

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Рукин Константин Юрьевич

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

14.03.03 — «Патологическая физиология»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
член-корреспондент Российской академии наук,
доктор медицинских наук,
профессор Огородова Людмила Михайловна

Томск
2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
<p>ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ NO-СИНТАЗ В РАЗВИТИИ РЕСТЕНОЗОВ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ В ПОДВЕРЖЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЮ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....</p>	
1.1 Оксид азота: синтез, функциональная роль, значение в развитии эндотелиальной дисфункции	11
1.1.1 NO-синтазы (эндотелиальная, индуцибельная и нейрональная): структура, локализация, механизмы регуляции активности	11
1.1.2 Физиологическая роль оксида азота.....	13
1.1.3 Роль оксида азота в развитии эндотелиальной дисфункции.....	15
1.2 Связь полиморфизмов генов NO-синтаз с развитием эндотелиальной дисфункции	18
1.3 Рестеноз внутри стента в современной интервенционной кардиологии	25
1.3.1 Определение, эпидемиология, факторы риска	25
1.3.2 Патогенетические механизмы развития РВС и роль эндотелиальной дисфункции.....	29
1.4 Связь полиморфизмов генов NO-синтаз с риском развития РВС	32
1.5 Заключение	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1 Критерии формирования клинических групп.....	38
2.2 Методы исследования	41
2.2.1 Подготовка венозной крови для молекулярно-биологических исследований	41
2.2.2 Выделение геномной ДНК.....	42
2.2.3 Полимеразная цепная реакция.....	43

2.2.4 ПДФ-анализ	44
2.2.5 Биоинформационная модель.....	45
2.2.6 Статистическая обработка данных	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	50
3.1 Клинические факторы риска рестенозирования.....	50
3.2 Ассоциация полиморфизма генов NOS с ишемической болезнью сердца ...	53
3.3 Ассоциация полиморфизма генов NOS с рестенозом стентов	56
3.4 Роль гаплотипов полиморфных вариантов генов NO-синтаз в формировании рестеноза стентов коронарных артерий	59
3.5 Выявление предрасполагающих факторов развития рестеноза, определение их чувствительности и специфичности посредством ROC-кривых	61
3.6 Молекулярный механизм формирования эндотелиальной дисфункции и рестеноза стентов у больных ИБС с наличием полиморфного варианта <i>G894T</i> гена eNOS.....	67
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) - органическое и функциональное поражение миокарда, одна из основных болезней в структуре сердечно-сосудистых заболеваний. 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;). Эндovasкулярные методы лечения артериального атеросклероза впервые были описаны в 1964 г. в работах Dotter и Judkins. В 1977 г. пионером эндovasкулярной баллонной дилатации коронарных артерий у человека стал А. Gruentzig, который и назвал этот метод «Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty». 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. Ещё один несомненный плюс стентирования – 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, морфологическим субстратом которого является пролиферативная гладкомышечная ткань с избытком 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 эндотелия сосудов. Этот процесс тормозит в КА гиперплазию интимы и адаптивную модификацию функции и морфологии сосудов, т. е. 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). Но даже при использовании таких типов 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, указывающих на риск, включая генетически обусловленный, 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 ассоциация полиморфизмов генов (*eNOS*, *NOS3*), а также индуцибельной NO-синтазы (*iNOS*, *NOS2*) с рестенозом в настоящее время исследована фрагментарно.

Данный факт обосновывает актуальность тематики заявленного исследования, поскольку его практические результаты могут предоставить новые

знания о роли вариабельности полиморфизмов генов NO-синтаз в развитии пролиферации сосудистой стенки стентированных КА у больных с ишемической болезнью сердца.

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 исследования. 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 (*CCTTT*)*n* (гетерозигот по аллелю

Х). Риск развития патологии 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 в стенте 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 значительным конформационным изменениям отдельных элементов внутри фермента. В результате содержание белка уменьшается, что приводит к недостаточности синтеза эндогенного оксида азота (*NO*) и развитию эндотелиальной дисфункции, ведущей к рестенозу.

Теоретическая и практическая значимость. 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)_n*, *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.

Установлены аллельные варианты генов NO-синтаз (*G894T*, *-786T/C*, *VNTR*), ассоциированные с риском развития ИБС. Выделение ДНК из лейкоцитарной взвеси с последующим определением у пациентов перед стентированием коронарных артерий полиморфизмов *VNTR* и *894 G/T* гена *eNOS*, а также гаплотипа *TCabGT11* может иметь значение в 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 (предикторах) 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, и служат 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*)_n 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 течение 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* демонстрирует 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 (484 пациента) 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 и 9 таблиц; состоит из введения, главы I «Современные представления о роли полиморфизмов генов NO-синтаз в формировании ишемической болезни сердца и в структуре подверженности к развитию рестенозов после стентирования коронарных артерий (обзор литературы)», главы II «Материалы и методы», главы III «Результаты собственных исследований», раздела «Обсуждение полученных результатов», заключения, выводов. Список литературы содержит 253 библиографических источника, из них 38 отечественные, 215 зарубежных.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ NO-СИНТАЗ В РАЗВИТИИ РЕСТЕНОЗОВ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ В ПОДВЕРЖЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЮ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Оксид азота: синтез, функциональная роль, значение в развитии эндотелиальной дисфункции

1.1.1 NO-синтазы (эндотелиальная, индуцибельная и нейрональная): структура, локализация, механизмы регуляции активности

Синтез эндогенного оксида азота в организме происходит при участии трёх ферментов-катализаторов синтеза оксида азота: нейронального (*nNOS*, *NOS-1*), NO-синтазы макрофагов (индуцибельная) (*iNOS*, *NOS-2*) и эндотелиального (*eNOS*, *NOS-3*). Эти ферменты способствуют изменению скорости реакции аминокислоты L-аргинина, молекулярного кислорода и восстановленной формы никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФН) с образованием свободного оксида азота в результате присоединения кислорода к атому азота в составе гуанидиновой группы L-аргинина (Alderton W.K. et al., 2001). Изоформы NO-синтазы являются продуктами экспрессии разных генов, локализованы в разных тканях и имеют существенные различия в механизмах регуляции активности, а гомология в последовательности аминокислотных остатков между ними составляет 51–57 % (Poulos T.L., 2005; Daff S., 2010; Li H., 2016). Эндотелиальная и нейрональная NO-синтазы, в отличие от индуцибельной, являются кальцийзависимыми и конститутивными в связи с постоянным уровнем экспрессии их генов (Daff S., 2010).

Все изоформы NO-синтазы являются гомодимерами, мономеры которых состоят из нескольких доменов, обеспечивающих связывание кофакторов и регуляцию активности фермента. На N-концевом участке расположен

специфичный для каждой изоформы оксигеназный гемсвязывающий домен, на С-концевом — цитохром P450-подобный домен с местами связывания для кофакторов, а между ними локализован кальмодулин-связывающий домен. Функционально активными являются тетрамеры, состоящие из двух молекул NO-синтазы и двух молекул кальмодулина. В качестве основного каталитического центра во всех изоформах NO-синтазы выступает оксигеназный домен (Daff S., 2010; Förstermann U., Sessa W.C., 2012) (рисунок 1).

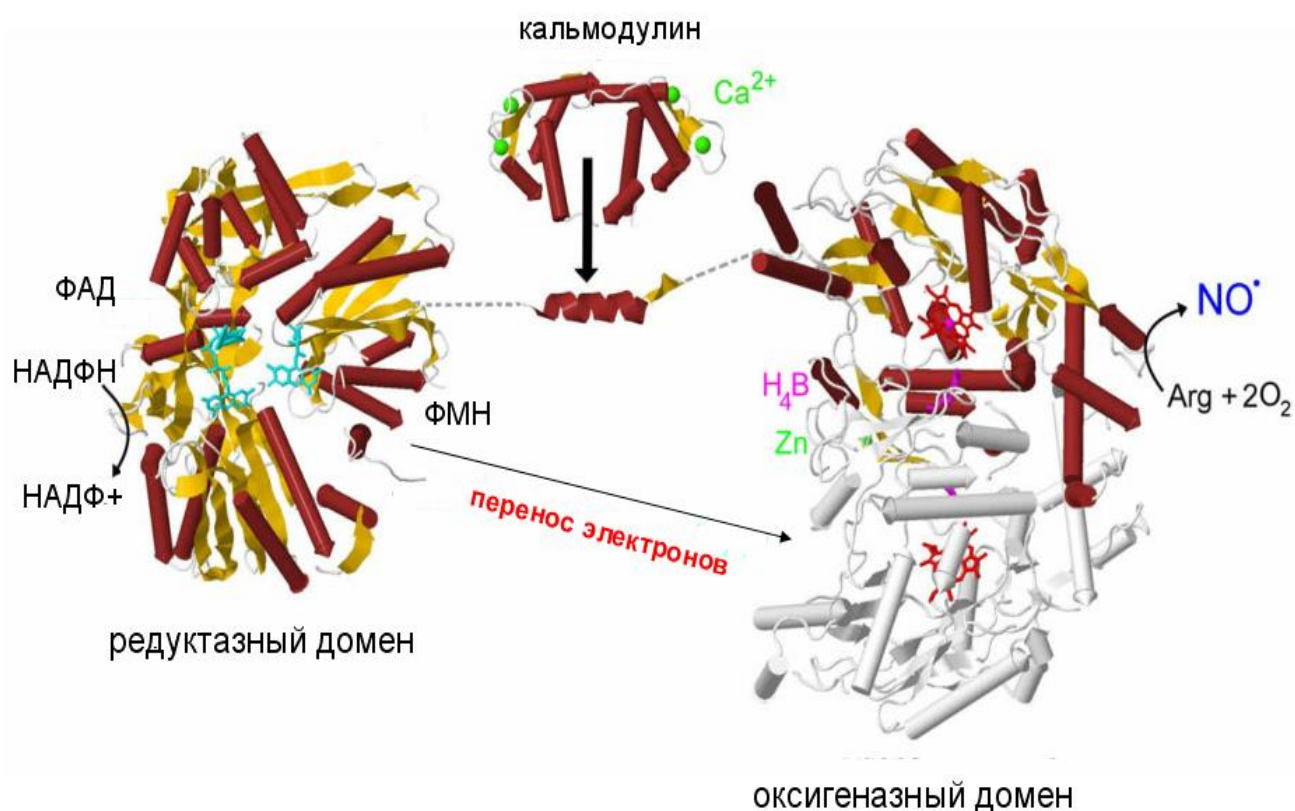


Рисунок 1 – Схема строения NOS и синтез оксида азота (по Daff S., 2010; с изменениями)

eNOS состоит из 1203 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 133 кDa, ее синтез обеспечивается экспрессией гена, локализованного в локусе 7q35–7q36 7-й хромосомы и состоящего из 26 экзонов и 25 интронов. Данный фермент, в отличие от iNOS и nNOS, на С-концевом участка содержит лидерную последовательность аминокислот, гомологичную локализованным в сарколемме белкам синтрофинам. Эндотелиальная NO-синтаза локализована в

плазматической мембране эндотелиоцитов и тромбоцитов в связанном с кальвеолином состоянии, активность фермента зависит от внутриклеточной концентрации кальция (Drab M. et al., 2001; Poulos T.L., 2005; Daff S., 2010; Li H., 2016).

iNOS состоит из 1153 аминокислотных остатков и кодируется геном, расположенным в локусе 17cen–q11.2 17-й хромосомы. В настоящее время показано, что данная изоформа может экспрессироваться во многих клетках — макрофагах, нейтрофилах, фибробластах, эпителиальных клетках различной локализации и гладких миоцитов сосудов. Экспрессия этой изоформы фермента индуцируется воздействием липополисахаридов бактериальных клеточных стенок и различными цитокинами, синтезированная молекула сохраняет не зависящие от кальция высокие показатели каталитической активности в течение 5 суток (Förstermann U., Sessa W.C., 2012; Forconi S. et al., 2017).

Регуляция экспрессии изоформ NO-синтазы может осуществляться на пре- и посттрансляционном этапах, а активность ферментов связана с интенсивностью экспрессии соответствующих генов, преобразованием и экспортом в пределах клеточных компартментов молекул мРНК, содержанием необходимых для синтеза оксида азота кофакторов и L-аргинина, а также собственной ферментативной активностью, зависимой от распределения фермента в пределах внутриклеточных компартментов и связыванием с другими молекулами. Регуляция активности конститутивной eNOS определяется преимущественно немедленными аллостерическими модуляциями молекул. Изменение функционального состояния iNOS в основном обусловлено интенсификацией экспрессии соответствующего гена (Alderton W.K. et al., 2001; Poulos T.L., 2005; Daff S., 2010; Juni R.P. , 2016; Li H., 2016).

