности. Внесение мутации в последовательность белка приводило к большей стабильности площади входа в активный центр мономера 1 в ходе симуляции МД. Очевидно, что в нормальном состоянии площадь данного участка в обоих мономерах уменьшается до 8–9 нм<sup>2</sup>.

В мономере 1 внесение модификации влекло за собой увеличение площади сайта связывания субстрата и площади кармана с гемом. На поведение соответствующих участков в мономере 2 внесение мутации не влияло.





**Рисунок 6 – Стабильность элементов вторичных структур в ходе симуляции молекулярной динамики. А — мономер 1 нормальной синтазы; Б — мономер 2 нормальной синтазы; В — мономер 1 модифицированной синтазы; Г — мономер 2 модифицированной синтазы**

Таким образом, миссенс-мутация *G894T* гена *NOS3*, ведущая к замене аминокислоты глутамина на аспарагин в положении 298 белковой последовательности, влечет за собой конформационные перестройки внутри фермента. Мутация *G894T* влияет на стабильность важного регуляторного участка (105–125 а.о.) — «гибкой руки» в мономере 1. В модифицированном мономере данный участок менее подвижен. В мономере 1 также отмечено увеличение площади участков поверхности, окружающей гем, соответствующий входу в активный центр и места связывания субстрата. Отмечается разрушение вторичной структуры белка.

По данным Doshi A. et al., замена аминокислоты происходит в оксигеназном домене фермента eNOS, который не отвечает за его активность. Возможно, поэтому в большинстве исследований стояла цель определить функциональное значение этого фермента. Не установлено различия в активности белка eNOS среди носителей генотипов *GG*, *GT* и *TT*. В работе Golser R. et al. установлено, что мутантный вариант белка не уступает ни по аффинности L-аргинина, ни по интенсивности образования цитруллина, оксидоредуктазной активностью, чувствительностью к кальцию, кальмодулинсвязывающей активностью и другими свойствами (Golser R. et al., 2003; Derkacz A. et al., 2011; Men C. et al., 2012).

Однако отсутствие различий изолированного белка не обязательно свидетельствует о том, что аналогичная закономерность будет наблюдаться в живых клетках, где активность eNOS в кавеолах цитоплазматической мембраны определяется окружающими условиями и контролируется многими другими белками. Так, в работе Tesauro M. et al. определено, что белок с заменой *Glu* на *Asp* в 298-м положении легко расщепляется на два фрагмента: 35кДа N-терминальный и 100 кДа С-терминальный (Tesauro M. et al., 2000; Gad M.Z. et al., 2013). Гидролиз происходит именно по связи, которая образуется между *Asp298* и *Pro299*. В условиях *in vivo* такое расщепление потенцируется повышением температуры и снижением уровня pH. Предполагается, что это расщепление является следствием кислотического гидролиза белка eNOS неизвестной протеиназой (Dosenko V.E. et al., 2009; Daff S. et al., 2010). Авторы не исключают,

что феномен ацидотического гидролиза *G894T* варианта *eNOS* является артефактом, генерируемым *in vitro*, однако с нормальным белком соответствующих изменений не происходило.

В любом случае есть основания полагать, что аллельный полиморфизм *G894T* увеличивает уязвимость белка к гидролизу, особенно в условиях действия патологических факторов. В результате содержание белка уменьшается, что обуславливает развитие патофизиологических проявлений недостаточности синтеза оксида азота в организме (Fairchild T.A. et al., 2001; Alkharfy K.M. et al., 2011; Tardin O.M. et al., 2013).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндотелий коронарных артерий выполняет ключевую роль в поддержании гомеостаза сердечно-сосудистой системы, продуцируя ряд вазоактивных факторов, регулирующих рост сосудов, их тонус и ремоделирование. Важным фактором, поддерживающим стабильное функционирование сердечно-сосудистой системы в физиологических условиях и ее адаптацию в условиях патологического процесса является оксид азота. Монооксид азота регулирует деятельность сердечно-сосудистой системы за счет вазодилатирующего, антиагрегантного и антипролиферативного эффекта. Изменение NO-зависимых механизмов вносит вклад в развитие дисфункции эндотелия коронарных артерий, что является значимым звеном в развитии рестеноза внутри стента. В то же время, работы, посвященные изучению ассоциации полиморфизмов генов *NO*-синтаз с рестенозом, в настоящее время единичны и основаны на небольшом количестве клинических наблюдений, что обуславливает актуальность выполненной нами работы.

В результате проведенных исследований установлены генетические предрасполагающие этиологические факторы развития ишемической болезни сердца - носительство *T*-аллеля (генотип *TT* и *GT*) полиморфизма *G894T*, гомозиготного аллеля *C* полиморфизма *-786T/C*, аллеля *a* (генотип *aa* и *ab*) полиморфизма *VNTR* гена *eNOS*; гомозиготного аллеля *X* полиморфизма  $(CCTTT)_n$  гена *iNOS*.

Впервые обнаружена ассоциация полиморфизмов генов *NOS* с рестенозом коронарных артерий. Риск формирования рестеноза статистически значимо выше у пациентов – носителей генотипов гомозиготных по минорному аллелю *a* и гетерозигот *ab*. Показано, что риск развития рестеноза достоверно выше у носителей, гомозиготных по минорному аллелю *T*, и гетерозигот *GT* полиморфизма *894 G/T* гена *eNOS*.

В процессе анализа частот встречаемости отдельных гаплотипов в группах больных без рестенозов и с рестенозами выявлены два различно представленных гаплотипа: *TCabGT11* – наиболее часто встречается у больных с рестенозом; *TTabGG11* – встречается только у больных с благоприятными исходами.