1.1.2 Физиологическая роль оксида азота

Анализ большого количества экспериментальных данных, полученных в течение последних нескольких десятилетий, привел к признанию высокой

значимости оксида азота в осуществлении разнообразных физиологических функций. Несмотря на то что активность изоформ NO-синтазы приводит к синтезу одного химического соединения — оксида азота, осуществляемые ими функции принципиально различны, что обусловлено прежде всего локализацией изоформ в определенных тканях с наличием специфических молекулярных мишеней, а также специфическими механизмами регуляции активности (Li H., Poulos T.L., 2005; Förstermann U., Sessa W.C., 2012).

Эндогенный оксид азота модулирует все основные функции эндотелия и играет множественную роль в организме человека. Его основное назначение:

- 1) релаксация гладкой мускулатуры стенок сосудов или вазодилатация;
- 2) регуляция активности тромбоцитов посредством угнетения их адгезии и ингибирования агрегации;
- 3) модуляция адгезии лейкоцитов и развитие воспаления в сосудистой стенке;
- 4) контроль пролиферации гладкомышечных клеток сосудов;
- 5) стимуляция ангиогенеза и активация прогениторных эндотелиальных клеток (Förstermann U., Sessa W.C., 2012).

В настоящее время оксид азота признан самым мощным сигнальным фактором всей вазодилатирующей системы организма. Молекулярная основа опосредованной оксидом азота вазодилатации связана с активацией гуанилатциклазы, что приводит к увеличению синтеза циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), активации протеинкиназы G и протеинфосфатазы, вызывающей изменение структуры калиевых каналов, а также увеличивает проникновение калия и уменьшает кальций, что ведет к вазодилатации (Triggle C.R. et al., 2012).

Оксид азота является сильным ингибитором агрегации и адгезии тромбоцитов, уменьшает экспрессию и продукцию фактора активации тромбоцитов, а также блокирует рост формирующегося тромба (Forconi S., Gori T., 2013). Это происходит под действием нескольких механизмов. Действие оксида азота в тромбоцитах цГМФ приводит к увеличению активности кальций-

зависимой АТФ-зы и ингибированию активности фосфатидилинозитол-3-киназы, что уменьшает концентрацию внутриклеточного кальция и приводит к снижению экспрессии на мембране тромбоцитов Р-селектинов. NO способствует фосфорилированию рецепторов тромбоксана А2 и уменьшению его синтеза из арахидоновой кислоты. Ингибирование данным соединением агрегации тромбоцитов и тромбообразования происходит также за счет модулирования взаимодействия между рецепторами на поверхности тромбоцитов и клеток эндотелия (De Mal A. et al., 2011).

Оксид азота обладает способностью межклеточного и внутриклеточного мессенжера, в частности, выступает ингибитором адгезии нейтрофилов на стенках сосудов, обуславливая уменьшение на их поверхности уровня экспрессии молекул CD11/18 (Cubes P. et al., 1991; Förstermann U., Sessa W.C., 2012). Этот бесцветный газ способен предупреждать апоптоз эндотелиальных клеток, индуцируемый продуцентами цитокинами и активными формами кислорода, а также подавлять синтез ДНК и пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК) (Forconi S., Gori T., 2013).

NO задействован в центральных регулятивных механизмах АД (De Mal A. et al., 2011). Экспериментально установлена зависимость ингибирования синтеза NO в продолговатом мозге и гипоталамусе и развития системной гипертензии (Toda N. et al., 2009).

1.1.3 Роль оксида азота в развитии эндотелиальной дисфункции

В настоящее время есть все основания рассматривать эндотелий в качестве важнейшего функционального эпителия, производящего большое количество биологически активных веществ и играющего одну из центральных ролей в регуляции гемодинамики, сосудистого тонуса и тромбообразования (Березикова Е.Н. и др., 2001; Шамес Д.В. и др., 2017; Remzi Onder, 1999).

Хроническое воздействие большого количества факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (гиперлипидемии, артериальной гипертензии,

гипергликемии, гиперурикемии, курения и др.) приводит к нарушению функциональных свойств эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции (ЭД). Морфофункциональным проявлением эндотелиальной дисфункции являются вазоспазм, оксидативный стресс, повышение агрегации тромбоцитов, а также воспаление сосудистой стенки, что в комплексе может привести к индукции атерогенеза (Березикова Е.Н. и др., 2015; Юхно Е.С., 2015; Бузиашвили Ю.И. и др., 2018; Davignon J., Ganz P., 2004; Sitia S. et al., 2010; Mudau M. et al., 2012; Gondo K. et al., 2016; Forconi S. et al., 2017).

Процесс возникновения ЭД во многом объясняется снижением активности *NO*, обусловленной нарушением экспрессии и повышенным уровнем транскрипции соответствующего гена *eNOS*, аллостерическими модуляциями, вызывающими изменения конформации синтезированного фермента, а также нарушением биодоступности *NO* (Yang Z., Ming X.F., 2006). Состояние ЭД тщательно исследовано не только во взаимосвязи с проблемами сердечно-сосудистой системы, но также и с заболеваниями нервной системы (Amiya E. et al., 2014), почек (D'Apolito M. et al., 2015), легких (Urban M.H. et al., 2014).

Современная кардиология располагает достаточным объёмом исследований, в которых ЭД изучалась в качестве прогностического признака. В частности, 5-летнее исследование 3 тыс. человек пожилого возраста без документированной сердечно-сосудистой патологии, проведённое MESA, доказало на практике прогностическую ценность эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) в отношении сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркта миокарда, инсульта, сердечно-сосудистой смерти, стенокардии) как показателя для выполнения коронарной реваскуляризации (Yeboah J. et al., 2007). Однако аналогичные исследования FATE и PIVUS такой зависимости не содержат. В частности, FATE установлена предикторная связь между ЭЗВД и микроваскулярной дисфункцией сосудов миокарда, коррелирующая с долгосрочным прогнозом, а PIVUS обосновывает отрицательный результат высоким процентом молодых людей среди исследуемых (Gutierrez E. et al., 2013).

Научно установлено (Suwaidi J.A. et al., 2000; Heitzer T. et al., 2001; Brevetti G. et al., 2008; Charakida M., 2010), что ЭД в коронарных артериях оказалась независимым предиктором кардиоваскулярных событий (ИМ, ИБС, сердечно-сосудистой смерти). Пархоменко А.Н. и соавт. определили, что проба с реактивной гиперемией у больных острым коронарным синдромом ОКС ассоциируется с развитием ранней постинфарктной стенокардией и рецидивом ИМ и, наоборот, в случае нормализации прироста диаметра плечевой артерии (ПА) у таких пациентов уменьшался риск указанных событий. (Гарднер Р.С. и др., 2014; Пархоменко А.Н. и др., 2015).

В настоящее время установлено тесное сопряжение синтеза оксида азота с образованием активных форм кислорода — основой возникновения оксидативного стресса (Förstermann U., 2010). В условиях повышенного образования активных форм кислорода возможна реакция между оксидом азота и O_2^- с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$), имеющего окислительные и нитрирующие свойства. Дисмутация O_2^- может привести к образованию перекиси водорода (H_2O_2), что в условиях оксидативного стресса приводит к росту экспрессии синтазы *NO* и сопровождается активацией синтеза оксида азота с усилением вероятности его вступления в реакцию с активными формами кислорода (Drummond G.R. et al., 2000). Установлено также, что оксидативный стресс усиливается под влиянием фактора собственной продукции синтеза оксида азота O_2^- , а это характерно для состояния клеточного истощения L-аргинина, накопления эндогенного метиларгинина, окисления тетрагидробиоптерина — кофактора синтеза оксида азота (Vásquez-Vivar J. et al., 1998; Landmesser U. et al., 2003; Antoniadis C. et al., 2009). Изменение активности синтеза оксида азота при ЭД становится ключевым фактором в развитии оксидативного стресса (Schulz E. et al., 2008; Chen A.F. et al., 2012).

Показано, что фактор некроза опухоли альфа (TNF — tumor necrosis factor) — один из главных предикторов уничтожения опухолевых клеток, запускающий ускорение экспрессии НАДФН-оксидазы и дезактивирующий синтазу оксида

азота посредством усиления деградации ее мРНК (Gao X. et al., 2007; Zhang H. et al., 2009).

Активные формы кислорода способны провоцировать пролиферацию гладкомышечных клеток стенок сосудов, запуская апоптоз эндотелиальных клеток и наращивая активность матриксных металлопротеиназ, что может привести к активации стадии атерогенеза с формированием атеросклеротических бляшек (Yokooyama M. et al., 2004; Mudau M. et al., 2012). Оксидативный стресс также повышает риск воспаления в сосудистой стенке путем активации провоспалительных цитокинов в клетках и увеличения уровня активных форм кислорода (Stenvinkel P. et al., 2001).

Научно описана в литературе гетерогенная роль *iNOS* в развитии атеросклероза. Удаление у мышей на молекулярном уровне гена *iNOS* замедляет развитие атеросклеротического процесса (Kuhlencordt P.J. et al., 2001), а изъятие гена *eNOS*, напротив, его ускоряет (Knowles J.W. et al., 2000). Это даёт основания полагать, что *nNOS* и *eNOS* имеют антиатеросклеротический, а *iNOS* — проатеросклеротический эффект (Lowenstein C.J., 2006).

1.2 Связь полиморфизмов генов NO-синтаз с развитием эндотелиальной дисфункции

Разнообразные функции оксида азота, связанные с регуляцией сосудистого тонуса, агрегации тромбоцитов, тромбообразования, а также прямые доказательства вовлечения данного соединения в патогенез ЭД обуславливают интерес к изучению влияния полиморфизмов генов изоформ NO-синтаз на риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (Севостьянова И.В. и др., 2013; Каражанов Л.К. и др., 2014; Воронков Л.Г. и др., 2015; Кондратьева Н.С. и др., 2015; Куба А.А. и др., 2015; Пархоменко А.Н. и др., 2015; Приступа Л.Н., Погорелова О.С., 2015; Carreras-Torres R. et al., 2014).

На данный момент полиморфизм *G894T* в гене *eNOS*, приводящий к включению в белковый продукт в 298-м положении аспартата вместо глутамата,

остаётся наиболее изученным. Японские кардиогенетики установили, что в случайной выборке частота встречаемости аллельных вариантов *Glu/Glu*, *Glu/Asp* и *Asp/Asp* составляет, соответственно, 85,9 %, 13,4 % и 0,7 % (Sawada T. et al., 2008). Данные исследований Кузнецовой Т.Ю. и соавт. (2007) относительно российской популяции свидетельствуют, что среди здоровых исследуемых частота генотипов *GG*, *GT* и *TT* составляет, соответственно, 53 %, 36 % и 11 %. Результаты многочисленных исследований различных популяций подтверждают ассоциацию указанного полиморфизма с ростом риска развития ИБС, включая ОКС, ИМ (Antoniades C.N. et al., 2005; Lin T. et al., 2008; Alkharfy K.M. et al., 2010; Dafni S. et al., 2010; Rahimi Z., da Costa Escobar Piccoli J. et al., 2012; Nourozi-Rad R., 2012; Tardin O.M., 2013). Следует также отметить, что в ряде работ такая взаимосвязь не упоминается (Dosenko V.E. et al., 2006; Andrikopoulos G.K. et al., 2008; Vasilakou M. et al., 2008; Gluba A. et al., 2009; Gad M. Z. et al., 2012). Однако несколько метаанализов подтверждают значительный рост рисков ИБС при указанном полиморфизме для гомо- и для гетерозигот (Макеева О.А. и др., 2013; Балацкий А.В., 2014; Осипова Е.С., 2018; Li J. et al., 2010; Lee Y.C. et al., 2012; Zhang K. et al., 2012; Tian G.X. et al., 2013; Levinsson A., 2014; Kayhan F.E. et al., 2016).

Обследование жителей города Томска позволило автору установить ассоциативность полиморфизма *G894T* гена eNOS и полиморфизма *LD* АПФ с риском возникновения ишемической болезни сердца, отягощённой сердечной недостаточности и с нарушениями ЭЗ ВД (Тепляков А.Т. и др., 2010, 2013).

Следует отметить, что большинство представленных исследований проведено в азиатских популяциях. Связь полиморфизма *G894T* с риском развития артериальной гипертензии не выявлена в метаанализе, проведенном Zintzaras E. et al. (2006). В то же время в аналогичном анализе, выполненном Niu W. и Qi Y. (2011), подобная связь диагностирована у азиатов, но не у европейцев. В российской популяции Кузнецова Т.Ю. и соавт. (2007) при анализе полиморфизма *G894T* не обнаружили различий в частоте генотипов между пациентами с гипертонической болезнью и лицами контрольной группы.

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования в области изучения влияния полиморфизма *G894T* на риск развития ИБС с различными факторами. По некоторым данным, полиморфизм *G894T* в большей степени увеличивает риск коронарного атеросклероза, чем интрацеребральных артерий (Min B.W. et al., 2010). Метаанализ Yao Y.S. et al. (2013) подтверждает зависимость степени риска развития ишемического инсульта от полиморфизма *G894T*. Данные исследования представляют существенный интерес, учитывая наличие большого количества общих факторов риска ИБС и цереброваскулярных заболеваний, а также доказанную роль ЭД в механизме зарождения ишемического инсульта (Chrissobolis S. et al., 2011; Go A. et al., 2014).

Молекулярный полиморфизм *G894T* до сих пор не изучен в полной мере и неоднозначно. По данным Veldman B.A. et al. (2002), у здоровых лиц при наличии аллеля *894T* отмечается сниженная активность *eNOS* и низкий уровень оксида азота в сыворотке крови. Отдельные исследования связывают полиморфизм *G894T* с повышенной чувствительностью молекулы фермента к протеолизу (Tesauro M. et al., 2000). Однако другие эксперименты эти данные не подтверждают (Fairchild T.A. et al., 2001; McDonald D.M. et al., 2004). Высказывается гипотеза о том, что полиморфизм *G894T* не влияет существенным образом на трансформацию активности фермента и нарушение продукции оксида азота, но косвенно, предположительно за счет сцепления с другим функционально важным геном, может расцениваться как косвенный генетический маркер ЭД (Козлов К.Л. и др., 2017; Yang Z., Ming X.F., 2006).

Относительно хорошо изученным является также полиморфизм *T786C* в промоторной области гена *eNOS*. Nakayama M. et al. с помощью люциферазного теста показали, что в случае замены тимина (*T*) на цитозин (*C*) в положении (-786) промотора его активность снижается, тогда как полиморфизм других участков промотора влиял на его активность (Nakayama M. et al., 2003). Предполагают, что возможный механизм влияния мутации *T (-786) C* в промоторе на считывание гена *eNOS* обусловлен специфическим связыванием белка репликации A1 с измененным сайтом промотора (Miyamoto Y. et al., 2000). Этот протеин известен

как белок, обладающий способностью к связыванию с одноцепочечными молекулами ДНК и необходимый для репарации, репликации и рекомбинации. Данный факт подтверждается тем, что введение олигонуклеотидной последовательности, комплементарной к упомянутому белку, восстанавливает транскрипционную активность промотора гена *eNOS* при наличии указанного полиморфизма.

В случае пониженной активности промотора в результате замены Т (-786) С наблюдается уменьшение количества информационных РНК *eNOS* и белковых молекул *eNOS*, что в дальнейшем приводит к соответствующему уменьшению синтеза NO. Doshi A. et al., применяя количественную полимеразную цепную реакцию в ходе изучения образцов миокарда пациентов, страдающих ХСН, отметили достоверно меньшее количество матричной РНК белка *eNOS* у гомозигот *CC* по сравнению с носителями аллеля Т (гомозиготы *TT* и гетерозиготы *TC*). Экспрессия белка *eNOS* также ниже у носителей *CC*-генотипа (Doshi A.A., 2010). Такие данные подтверждаются и в опытах на культуре клеток человека. Экспрессия фермента *eNOS* у носителей генотипа *CC* полиморфизма *T(-786)C* меньше, чем у гомозигот *TT* (Козлов К.Л. и др., 2017; Asif A.R. et al., 2009). Генотипы *TC* и *CC* ассоциированы со статистически значимым увеличением концентраций общего холестерина, липопротеидов низкой плотности (Han Y. et al., 2010), глюкозы (Alkharfy K.M. et al., 2010), а также понижением уровня эндотелий-зависимой вазодилатации гладкой мускулатуры стенок кровеносных сосудов (Imamura A. et al., 2008) и ростом инсулинорезистентности у страдающих кардиомиопатией ишемического и неишемического типа (Vecoli C. et al., 2012). Косвенно данные показатели указывают на зависимость риска развития ЭД от данного полиморфизма (Козлов К.Л. и др., 2017; Forconi S. et al., 2017).

В четвертом интроне гена *eNOS* описан полиморфизм вариативности нуклеотидных повторов (*VNTR* — от англ. variable number of tandem repeats). Наличие аллелей *a*, встречающихся реже, чем аллели *b*, и содержащих, соответственно, 4 и 5 копий повторов, является причиной роста количества

коротких интерферирующих РНК (siRNA – от англ. small interfering RNA) и уменьшения количества мРНК с одновременным снижением количества активных молекул фермента (Zhang M.X. et al., 2008). Изучая особенности турецкой популяции пациентов без ангиографических признаков ИБС, Matyar S. et al. (2005) отметили следующую частоту генотипов:

- $a/a = 0,8 \%$;
- $a/b = 26,3 \%$;
- $b/b = 72,9 \%$.

Исследование ассоциаций между $4a/b$ полиморфизмом *eNOS* и ИБС, проведённое Wang X.L. et al. (1996), выявило, что гомозиготы по *a*-генам являются высокорисковыми относительно прогнозов развития ИБС. При этом влияние варианта $4a$ связывают со сбоем в экспрессии гена *eNOS* и, как следствие, с уменьшением продукции оксида азота. Полуниин О.С. и соавт. в ходе исследования этой зависимости установили, что увеличение доли $4a$ аллеля у обследованных пациентов может выступать предрасполагающим фактором риска возникновения ИБС, причём как в виде монопроявления, так и в сочетании с бронхолегочной нозологией. Метаанализ на основе обследования 10 617 больных и 8 302 здоровых лиц, подтвердил прогностичный характер $4a/b$ полиморфизма в отношении риска развития ИБС, особенно у африканской популяции (Yujiào Y. et al., 2014).

Salimi S. et al. (2006), Екмекси А. et al. (2013) при обследовании выборки из 300 человек иранской популяции обнаружили, что частота $4b/b$, $4a/b$ и $4a/a$ генотипов по данному полиморфизму *eNOS* в группе пациентов с ангиографически подтвержденной ИБС и в группе контроля составляет 68,8 %, 29,1 % и 2,1 %, и 81,0 %, 18,4 % и 0,6 % соответственно, что свидетельствует о том, что данный полиморфизм нельзя рассматривать как независимый фактор риска ИБС в иранской и турецкой популяциях.

В то же время Yang Y. (2014), проведя метаанализ результатов нескольких исследований, установил ассоциацию $4a/b$ полиморфизма гена *eNOS* с развитием ишемии. Долгосрочное исследование совокупности генетических полиморфизмов

eNOS, проведенное британскими учеными, позволило сопоставить влияние на течение ИБС гиперхолестеринемии, гипертензии, курения и полиморфизмов eNOS 786 T/C, 922 A/G, 894 G/T и 4a/4b у мужчин среднего возраста (3052 пациента и 571 здоровый доброволец). При этом не выявлено четкой взаимосвязи между полиморфизмами генов и рисками сердечно-сосудистых событий, а также прогрессированием ИБС, включая гиперхолестеринемия и гипертензию (Nepes G. et al., 2016; Kayhan F.E. et al., 2016).

В российской популяции Тепляков А.Т. и соавт. (2010) не обнаружили ассоциаций между полиморфизмом 4a/b и дисфункцией эндотелия у больных ИБС. В то же время Чистяков Д.А. и соавт. (2000) при обследовании населения г. Москвы и Московской области выявили связь между полиморфизмом 4a/4b и риском развития нарушения кровоснабжения сердца.

В литературе присутствуют единичные исследования, посвященные изучению влияния гаплотипов полиморфизмов eNOS на течение и исходы сердечно-сосудистых заболеваний. Martinelli N.C. et al. (2012) выявили для европейской популяции в группе с сердечной недостаточностью (снижением фракции выброса в среднем до 31 %) и группе контроля аналогичное распределение гаплотипов eNOS T-786C, VNTR 4a/b и Glu298Asp, но исследование отдельно группы афробразильцев показало значимость влияния гаплотипа

-786C / 4B / Asp298 на частоту возникновения ИБС. Для данных обследованных характерен лучший прогноз в сравнении с пациентами – носителями иных гаплотипов. Так, гаплотип eNOS явился независимым предиктором выживаемости у таких больных (скорректированное отношение шансов 0,11; 95 % ДИ = 0,01–0,83; p = 0,03).

Данные литературы в отношении вышеуказанных полиморфизмов крайне противоречивы и подчеркивают необходимость дальнейшего исследования генетических факторов в связи с ИБС, как клинически, так и ангиографически подтвержденной, в различных популяциях с вовлечением в анализ большего числа полиморфных вариантов (Granathet B. et al., 2001; Matyar S. et al., 2005;

Kim I.J. et al., 2007; Sinici I. et al., 2009; Jaramillo P.C. et al., 2010; Li J. et al., 2010; Neper G. et al., 2016).

К настоящему времени описано не менее 30 полиморфизмов в гене iNOS, локализованных как в регуляторной, так и в кодирующей области. Большинство из них изучено в отношении риска развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Учитывая современные представления о роли воспаления и инфекционных агентов в патогенезе эндотелиальной дисфункции, а также атеросклероза, представляет существенный интерес изучение полиморфизмов iNOS в отношении риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы (Libby P. et al., 2013). Однако до настоящего времени этой проблеме посвящены лишь единичные исследования. Gonzalez-Gay M.A. et al. (2009) не обнаружили ассоциации между полиморфизмом $(CCTTT)_n$ гена iNOS и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний в популяции больных ревматоидным артритом. В то же время Тепляков А.Т. и соавт. (2010) установили, что количество tandemных пентануклеотидных повторов $(CCTTT)_n$ коррелирует с функциональным классом сердечной недостаточности.

Важно отметить, что полиморфизмы, локализованные в промоторной области гена iNOS, могут по-разному влиять на активность или количество образующегося фермента и, следовательно, на синтез ими оксида азота. Так, по данным Shen J. et al. (2004), полиморфизмы tandemных пентануклеотидных повторов $(CCTTT)_n$, локализованные в промоторной области ($-954G/C$, $-1173C/T$, $-1659 A/T$), приводят к изменению экспрессии соответствующего гена, в то время как олигонуклеотидный полиморфизм *rs2297518*, локализованный в этой же области, влияет на активность фермента. Представленные данные обуславливают необходимость изучения влияния конкретного полиморфизма на количество синтезированного оксида азота, что может иметь существенное значение, учитывая современные представления о роли iNOS в промоции атерогенеза.

До настоящего времени остается малоизученной связь полиморфизмов гена pNOS с развитием эндотелиальной дисфункции. Наличие подобной связи теоретически может быть обосновано результатами ряда экспериментальных

исследований, свидетельствующих о наличии у nNOS выраженного антиатеросклеротического действия. Точные механизмы подобного эффекта не установлены. Предполагается, что nNOS может влиять на риск развития атеросклероза как прямыми (например, через модуляцию клеточного состава атеросклеротической бляшки или за счет локального синтеза оксида азота), так и непрямыми механизмами (посредством влияния на системное артериальное давление, секрецию гормонов) (Lowenstein C.J., 2006). В то же время установлено, что некоторые полиморфизмы гена nNOS (*rs10494366* и *rs4657139*) ассоциированы со значительным увеличением риска внезапной сердечной смерти (Arking D.E. et al., 2006; Aarnoudse A.J. et al., 2007; Kao W.H. et al., 2009).

1.3 Рестеноз внутри стента в современной интервенционной кардиологии

1.3.1 Определение, эпидемиология, факторы риска

Коронарное стентирование в современной кардиохирургии признано «золотым стандартом» лечения ИБС. В Швейцарии на 1 млн человек проводится в год порядка 4,9 тыс. стентирований, в Германии – 3,7 тыс. Россия к 2013 г. констатировала всего 20 тыс. эндоваскулярных операций, что явно недостаточно (Савченко А.П. и соавт., 2013). В 2018 году этот показатель достиг 220 тыс., а к 2024 году прогнозируется рост до 340 тыс. операций в год.