В нашем исследовании выявлены клинические предрасполагающие этиологические факторы рестенозирования: увеличение показателя «протяженность стеноза» (в мм), «степень стеноза», наличие артериальной

гипертензии в анамнезе, носительство пациентом с ишемической болезнью сердца генотипа *GT* и *TT* полиморфизмов *894 G/T* и гаплотипа *TCabGT11*.

При изучении механизмов формирования эндотелиальной дисфункции и рестеноза стентов у пациентов с ишемической болезнью сердца – носителей полиморфного варианта *G894T* впервые установлено, что указанная замена приводит к значительным конформационным изменениям отдельных элементов внутри фермента - увеличению жесткости структуры модифицированного мономера 1 и уменьшению флуктуаций аминокислотных остатков, попадающих в участок «гибкой руки» данного мономера, увеличению числа водородных связей между мономерами фермента, увеличению площади сайта связывания субстрата и площади кармана с гемом, разрушению вторичной структуры белка. Таким образом, формируется недостаточность синтеза эндогенного NO с последующим развитием эндотелиальной дисфункции, являющейся причиной рестеноза в стенте.

### ВЫВОДЫ

1. Частота распространенности генотипов полиморфизмов генов *NOS* в популяции русской этнической группы Сибирского региона достоверно выше у пациентов с ишемической болезнью сердца – носителей генотипов *GT* и *TT* полиморфизма *G894T*, *CC* полиморфизма *-T786C*, *aa* полиморфизма VNTR гена *eNOS*, *X/X* полиморфизма *(CCTTT)<sub>n</sub>* гена *iNOS* и ассоциирована с высоким риском развития ишемической болезни. Пациенты – носители полиморфного варианта *GG* полиморфизма *G894T* гена *eNOS* имеют достоверно низкий риск развития ишемической болезни сердца.

2. Частота распространенности генотипов *aa* и *ab* полиморфизма VNTR, *TT* и *GT* полиморфизма *894 G/T* гена *eNOS* в группе пациентов с ишемической болезнью сердца достоверно выше и ассоциирована с высоким риском развития рестеноза коронарных артерий после установки стента.

3. Риск рестенозирования в стенте у пациентов с ишемической болезнью сердца выше при увеличении протяженности стеноза и выраженности сужения коронарной артерии, наличия артериальной гипертензии в анамнезе, полиморфизма *894G/T* гена *eNOS*, гаплотипа *TCabGT11*. Риск развития рестеноза в стенте ниже у обследованных больных - носителей гаплотипа *TTabGG11*.

4. Методом молекулярного моделирования установлено, что наличие полиморфизма *G894T* гена *eNOS* обуславливает конформационные изменения структуры фермента, опосредующие недостаточность эндогенного синтеза NO и, как следствие, формирование эндотелиальной дисфункции и рестеноза в стенте.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДССЕРТАЦИИ

1. Полиморфизм гена *eNOS* как фактор риска рестенозирования в стенте / Л.М. Огородова, К.Ю. Рукин, И.В. Петрова С.И. Винтизенко // Вестник

Российской академии медицинских наук. — 2017. — Т. 72, № 2. — С. 120-125. (1,428)

2. Влияние полиморфизма различных генов на развитие рестеноза после стентирования коронарных артерий / С.И. Винтизенко, Л.М. Огородова, К.Ю. Рукин, И.В. Петрова // Успехи современной науки. — 2017. — Т. 5, № 1.— С. 128-132. (0,780)

3. Ассоциация полиморфизма генов эндотелиальной NO-синтазы с риском развития и прогрессирования ишемической болезни сердца артерий / С.И. Винтизенко, Л.М. Огородова, К.Ю. Рукин, И.В. Петрова // Дневник казанской медицинской школы. — 2017. — Т.15, № 1. — С. 40-44. (0,352)

4. Диагностически значимые факторы-предикторы рестенозирования в стенке у пациентов с ИБС / Л.М. Огородова, К.Ю. Рукин, И.В. Петрова, С.И. Винтизенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2017. — Т.61, № 4. — С. 31–37. (0,452)

5. Роль генетических факторов в механизмах развития ремоделирования коронарных артерий после имплантирования стентов / С.И. Винтизенко, Л.М. Огородова, К.Ю. Рукин, И.В. Петрова // Бюллетень сибирской медицины. — 2015. —Т.14, № 1. — С. 102–109. (0,503)

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ - артериальная гипертензия	iNOS (NOS2) inducible nitric oxide synthase) - индуцибельная NO-синтаза
ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения	nNOS (neuronal nitric oxide synthase) - нейрональная NO-синтаза
ИБС - ишемическая болезнь сердца	NO (nitric oxide) - оксид азота
ИК – инфаркт миокарда	RMSD - среднеквадратичное отклонение положения атомов молекулы во времени
КА – коронарные артерии	RMSF - отклонения частицы (атома, остатка аминокислоты) от первоначального положения
СЛП - стент с лекарственным покрытием	SAS - измерение площади поверхности молекулы, доступной для растворителя
СД - сахарный диабет	VNTR (variable number of tandem repeats) - полиморфизм переменного числа нуклеотидных повторов
МД - молекулярная динамика	
ЧКВ - чрескожное коронарное вмешательство	
DSSP - площадь поверхности атомов во вторичной структуре белка	
eNOS (NOS3) - эндотелиальная NO-синтаза	

Тираж 100 экз. Заказ №.  
Томский государственный университет  
систем управления и радиоэлектроники  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 40.  
Тел.: (3800) 533018.