Имплантация стента в коронарные артерии человека впервые проведена в 1986 г. Sigwart E.S. et al. под контролем рентгенографической визуализации: Sigwart подверг дилатации суженный сегмент артерии и произвёл введение импланта в пораженный участок (Mack M.J. et al., 2004; Kolh P., Wijns W., 2012; Redwood S.R., 2013). Основное ограничение этого метода заключается в риске развития рестеноза в стенке. Частично данный риск нивелируется использованием имплантов с лекарственными покрытиями (СЛП), однако это не снижает актуальности проблемы и, как следствие, поиска новых предикторов рестенозирования.

В настоящее время рестеноз внутри стента (PBC, in-stent restenosis) является одной из ключевых проблем интервенционной кардиологии. В последние годы для обозначения сужения внутреннего просвета сегмента коронарных артерий используется термин «негативное ремоделирование». Диссекция сосудистой стенки КА при раздувании баллона для введения импланта выражается в виде надрыва или растяжения интимы, разрыва меди и адвентиции – среднего и внешнего слоёв стенки сосуда. Регенерация тканей начинается с воспаления и определяется миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток и фибробластов в область воспаления. Ангиогенез сопровождается образованием неоинтимы на фоне синтеза протеогликанов и коллагена, заменяющих основу внеклеточного пространства - фибронектина. Патология процесса ремоделирования выражается в развитии рестеноза, при этом его ангиографическим критерием является сужение внутреннего просвета сегмента КА, подвергнувшегося стентированию, более чем на 50 % (Kim M.S., Dean L.S., 2011; Tsigkas G.G. et al., 2011).

Эволюция механизмов и методик коронарного стентирования происходит одновременно с совершенствованием постоперационной фармакотерапии. Несмотря на это, частота PBC в настоящее время оценивается в 20–25 % (Kastrati A. et al., 1997; Akiyama T., et al. 1998; Kim M.S., Dean L.S., 2011). Для высокорисковых групп этот показатель ещё выше — 40–50 %.

Безусловно, разработка и внедрение в клиническую практику дилатации с СЛП снизило степень риска PBC до 10 %. Однако проблема постоперационных осложнений требует комплексного решения (Ганюков В.И., Протопопов А.В., 2014; Kim M.S., Dean L.S., 2011; Minha et al., 2013; S. Lesser I.A. et al., 2016). Этот аспект во многом объясняет повышенный научный кардиогенетический и практический кардиохирургический интерес к углубленному исследованию механизмов развития PBC в области патогенетики, что поможет выработать механизм предупреждения и локализации факторов риска PBC.

Сахарный диабет на сегодняшний день остаётся одним из самых серьёзных факторов, увеличивающих риск постоперационных осложнений (Сумин А.Н.,

2014; Rydén L. et al., 2014). Статистика частоты РВС среди стентированных из числа страдающих сахарным диабетом составляет 50 % даже при применении СЛП (Heper G.V. et al., 2002; Lemos P.A. et al., 2004; Mathew et al., 2004; Ma S. et al., 2011). Такой высокий риск обусловлен как системными изменениями, в частности повышенным уровнем медиаторов воспаления, так и локальными изменениями коронарных артерий (уменьшение диаметра сосудов, большая протяженность стеноза, диффузное атеросклеротическое поражение) (Kim M.S., Dean L.S., 2011).

По данным литературы можно указать ряд морфологических прогностических признаков развития ангиографического РВС: длина стеноза свыше 20 мм, устьевые поражения, бифуркационное и множественное стентирование, а также имплантация в венозные шунты, проксимальную треть передней нисходящей артерии и артерии малого диаметра (менее 3 мм), хроническая окклюзия (Berenguer A. et al., 2005; Stone G.W. et al., 2005). Риск РВС также повышается при малом (менее 3 мм) диаметре сосуда после установки эндопротеза и его неоптимальном расположении (Dean L.S., Kim M.S., 2011).

В настоящее время получены убедительные доказательства важной роли воспаления в развитии РВС, что спровоцировало повышенный интерес к изучению предиктивных возможностей иммунологических маркеров. Данные ряда исследований констатирует значительный рост вероятности риска возникновения РВС при увеличении плазменных концентраций С-реактивного белка, фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), трансформирующего ростового факторов бета и интерлейкинов-6, 10 (Hojo Y. et al., 2000; Suzuki T. et al., 2000; Ikeda U. et al., 2001; Szkodzinski J. et al., 2009; Zurakowski A. et al., 2009), однако в исследовании, проведенном Hudzik B. et al. (2009), такой связи выявлено не было. Sergev A. et al. (2004) не выявили прогностической значимости концентраций интерлейкина-6 и С-реактивного белка, однако обнаружили их повышение после проведения стентирования.

Наиболее клинически значимой в промоторной зоне гена TNF- α из 8 полиморфных участков с единичными нуклеотидными заменами на сегодняшний

день является замена гуанидина аденином (G/A) в положении *G-308A (rs1800629)* и *G-238A (rs361525)*, что оказывает непосредственное влияние на экспрессию белка исследуемого фактора. Принято считать, что эти полиморфизмы связаны с развитием атеросклероза и, как следствие, с ишемией. Транскрипционная активность усиливается благодаря данным аллелям, что вызывает увеличение концентрации TNF- α и влияет на развитие рестеноза после стентирования (Ghazouani L. et al., 2015).

В возникновении постоперационного рестеноза заметную роль играют полиморфные варианты гена интерлейкина-10 (ИЛ-10), обусловленные однонуклеотидными заменами в положениях -592 и -819 . Результаты исследований Gao D. et al. (2011) азиатской популяции показывают увеличение частоты носительства гомозиготного генотипа *AA* полиморфизма *C-592A* и гетерозиготного генотипа *AT* полиморфизма *C-819T* гена *ИЛ-10* до 59 %. Такой высокий уровень может расцениваться как признак повышенного риска рестеноза: у носителей аллеля *A* полиморфизмов *C-592A* и *C-819T* уровень *ИЛ-10* в сыворотке крови снижается. Исследования полиморфизма *G-238A* гена *ИЛ-10*, проведенного Н. Volzke среди европейской популяции, выводят его в маркеры риска развития рестеноза на дооперационной стадии при проведении индивидуального скрининга больного. Важно отметить, что зависимость между полиморфизмами *C-592A* и *C-819T* гена *ИЛ-10* и развитием рестеноза в стенке для европейской популяции не характерна (Monraats P.S. et al., 2006; Tiroch K. et al., 2009; Koch W. et al., 2013).

Результаты исследований РВС недостаточно однозначны, что отчасти можно объяснить популяционными различиями, а также неоднородностью обследуемых пациентов в аспекте иных факторов риска развития рестеноза.

1.3.2 Патогенетические механизмы развития РВС и роль эндотелиальной дисфункции

В основе развития РВС лежит патологическое ремоделирование стенки сосудов — эластическое сраствение просвета, пристеночное тромбообразование и гиперплазия интимы (Schwartz R.S., Henry T.D., 2002; Kibos A. et al., 2007; Weintraub W.S., 2007). Lerman A. et al. (2005) высказывают мнение относительно отнесения к основным компонентам патогенеза РВС хронической вазоконстрикции и неоинтимальной гиперплазии, обусловленной миграцией и пролиферацией ГМК и ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса.

Наблюдения за пациентами, перенесшими инвазию по поводу стентирования, свидетельствуют, что постоперационное сужение просвета в сегменте размещения импланта является результатом неоинтимальной гиперплазии, пролиферации ГМК, синтеза экстрацеллюлярного матрикса, что позволяет считать его ведущим морфологическим предиктором рестеноза после КС (Junk S., 2013).

Патофизиологические и морфологические механизмы развития рестеноза еще до конца не изучены. Процесс развития рестеноза представляет собой последовательно сменяющиеся друг друга формирование пристеночного тромба, воспаление в сосудистой стенке, миграцию и пролиферацию ГМК, синтез матриксных белков (Tashiro H., 2011).

Повреждение интимы сосуда любой этиологии, в том числе и обусловленное введением в его просвет стента, приводит к развитию локального воспаления, адгезии тромбоцитов с последующим пристеночным тромбообразованием, активации, пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, усилению синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса и реэндотелизации. Активация тромбоцитов приводит к локальному тромбообразованию, развитию воспаления и усилению процессов пролиферации, а также к усилению активности тромбина (Libby P., Simon D.I., 2001; Minha S. et al., 2013). Важно отметить, что в таких условиях тромбоциты продуцируют

трансформирующий ростовой фактор бета (способствует синтезу белков экстрацеллюлярного матрикса), серотонин (способствует пролиферации ГМК и вазоконстрикции), тромбоксан А2 (обеспечивает вазоконстрикцию, дополнительную адгезию и агрегацию тромбоцитов), тромбин, фибрин, тромбоцитарный фактор роста (индуцируют миграцию клеток-предшественниц и пролиферацию ГМК) (Libby P., Simon D.I., 2001; Schwartz R.S., Henry T.D., 2002; Mitra A.K., Agrawa D.K., 2006; S. Lesser I.A. et al., 2016).

В норме интактный эндотелий препятствует пристеночному тромбообразованию и адгезии тромбоцитов, а также является естественным барьером, защищающим стенку сосуда от действия факторов пролиферации. Повреждение эндотелия является важным индуктором пролиферации ГМК, обуславливающим развитие неоинтимальной гиперплазии (Marx S.O. et al., 2011). Установлено, что образование ГМК происходит из прогениторных клеток (клеток-предшественников), локализованных преимущественно в костном мозге и стенке сосудов (Orlandi A. et al., 2010). Пролиферация прогениторных клеток может возникать в том числе и в ответ на действие провоспалительных цитокинов (интерлейкины-1, 6, TNF- α), и в норме обеспечивает восстановление поврежденной стенки сосуда. В эксперименте на животных, связанном с введением внутрисосудистого стента, продемонстрированы повреждения стенки сосудов и установлено, что травма эндотелия приводит к мобилизации костно-мозговых прогениторных клеток, а также к их миграции в стенку сосудов, что сопровождается их дифференцировкой в ГМК. Эти процессы лежат в основе неоинтимальной гиперплазии. Некоторые авторы считают, что доля клеток костно-мозгового происхождения в неоинтимае при этом составляет 66 % (Sata M. et al., 2002; Caplice N.M. et al., 2003). Ключевая роль в стимулировании неоинтимальной пролиферации при РВС принадлежит свойству прогениторных клеток превращаться в адвентициальные фибробласты, мигрировать в неоинтиму с дифференцировкой в миофибробласты и ГМК (Mitra A.K., Agrawa D.K., 2006; S. Lesser I.A., et al. 2016). И это объясняет повышенный интерес со стороны практикующих кардиохирургов к изучению молекулярных механизмов

обеспечения пролиферации и миграции прогениторных клеток, поскольку результаты исследований могут стать основой создания новых мишеней для терапевтического воздействия при коронарном стентировании (Marx S.O. et al., 2011).

Инвазия стенки сосуда при имплантации стента запускает механизм апоптоза сократительных ГМК (Li L. et al., 2013), что может инициировать увеличение толщины сосудистой стенки (Kollum M. et al., 1997; Weintraub W.S. et al., 2007; Forconi S. et al., 2017).

Важное значение в развитии неоинтимальной гиперплазии имеет также избыточное накопление экстрацеллюлярного матрикса, синтез компонентов которого может стимулироваться большим количеством цитокинов. В ряде случаев при развитии РВС экстрацеллюлярный матрикс, состоящий преимущественно из протеогликанов и коллагена, может занимать практически весь объем сосудистой стенки. Синтез компонентов экстрацеллюлярного матрикса осуществляется в основном модифицированными ГМК, фибробластами и миофибробластами (Kibos A. et al., 2007).

Таким образом, развитие РВС следует рассматривать как сложную, протекающую в динамике цепь патологических причинно-следственных реакций с двумя основными этапами:

- 1) воспаление и локальное тромбообразование;
- 2) пролиферативные процессы, приводящие к неоинтимальной гиперплазии (Kibos A. et al., 2007; Weintraub W.S., 2007).

ЭД – важнейший компонент патогенеза РВС. Оксидативный стресс, вероятно, следует рассматривать в качестве основного фактора уменьшения концентрации *NO* в месте развития рестеноза (Juni R.P. et al., 2013). Избыточное потребление оксида азота в этом случае объясняется образованием пероксинитрита и повышением продукции эндогенного ингибитора eNOS окисленными формами липопротеидов низкой плотности. Это неизбежно приводит к усилению синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также к интенсификации пролиферации клеток и активации оксидативного

стресса и, как следствие, к дальнейшему уменьшению содержания оксида азота (Kibos A. et al., 2007; Weintraub W.S. et al., 2007; Trovati M. et al., 2016).

Важная роль дефицита оксида азота в развитии РВС подтверждена экспериментально и клинически. Риск рестеноза выше у прооперированных с нарушением эндотелий - зависимой вазодилатации (Patti G. et al., 2005; Thanyasiri P. et al., 2007). Эксперименты на мышах продемонстрировали, что под воздействием *NO* снижается пролиферация гладкомышечных клеток и развитие неинтимальной гиперплазии предотвращается (Maffia P. et al., 2002).

Следует отметить, что низкая концентрация оксида азота может являться фактором риска развития РВС. Так, по данным Derkacz A. et al. (2011), повышенная плазменная концентрация асимметричного диметиларгинина является независимым предиктором развития рестеноза после ангиопластики. Представленные данные свидетельствуют о важной протективной роли оксида азота при развитии РВС как вазодилатирующего, антиагрегантного и антипролиферативного соединения.

1.4 Связь полиморфизмов генов NO-синтаз с риском развития РВС

В последнее время отмечается повышенный интерес кардиологов к роли полиморфизмов генов NO-синтазы в развитии РВС. Причина заключается в экспериментальных и клинических исследованиях, результаты которых подтвердили:

1) у оксида азота присутствуют вазодилатирующий и антиагрегантный эффекты и способность к снижению адгезии лейкоцитов (Förstermann U., Sessa W.C., 2012; Triggle C.R. et al., 2012; Forconi S., Gori T., 2013);

2) способность оксида азота ингибировать пролиферацию и миграцию ГМК (Janssens S. et al., 1998; Maffia P. et al., 2002), роль которых в развитии РВС убедительно доказана (Kibos A. et al., 2007; Weintraub W.S., 2007; Kim M.S., Dean L.S., 2011);

3) важную связь оксида азота и эндотелиальной дисфункции у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями (Yang Z., Ming X.F., 2006; Mudau M., et al. 2012);

4) связь между развитием эндотелиальной дисфункции и полиморфизмами гена eNOS (прежде всего полиморфизмы *G894T* и *T786C*).

В 2002 году с целью изучения возможного влияния полиморфизмов генов на развитие рестеноза после чрескожного вмешательства в американской популяции исследовано 62 гена-кандидата. Статистически значимую связь с частотой развития рестеноза продемонстрировали полиморфные варианты 7 генов, в числе которых гены, кодирующие eNOS (Samos S. et al., 2012; Wang S. et al., 2013; Whayane T.F., 2015).

В дальнейшем исследования в данной области велись с переменным успехом. Verschuren J.J.W. et al. (2012), попытавшиеся объединить и структурировать данные литературы о влиянии полиморфизмов на развитие и прогрессирование рестеноза после чрескожной коронарной интервенции (исследование GENOM), обратили внимание на чрезвычайную несогласованность результатов клинических исследований 36 генов-кандидатов, среди которых и гены eNOS. Этот факт авторы объяснили относительно небольшими объемами выборок клинико-генетических испытаний, а также фенотипическими различиями исследуемых групп и отсутствием необходимых когорт.

Действительно, некоторые данные литературы свидетельствуют о доказанной связи полиморфизмов *Glu298Asp*, *-786T/C* с развитием РВС. Предметом исследования, выполненного группой японских ученых под руководством Т. Suzuki в 2002 г., явилось влияние полиморфизма *Glu298Asp* (*G894T*) гена eNOS на риск развития РВС после проведения коронарного стентирования с использованием импланта Palmaz-Schatz. Выявлена статистически значимая связь между указанным полиморфизмом и риском развития рестеноза ($p = 0,025$). Частота встречаемости сахарного диабета, артериальной гипертензии и курения статистически значимо не различалась

между двумя группами. Не выявлено и статистически значимых гендерных различий.

В исследовании, выполненном Gomma A.H. et al. (2002) в Великобритании, изучалось влияние полиморфизмов *Glu298Asp* и *-786T>C* на риск развития РВС. Показано, что наличие аллеля *298Asp* ассоциировано со значительным увеличением риска развития РВС (отношение шансов — 1,88; 95 % доверительный интервал (ДИ): 1,01—3,51, $p = 0,043$).

Gorchakova O. et al. (2003) изучили влияние полиморфизма *894 G/T* на риск развития РВС в немецкой популяции. Генотип *TT* выявлен в 10,4 % случаев, *GG* — в 46,8 %, *GT* — в 42,8 % случаев. Через 6 месяцев после проведения стентирования РВС выявлен у 35 % пациентов с генотипом *TT* и у 32,7 % пациентов — носителей аллеля *G* (отношение шансов — 1,1; 95 % ДИ: 0,78–1,56). При проведении многомерного логистического анализа в целях исключения влияния других возможных факторов риска рестеноза (сахарный диабет, артериальная гипертензия, морфологические предикторы) отношение шансов составило 1,12 (95 % ДИ: 0,78–1,56). Реваскуляризация миокарда потребовалась 23 % пациентам с генотипом *TT* и 20,5 % пациентам с генотипами *GT* и *GG*. Таким образом, в данном исследовании не выявлено влияния полиморфизма *894 G/T* на риск развития РВС. Однако при анализе вторичной конечной точки показано, что у пациентов с генотипом *TT* чаще развивается инфаркт миокарда (4,7 % против 2,2 %) и выше показатель 1-годовой летальности (3,6 % против 1,7 %). Отношение шансов для наступления летального исхода в течение 1-го года у пациентов с генотипом *TT* составило 2,14 (95 % ДИ: 1,23–3,72) (Gorchakova O. et al., 2003).

Интересны данные словенских ученых D. Petrovic и V. Peterlin (2005). Известно, что в механизмах рестенозирования сосудов после коронарной ангиопластики и коронарного стентирования есть существенные различия: в первом случае рестеноз формируется за счет артериальной реконструкции, а во втором почти единственным механизмом является неоинтимальная гиперплазия.

Ученые предположили, что некоторые полиморфизмы, в том числе *eNOS Glu298Asp* (наличие аллеля 298 Asp), *-786T>C*, связаны именно с процессом в неointиме, учитывая спектр действия фермента, и могут выполнять функцию генетических маркеров РВС, но не ангиопластики или шунтирования. Эта гипотеза подтвердилась статистически.

В 2008 г. Galluccio E. et al. опубликовали результаты исследования связи полиморфизмов *Glu298Asp* и *rs753482* гена *eNOS* с риском развития РВС у больных нестабильной стенокардией, проживающих в Италии. По данным исследования, наличие двух минорных аллелей (*TT* и *CC*) ассоциировано с увеличением риска развития РВС в 3,64 раза (95 % ДИ: 3,04–4,36), а если рассматривать отдельно каждый — примерно вдвое (Gorchakova O. et al., 2003).

Исследование подтвердило ассоциированность минорных аллелей *TT* и *CC* с гиперинсулинемией как натощак, так и после глюкозной нагрузки. Отмечалось повышение в плазме крови концентрации лептина и уменьшение концентрации адипонектина, а также снижение дилатации плечевой артерии в пробе на реактивную гиперемия (Galluccio E. et al., 2008). Лептин принимает участие в регуляции активности *eNOS* и способствует развитию атеросклероза КА у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. Он провоцирует прирост активности протеин-зависимой киназы TOR (mTOR — от англ. mammalian target of rapamycin) и фосфатидилинозитол-3-киназы, усиливая в поверхностных и глубоких слоях интимы пролиферацию гладкомышечных клеток (Shawn J. et al., 2008; Reilly M.P. et al., 2014), активацию ангиотензиновой системы и активацию синтеза бициклического полипептида эндотелина (Trovati M. et al., 2013; Neper G., 2017).

В литературе присутствуют данные единичных исследований роли полиморфизмов *NOS* в развитии РВС в российской популяции, при этом размер выборки относительно небольшой. Шувалова Ю.А. с соавт. провели оценку влияния полиморфизма *Glu298Asp* на развитие рестеноза в стенке у мужчин, перенесших стентирование. В результате выявлено, что у пациентов генотипа *GT+TT* частота развития повторного сужения стентированных артерий в 1,8 раза

выше, чем у носителей генотипа *GG* (60 % к 33 %, $p = 0,008$), что подтверждает статистически значимую ассоциацию наличия минорного аллеля полиморфизма *G298T* с риском формирования РВС как отдельно, так и в сочетании с *-786T/C* полиморфизмом (2,79 против 95 %, ДИ: 1,17–6,66). Эти данные соответствуют полученным при исследованиях в европейской популяции.

В целом результаты опубликованных исследований следует интерпретировать с осторожностью, так как небольшой размер выборки иногда приводит к ложнопозитивному результату, не подтверждающемуся в более крупном исследовании, а также подразумевает широкий доверительный интервал.

С другой стороны, необходимо учитывать, что процесс рестеноза мультифакторный и на его течение могут оказывать влияние несколько генов. В таком случае относительно небольшие риски, касающиеся одного полиморфизма, могут иметь большое значение в общей картине генетической подверженности, индивидуальной для каждого пациента (Березикова Е.Н., 2014; Визитенко С.И. и др., 2015).

1.5 Заключение

В настоящее время физиологические эффекты оксида азота достаточно хорошо изучены. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о важной роли этой молекулы в регуляции большого количества физиологических и патологических процессов в организме. Охарактеризованы сложные механизмы регуляции синтеза оксида азота, связанные как с активацией экспрессии соответствующих генов, так и с аллостерическими преобразованиями молекул фермента.

Доказанной является роль дефицита оксида азота в развитии эндотелиальной дисфункции, являющейся важнейшим компонентом патогенеза таких широко распространенных и социально значимых заболеваний, как ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия.

К настоящему времени получены убедительные доказательства, свидетельствующие о связи полиморфизмов генов NO-синтаз с возникновением эндотелиальной дисфункции. Не до конца изученными являются патологические последствия, ассоциированные с различными полиморфизмами, их влияние на экспрессию соответствующего гена, активность фермента и его метаболизм.

Одним из состояний, при котором эндотелиальная дисфункция играет важную роль в патогенезе, является рестеноз внутри стента — осложнение коронарной ангиопластики и стентирования.

К настоящему времени в единичных исследованиях охарактеризована связь между развитием данного состояния с полиморфизмами *G894T*, *786T>C*, *rs753482* гена *eNOS*. Тем не менее, учитывая незначительное количество проведенных исследований, а также противоречивость полученных в них результатов, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 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.

Возраст больных в среднем составил $61,1 \pm 9,04$ года. Среди них было 362 (74,9 %) мужчины и 121 (25,1 %) женщина.

251 (51,86 %) человек указал в анамнезе на артериальную гипертензию, у 28 (5,79 %) диагностирован компенсированный сахарный диабет II типа.

Степень сужения пораженной коронарной артерии составила в среднем $80,52 \pm 15,88$ %.

Стентирование коронарных артерий проведено 212 пациентам, из которых впоследствии у 62 (29,2 %) зафиксирован ангиографически верифицированный рестеноз в стенке.

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 стенте 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.

2.2 Методы исследования

Исследование проводилось на базах лабораторий 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) и 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).

2.2.1 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).

2.2.2 Выделение геномной ДНК

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

Протокол метода: 0,7 мл (700 мкл) крови с ЭДТА помещали в эппендорф на 1,5 мл, добавляли 0,8 мл 1*SSC, помешивали.

Центрифугировали при 12–13 тыс. об/мин 2 минуты, надосадочную жидкость сливали. К полученному остатку добавляли объем буфера в размере 1,4 мл однонормального раствора цитрата и хлорида натрия, размешивали осадок на центрифуге вортекс.

Проводили центрифугирование при 12–13 тыс. об/мин в течение 2 минут, надосадочную жидкость сливали. Вливали 270 мкл 0,2 М ацетата Na (CH₃COONa) с pH 7, встряхивали до получения однородного раствора, вливали 30 мкл 10 % SDS (натриевая соль лаурилсерной кислоты) и далее встряхивали. Перемещали пробирки в термостат с температурой 37 °С на 1 час. После инкубации добавляли фенол-хлороформ (1:1), 300 мкл (по 150 мкл каждого реактива), перемешивали 8–10 минут. Центрифугировали при 13 тыс. об/мин 8 минут. Водную фазу переносили в чистый эппендорф, не захватывая интерфазу. К супернатанту в чистом эппендорфе добавляли 1 мл 96 % холодного спирта и немного перемешивали для осаждения ДНК. Центрифугировали при 12 тыс. об/мин 30 с, затем спирт сливали. Повторно добавляли 70 % спирт. Центрифугировали при 12 тыс. об/мин 30 с, затем спирт сливали. Просушивали

эппендорфы. Добавляли 50–60 мкл воды и оставляли растворяться на ночь (Херрингтона С. и др., 1999; Муслимова Э.Ф., 2016).

2.2.3 Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию осуществляли в микропробирках «эппендорф» объемом 0,5 мл на четырехканальном ДНК-амплификаторе «Терцик» и ДТ-96. Реакционная 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):

forward 5' — GGCTGGACCCCAGGAAA — 3',

reverse 5' — CCACCCAGTCAATCCCTTTG — 3';

eNOS (VNTR):

forward 5' — GGCAGGTGTGAGGAGCATCC — 3',

REVERSE 5' — GCCTCCGTTGTTCTCAGGTA — 3';

eNOS (-786 T/C):

forward 5' — TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA — 3',

reverse 5' — GCCTCCACCCCACCCTGTC — 3' ;

NOS3 (774 C/T):

forward 5' — AGGCGGGGCTCTGACCAGCTCTTCCCCAT — 3',

reverse 5' — ACCTTGGGGACACCCTCATGGGTGGCC — 3';

NOS3 (691 C/T):

forward 5' — CAGCCCTAGTCTCTCTGCTGACTGCGGCCC — 3',

reverse 5' — CCACAGGGACCTCTAGGGTCATGCAGGTTT — 3';

NOS2 (CCTTT)_n:

forward 5' — ACCCCTGGAAGCCTACAACCT-3',

reverse 5' — GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA-3',

индивидуально подбирали соответствующую концентрацию ионов Mg^{2+} и программу амплификации для каждой пары праймеров.

Детекцию проводили в режиме реального времени и в 2 % агарозном геле с использованием ТБ-буфера (5,4 г Трис; 2,75 г борной кислоты; 0,46 г ЭДТА; dH_2O до 1 л, $pH = 8,3$) 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.

2.2.4 ПДРФ-анализ

В основе метода лежит создание в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) естественного сайта рестрикции в одном из аллелей: если короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, распознаваемая рестриктазой, присутствует в минорном аллеле, то в нормальном аллеле его нет и, наоборот, наличие сайта рестрикции в нормальном аллеле элиминирует его в минорном аллеле. Бывает такое, что сайт рестрикции находится в двух аллельных вариантах, при этом в одном из аллелей (нормальном или минорном) содержится два сайта рестрикции (Муслимова Э.Ф., 2016).

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».

2.2.5 Биоинформационная модель

Методы компьютерного и молекулярного моделирования использовали для изучения механизмов влияния точечных мутаций генов NO-синтаз на ферментативную активность. Вносили соответствующие выбранным точечным мутациям замены в аминокислотную последовательность белков, проводили индивидуальные симуляции молекулярной динамики всех исследуемых модифицированных ферментов. Затем проводили сравнительный анализ результатов симуляций молекулярной динамики мутированных NO-синтаз с оригинальными образцами, взятыми из базы данных. В работе использовали подходы как системной, так и структурной биоинформатики (Pevsner J., 2013).

Первоначально осуществляли поиск информации по исследуемым мутациям NO-синтаз по идентификационным номерам rs, с использованием базы данных однонуклеотидных полиморфизмов (dbSNP – от англ. database of single nucleotide polymorphisms). Для каждого предоставленного идентификационного номера модификации найдены соответствующие замены в аминокислотной последовательности ферментов.

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 SwissPDBViewer. Исследование молекулярной динамики проводили при помощи пакета программ GROMACS 4.6. Все симуляции NO-синтаз и их модификаций проводили с помощью программного обеспечения в идентичных условиях для обеспечения корреляции результатов.

Для процессов расчета использовали силовое поле ffAmber99SB. При подготовке систем для симуляции использовали ячейки с отступом в 1 нм от белковой молекулы, заполненные водой TIP3P с добавлением ионов для нейтрализации системы. В процессе своей подготовки она минимизировалась в

два этапа. Сначала проводили «утряску воды», при которой молекула белков и гемма оставались неподвижными. После чего проводили полную минимизацию системы. В дальнейшем использовали повышение температуры до 300 К. Для расчета и поддержания температуры использовали алгоритм «velocity-rescale». При расчете температур учитывались отдельно белковые молекулы, ионы, вода и гем. В нашей работе такой механизм позволил избежать скопления участков с высокой температурой и, напротив, недостаточно разогретых. В дальнейшем после разогрева повышали давление. Давление поддерживали на уровне атмосферного при помощи алгоритма «Parrinello-Rahman». На следующем этапе применяли запуск симуляции молекулярной динамики. Расчеты движений проводили на траектории 15 нс. Для расчета кулоновских взаимодействий использовали метод «PME». Расчет ван-дер-ваальсовых взаимодействий проводили для атомов в радиусе 1,4 Å, электростатические взаимодействия учитывали для атомов не дальше чем 0,9 Å друг от друга. При расчете молекулярной динамики использовали периодические условия (PBC), которые имитируют большой объем системы с множеством белковых молекул.

В данном исследовании анализ полученных траекторий молекулярной динамики проводили различными алгоритмами по следующим параметрам: RMSD, RMSF, количество водородных связей, DSSP, SAS.

RMSD (Root Mean Square Deviation) — это среднее (среднеквадратичное) отклонение положения атомов молекулы во времени. При расчете этого параметра сначала определяли изменение положения для каждого атома во времени относительно его первоначального положения, а затем полученные значения усредняли для целой молекулы или выбранных участков. В пакете GROMACS данный параметр измеряется в нанометрах.

RMSF (Root Mean Square Fluctuation) — измерение отклонения конкретной частицы (атома, остатка) от ее первоначального состояния. Значения этого параметра позволяют оценить амплитуду колебаний отдельных остатков. В пакете GROMACS данный параметр измеряется в нанометрах.

Водородные связи возникают между полярными молекулами. При этом водород взаимодействует с электроотрицательным атомом (кислородом или азотом). Водородные связи возникают как между разными молекулами, так и между разными частями одной и той же молекулы. Пакет GROMACS рассчитывает водородные связи в зависимости от двух параметров: значения угла «водород – донор - акцептор» и расстояния «донор - акцептор» или «водород - акцептор». Группы OH и NH являются донорами, O - всегда акцептор, а N может выступать как в роли донора, так и в роли акцептора. Важно отметить, что если два параметра (угол и расстояние) проходят пороговые значения, то считается, что между анализируемыми остатками возможно образование водородной связи. Оценка водородных связей позволяет сделать выводы как о стабильности структуры или выраженности конформационных перестроек внутри макромолекул, так и о качестве межмолекулярных взаимодействий. Пакет GROMACS позволяет рассчитывать количество возможных водородных связей в каждый момент времени при симуляции.

DSSP (Dictionary of Protein Secondary Structure) - площадь поверхности атомов во вторичной структуре белка. В основе определения типа вторичной структуры лежит наличие водородных связей между NH- и CO-группами основной цепи остатков. То есть для белка определяется набор всех его вторичных структур и для каждой структуры определяются аминокислотные остатки, которые ее образуют в момент времени симуляции. В разные временные интервалы определяется принадлежность аминокислотных остатков к той или иной вторичной структуре. Таким образом, анализ DSSP позволяет оценить стабильность третичной структуры белка. В пакете GROMACS результат такого анализа приводится в виде множества разноцветных полос, определяющих то или иное образование вторичной структуры.

SAS (Solvent Accessible Surface) - площадь поверхности молекулы, доступная для растворителя (поверхность области допустимых положений центров молекул воды), позволяет определить как общую площадь поверхности

макромолекулы или ее какого-то конкретного участка, так и долю гидрофобных и гидрофильных участков. Результаты приводятся в нанометрах в квадрате.

Значения, полученные в ходе симуляций модифицированных ферментов, сравнивались с соответствующими значениями, полученными при симуляции молекулярной динамики нормальной NO-синтазы с неизменной аминокислотной последовательностью. Параметры рассчитывались для каждого мономера отдельно.

Расчет гаплотипов и аллелотипов осуществлялся при помощи программы Arlequin 3.1.

2.2.6 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 (σ) отклонение;
- при отклонении распределения от нормального вычисляли медиану (Me) и 25 %–75 % квартили;
- 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 χ^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 χ^2 ($\chi^2 = \sum (H - O)^2 / O$, где H - наблюдаемое значение; O - ожидаемое значение; Σ - 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. Для анализа с помощью логистической регрессии был введен показатель исхода. Он определял вероятность развития рестенозирования как осложнения стентирования и кодировался цифрой «0» при отсутствии развития рестенозирования, «1» при наличии рестенозирования. Оценка SE и SP (чувствительности и специфичности) найденных предикторов проводилась посредством ROC-кривых (receiver operating characteristic). Таким же образом вычислялись пороги отсечения показателей, при которых SE и SP оптимальны.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинические факторы риска рестенозирования

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). Сравнительная характеристика групп представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика пациентов II и III клинических групп

Показатель	Группа II (без рестеноза), n=150		Группа III (с рестенозом), n=62		p
Возраст, лет	58,9±8,85		59,1±9,65		0,92
Мужчины	126 (84 %)		48 (77,42 %)		0,348
Женщины	24 (16 %)		14 (22,58 %)		0,348
АГ	38 (25,33 %)		37 (59,68 %)		<0,001
СД	12 (8 %)		6 (9,68 %)		0,439
Протяженность стеноза, мм	Me (25%–75%)	16 (10,5;21,75)	Me (25%–75%)	21 (12,5;28)	0,038
	M±σ	16,47±6,92	M±σ	21,2±9,61	0,019
Процент сужения артерии	Me (25%–75%)	75 (75;100)	Me (25%–75%)	75 (75;75)	0,039
	M±σ	82,95±11,42	M±σ	67,31±31,67	0,013
Примечание. АГ — артериальная гипертензия в анамнезе; СД — сахарный диабет II типа в анамнезе; ИМ — инфаркт миокарда					

В группе без рестеноза средний возраст пациентов составил 58,9±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±11,42 %. Медиана длины пораженного участка - 16 (10,5;21,75) мм; средняя длина пораженного участка - 16,47±6,92 мм (см. таблицу 2).

В группе с рестенозом средний возраст составил $59,1 \pm 9,65$ лет, число лиц мужского пола - 59,68 % (48 чел.), женского - 22,58 % (14 чел.). В группе с рестенозом 40,32 % обследованных имели в анамнезе артериальную гипертензию и 9,68 % (6 чел.) - компенсированный 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).

Сравнительная характеристика II и III клинических групп представлена в таблице 2. Данные в ней свидетельствуют, что различия между пациентами в группах по возрасту, полу и факту наличия СД отсутствовали. Частота страдающих АГ была выше в группе пациентов с рестенозом – 59,68 % против 25,33 % в группе пациентов без рестеноза.

Медиана протяженности стеноза в группе пациентов без рестенозов была меньше, чем в группе с рестенозами - 16 (10,5;21,75) мм против 21 (12,5;28) мм соответственно. Средняя протяженность стеноза также была меньше в группе пациентов без рестенозов, чем в группе с рестенозами - $16,47 \pm 6,92$ мм против $21,2 \pm 9,61$ мм соответственно.

Медиана степени сужения артерии, напротив, была меньше в группе пациентов с рестенозами — 75 (75;75) % против 75 (75;100) % в группе без рестенозов (рисунок 2).

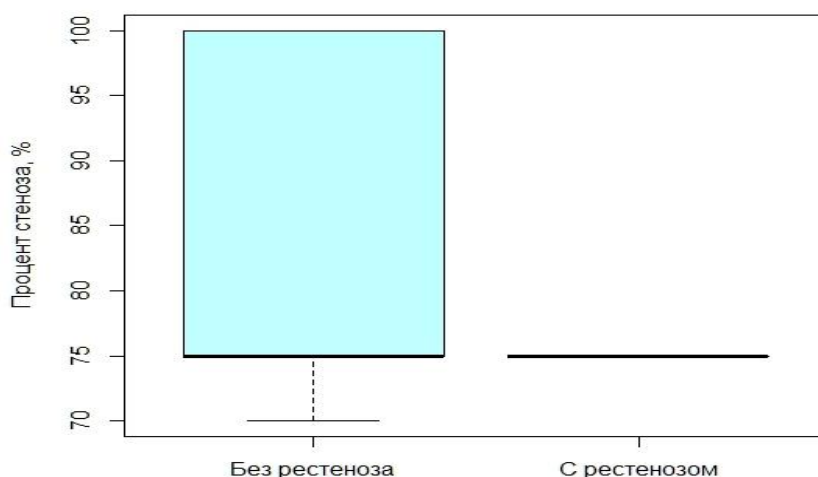


Рисунок 2 – Медианы степени сужения артерий (процента стеноза) в группах пациентов с рестенозом и без рестеноза

Средняя степень сужения артерии также была меньше в группе пациентов с рестенозами — $82,95 \pm 11,42$ % против $67,31 \pm 31,67$ % в группе без рестенозов.

Исследуемые группы статистически значимо ($p < 0,05$) различались как по протяженности стеноза, так и по уровню сужения коронарных артерий (см. таблицу 2). Тем не менее клинически эти различия можно оценить как недостаточно значимые в силу того, что по мерам рассеяния (дисперсия, межквартильный размах) значения этих показателей между группами пересекаются. Возможно, такой результат связан с недостаточным объемом выборки.

3.2 Ассоциация полиморфизма генов NOS с ишемической болезнью сердца

В работе исследованы полиморфизмы:

- гена *eNOS* (*NOS3*) (*G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T*);
- гена *iNOS* (*NOS2*) (*CCTTT*)*n*.

Распределение частот генотипов данных полиморфизмов и их соответствие популяционному равновесию Харди – Вайнберга представлено в таблице 3. Данные показывают, что генотипы полиморфизмов *774 C/T* и *691C/T* гена *eNOS* находились в соответствии с равновесием Харди – Вайнберга. Однако обнаружено статистически значимое отклонение распределения генотипов полиморфизма *G894T*, *VNTR*, *-786T/C* гена *eNOS* ($p < 0,05$) и статистически значимое ($p < 0,05$) отклонение распределения генотипов полиморфизма (*CCTTT*)*n* гена *iNOS* от равновесия Харди – Вайнберга, связанное с отклонением уровня гетерозиготности в сторону увеличения уровня гетерозигот:

G894T ($H_o = 0,39$, $H_e = 0,43$, $D = 0,11$),

VNTR ($H_o = 0,42$, $H_e = 0,50$, $D = 0,18$),

-786T/C ($H_o = 0,37$, $H_e = 0,45$, $D = 0,21$),

(*CCTTT*)*n* ($H_o = 0,25$, $H_e = 0,39$, $D = 0,39$).

Таблица 3 – Распределение частот генотипов полиморфизмов гена NOS и их соответствие равновесию Харди – Вайнберга в группе больных ишемической болезнью сердца

Ген	Поли-мор-физм	Гено-типы	Распределение генотипов				χ^2^* , (p)	Уровень гетеро-зиготности		D	χ^2^{**} , (p)
			В группе ИБС		В контрольной группе			Ho	He		
			n = 484	%	n = 280	%					
eNOS	G894T	GG	237	48,97	165	58,93	8,67 (p<0,01)	0,39	0,43	0,11	p<0,05
		GT	189	39,05	95	33,93					
		TT	58	11,98	20	7,14					
eNOS	VNTR	bb	164	33,88	118	42,14	7,95 (p<0,05)	0,42	0,50	0,18	p<0,05
		ab	203	41,94	110	39,29					
		aa	117	24,17	52	18,57					
eNOS	774 C/T	CC	371	76,65	205	73,21	1,19 (0,55)	0,22	0,22	-0,01	p>0,05
		CT	106	21,90	71	25,36					
		TT	7	1,45	4	1,43					
eNOS	-786T/C	TT	232	47,93	141	50,36	15,74 (p<0,05)	0,37	0,45	0,21	p<0,05
		TC	179	36,98	123	43,93					
		CC	73	15,08	16	5,71					
eNOS	691C/T	CC	241	49,79	130	46,43	0,84 (0,66)	0,40	0,42	0,05	p>0,05
		CT	194	40,08	121	43,21					
		TT	49	10,12	29	10,36					
iNOS	(CCTTT) _n	14/14	48	9,92	40	14,29	7,23 (p<0,05)	0,25	0,35	0,39	p<0,05
		14/X	120	24,79	84	30,00					
		XX	316	65,29	156	55,71					

Примечания. χ^2^* , χ^2^{**} — критерий оценки различий между частотами генотипов и для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди – Вайнберга соответственно.

p*, p** — уровень статистической значимости отличий при оценке частот генотипов и PХВ соответственно.

Ho, He — наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно.

D — относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой

На рисунке 3 показано распределение генотипов полиморфизмов генов *NOS*. Он визуализирует характерность носителей гомозигот по T-аллелю (генотип *TT*) полиморфизма *G894T* гена *eNOS* для группы пациентов с ИБС (11,98 % против 7,14 %, $p < 0,05$) в сравнении с группой контроля.

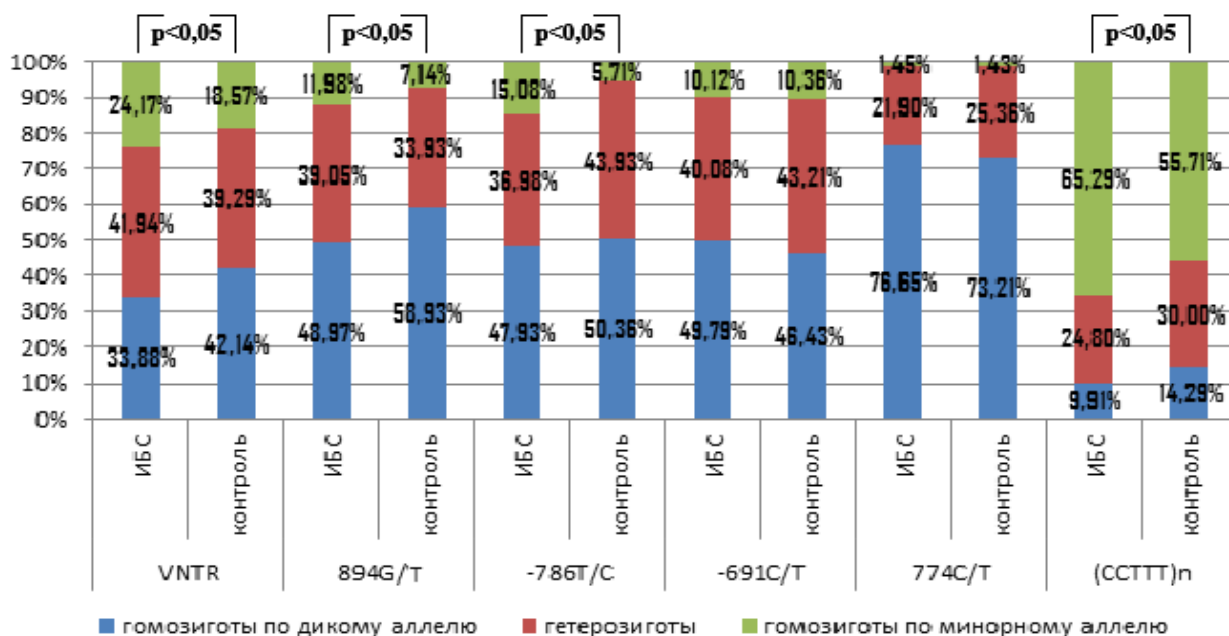


Рисунок 3 – Распределение генотипов полиморфизмов *G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T* гена *eNOS* и полиморфизм *(CCTTT)n* гена *iNOS*

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. При этом риск развития ИБС у пациентов, гомозиготных по аллелю G, минимален, а 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 ($OR = 2,93$, $p < 0,05$). 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 %, $p < 0,05$).

$p < 0,05$). Риск формирования ИБС достоверно выше у гомозигот по аллелю X ($OR = 1,49, p < 0,05$).

3.3 Ассоциация полиморфизма генов NOS с рестенозом стентов

Распределение частот генотипов исследуемых полиморфизмов и их соответствие популяционному равновесию Харди – Вайнберга в группе с рестенозом представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Распределение частот генотипов полиморфизмов гена NOS и их соответствие равновесию Харди – Вайнберга в группе с рестенозом стентов

Ген	Поли-морфизм	Гено-типы	Распределение генотипов				χ^2^* , (p)	Уровень гетерозиготности		D	χ^{2**} , (p)
			в группе с рестенозом		группе без рестеноза			Ho	He		
			n = 62	%	n =150	%					
<i>eNOS</i>	<i>G894T</i>	<i>GG</i>	16	26,67	80	53,33	13,16 ($p < 0,05$)	0,47	0,50	0,07	$p > 0,05$
		<i>GT</i>	28	46,67	50	33,33					
		<i>TT</i>	16	26,67	20	13,33					
<i>eNOS</i>	<i>VNTR</i>	<i>bb</i>	10	16,67	64	42,67	17,23 ($p < 0,05$)	0,43	0,47	0,09	$p > 0,05$
		<i>ab</i>	26	43,33	54	36,00					
		<i>aa</i>	24	40,00	32	21,33					
<i>eNOS</i>	<i>-786 T/C</i>	<i>TT</i>	24	40,00	66	44,00	0,40 ($p > 0,05$)	0,50	0,46	-0,09	$p > 0,05$
		<i>TC</i>	30	50,00	72	48,00					
		<i>CC</i>	6	10,00	12	8,00					
<i>iNOS</i>	<i>(CCTTT)_n</i>	<i>14/14</i>	6	10,00	16	10,67	0,02 ($p > 0,05$)	0,27	0,36	0,34	$p < 0,05$
		<i>14/X</i>	16	26,67	40	26,67					
		<i>X/X</i>	38	63,33	94	62,67					

Примечания. χ^2^* , χ^2^{**} — критерий для оценки различий между частотами генотипов и для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди – Вайнберга соответственно.

P^* , P^{**} — уровень статистической значимости различий при оценке частот генотипов и PХВ соответственно

Данные таблицы 4 демонстрируют распределение в группе с рестенозом генотипов всех полиморфизмов гена *eNOS* по закону Харди – Вайнберга. Нарушение распределения генотипов полиморфизма $(CCTTT)_n$ гена *iNOS* от равновесия Харди – Вайнберга, связанное с отклонением в сторону увеличения уровня гетерозигот ($H_o = 0,27$, $H_e = 0,36$, $D = 0,34$), является статистически значимым.

На рисунке 4 представлено распределение генотипов полиморфизмов генов *NOS* в группе больных с рестенозом и в контрольной группе.

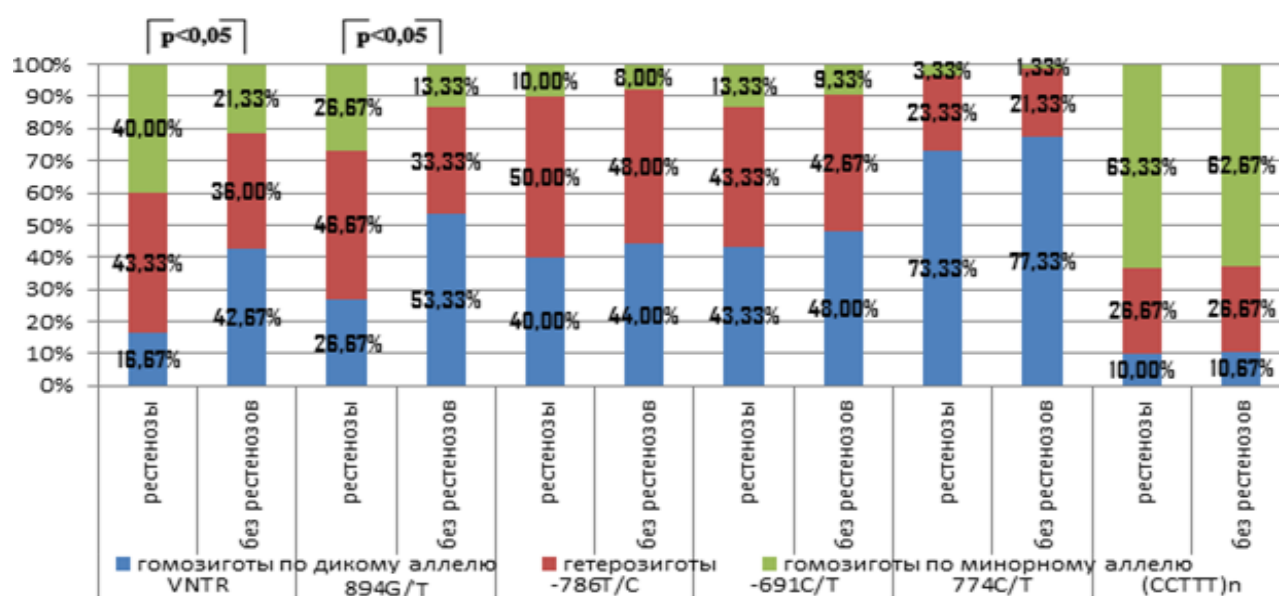


Рисунок 4 – Распределение генотипов полиморфизмов *G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T* гена *eNOS* и полиморфизм $(CCTTT)_n$ гена *iNOS*

Наблюдается статистически достоверная разница в частотах генотипов полиморфизма *VNTR* гена *NOS3* у группы с рестенозом и у контрольной группы ($\chi^2 = 17,23$, $p < 0,05$).

Расчёт рисков подтверждает статистически значимо более высокий риск рестеноза у пациентов носителей минорного аллеля *a*. При этом наличие гомозиготы по доминантному аллелю *b* является фактором низкого уровня риска развития повторного сужения КА (таблица 5).

Таблица 5 – Вероятность формирования рестеноза стентов в зависимости от полиморфизма VNTR гена eNOS

Генотип	Больные с рестенозом, % (n = 62)	Больные без рестеноза, % (n = 150)	OR	CI95%	p
<i>bb</i>	16,13	42,67	0,27	1,29–4,70	< 0,001
<i>ab</i>	43,33	36,00	1,36	0,74–2,50	< 0,00
<i>aa</i>	40,32	21,33	2,46	2,92–2,31	< 0,001

Примечания. *bb* — гомозигота по аллелю *b*; *ab* — гетерозигота по аллелю *b*; *aa* — гомозигота по аллелю *a*; OR — относительный риск; CI95% — доверительный интервал; p — уровень статистической значимости различий

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 стенте (таблица 6).

Таблица 6 – Вероятность формирования рестеноза в зависимости от полиморфизма 894G/T гена eNOS

Генотип	Больные с рестенозом, % (n = 62)	Больные без рестеноза, % (n = 150)	OR	CI95%	p
<i>GG</i>	25,81	53,33	0,32	0,17–0,61	< 0,001
<i>GT</i>	46,67	33,33	1,75	0,95–3,22	< 0,00
<i>TT</i>	27,42	13,33	2,36	1,13–4,96	< 0,001

Примечания. *GG* — гомозигота по аллелю *G*; *GT* — гетерозигота по аллелю *G*; *TT* — гомозигота по аллелю *T*; OR — относительный риск; CI95% — доверительный интервал; p — уровень статистической значимости различий

3.4 Роль гаплотипов полиморфных вариантов генов NO-синтаз в формировании рестеноза стентов коронарных артерий

С помощью таблицы сопряженности и точного критерия Фишера были проанализированы частоты встречаемости отдельных гаплотипов в группах пациентов без рестеноза и с рестенозами после стентирования (таблица 7).

Таблица 7 – Частоты встречаемости отдельных гаплотипов у пациентов без рестеноза и рестенозами после стентирования

Группа	Группа II (без рестеноза)	Группа III (с рестенозом)	p
<i>CCabGG11</i>	4/150 (2,7%) 0,86%–7,11%	0/62 (0%) 0%–7,27%	<0,001
<i>CCbbGG21</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCaaGG11</i>	6/150 (4%) 1,64%–8,89%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TCaaGG21</i>	4/150 (2,7%) 0,86%–7,11%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCaaGT11</i>	8/150 (5,3%) 2,5%–10,59%	4/62 (6,5%) 2,09%–16,5%	
<i>TCabGG11</i>	10/150 (6,7%) 3,42%–12,25%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCabGG21</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TCabGT11</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	13/62 (21%) 12,06%–33,52%	
<i>TCabGT21</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TCabTT11</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TCbbGG11</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCbbGG21</i>	6/150 (4%) 1,64%–8,89%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCbbGT11</i>	8/150 (5,3%) 2,5%–10,59%	4/62 (6,5%) 2,09%–16,5%	
<i>TCbbGT21</i>	10/150 (6,7%) 3,42%–12,25%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCbbTT11</i>	10/150 (6,7%) 3,42%–12,25%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCbbTT21</i>	4/150 (2,7%) 0,86%–7,11%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TCbbTT22</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTaaGG11</i>	12/150 (8%) 4,39%–13,86%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTaaGG21</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TTaaGT11</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTaaGT21</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTaaTT11</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	4/62 (6,5%) 2,09%–16,5%	
<i>TTaaTT21</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	9/62 (14,5%) 7,25%–26,28%	
<i>TTabGG11</i>	20/150 (13,3%) 8,53%–20,08%	0/62 (0%) 0%–7,27%	

Группа	Группа II (без рестеноза)	Группа III (с рестенозом)	p
<i>TTabGG21</i>	10/150 (6,7%) 3,42%–12,25%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTabGG22</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTabGT21</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TTbbGG11</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>TTbbGT11</i>	6/150 (4%) 1,64%–8,89%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TTbbGT21</i>	10/150 (6,7%) 3,42%–12,25%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>CCabGG22</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>CCabGT11</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>CCbbGG11</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	2/62 (3,2%) 0,56%–12,17%	
<i>CCbbGG21</i>	2/150 (1,3%) 0,23%–5,23%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>CCbbTT21</i>	4/150 (2,7%) 0,86%–7,11%	0/62 (0%) 0%–7,27%	
<i>TTabGT11</i>	0/150 (0%) 0%–3,11%	0/62 (0%) 0%–7,27%	

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 (выделены в таблице 7 жирным шрифтом):

1) *TCabGT11* - наиболее часто встречается у больных с неблагоприятными исходами: 21 % против 1,3 % у больных без рестенозов;

2) *TTabGG11* - встречается только у больных с благоприятными исходами (в 13,3 % случаев).

Эти гаплотипы были выделены как отдельные показатели и участвовали в поиске предрасполагающих факторов исхода с помощью логистической регрессии.

Таким образом, при наличии у пациента гаплотипа *TCabGT11* наиболее вероятен исход с рестенозированием. У пациентов с таким гаплотипом при планировании эндохирургического вмешательства следует выбирать стенты с лекарственным покрытием, а также проводить комплекс послеоперационных профилактических мероприятий, направленных на предотвращение развития ЭД и РВС.

3.5 Выявление предрасполагающих факторов развития рестеноза, определение их чувствительности и специфичности посредством ROC-кривых

Поиск предрасполагающих факторов в ходе исследования проводился среди всех известных на данный момент признаков, которые могут спровоцировать рестенозирование. Для этого использовался показатель исхода, который характеризовался вероятностью развития рестеноза как явления осложнения стентирования.

При анализе было найдено 5 предрасполагающих факторов, имеющих прогностическую ценность в развитии рестенозирования после стентирования:

- 1) протяженность стеноза артерии;
- 2) сужение коронарной артерии (процент стеноза);
- 3) полиморфизм *894G/T* гена *eNOS* у пациентов с ИБС;
- 4) наличие в анамнезе АГ;
- 5) наличие гаплотипа *TCabGT11* у пациентов с ИБС.

Для всех найденных предрасполагающих факторов с помощью ROC-кривых были определены их чувствительность и специфичность. Диагностическая эффективность (предсказательная способность) каждого предрасполагающего фактора оценивалась для значений площади по характерной ROC-кривой AUC. Полученные результаты изложены ниже и отражены на рисунках.

Уравнение логит-регрессии для модели № 1 (протяженность стеноза) имеет следующий вид:

$$\text{Исход} = \exp(-2,32 + 0,08 \cdot L_{\text{стеноза}}) / (1 + \exp(-2,32 + 0,08 \cdot L_{\text{стеноза}})), \quad (1)$$

где Исход — вероятность рестенозирования в долях единицы (%); $L_{\text{стеноза}}$ выражена в мм.

Логистическая кривая (рисунок 5,а) наглядно демонстрирует рост показателя «протяженность стеноза» с одновременным увеличением вероятности неблагоприятного исхода, и наоборот: чем ниже показатель «протяженность стеноза», тем менее вероятен неблагоприятный исход. Чувствительность модели

составила 50 %, специфичность — 74,32 %, площадь под ROC-кривой — 63,0 % (рисунок 5,б).

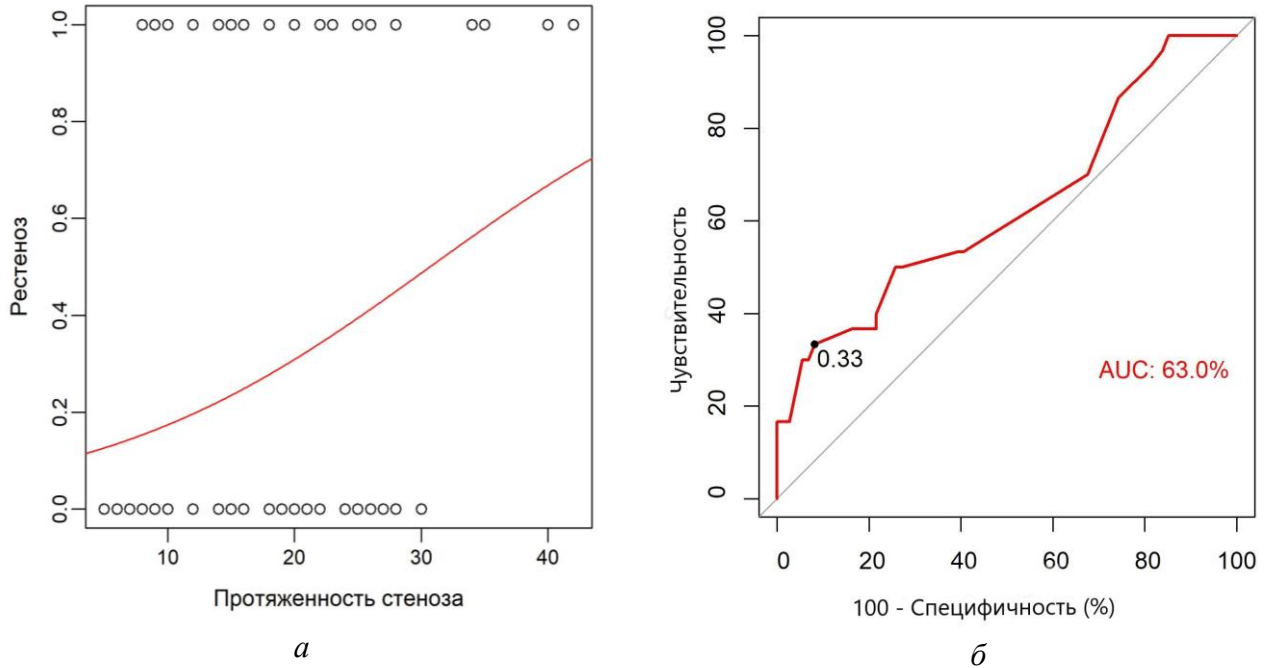


Рисунок 5 – Зависимость исхода от значения показателя «протяженность стеноза» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя протяженности стеноза (б)

Уравнение регрессии для модели № 2 (процента стеноза) выглядит следующим образом:

$$\text{Исход} = \exp(2,25 - 0,04 \cdot \% \text{ стеноза}) / (1 + \exp(2,25 - 0,04 \cdot \% \text{ стеноза})), \quad (2)$$

где показатель «% стеноза» учитывается в процентах.

Кривая на рисунке 6,а показывает зависимость вероятности рестеноза от показателя «процент стеноза»: чем процент стеноза выше, тем менее вероятно рестенозирование, и наоборот: уменьшение процента стеноза способствует росту вероятности рестенозирования. Чувствительность модели составила 83,33 %, специфичность — 36,99 %, площадь под ROC-кривой — 61,8 % (рисунок 6,б).

Уравнение регрессии для фактора риска № 3 (полиморфизм 894G/T) представляет собой следующее выражение:

$$\text{Исход} = \exp(-1,71 + 0,64 \cdot 894G/T) / (1 + \exp(-1,71 + 0,64 \cdot 894G/T)), \quad (3)$$

где показатель полиморфизма «894G/T» гена *eNOS* – это номинальный признак, кодированный как «0» при значении «GG», как «1» при «TT» и как «2» при «GT».

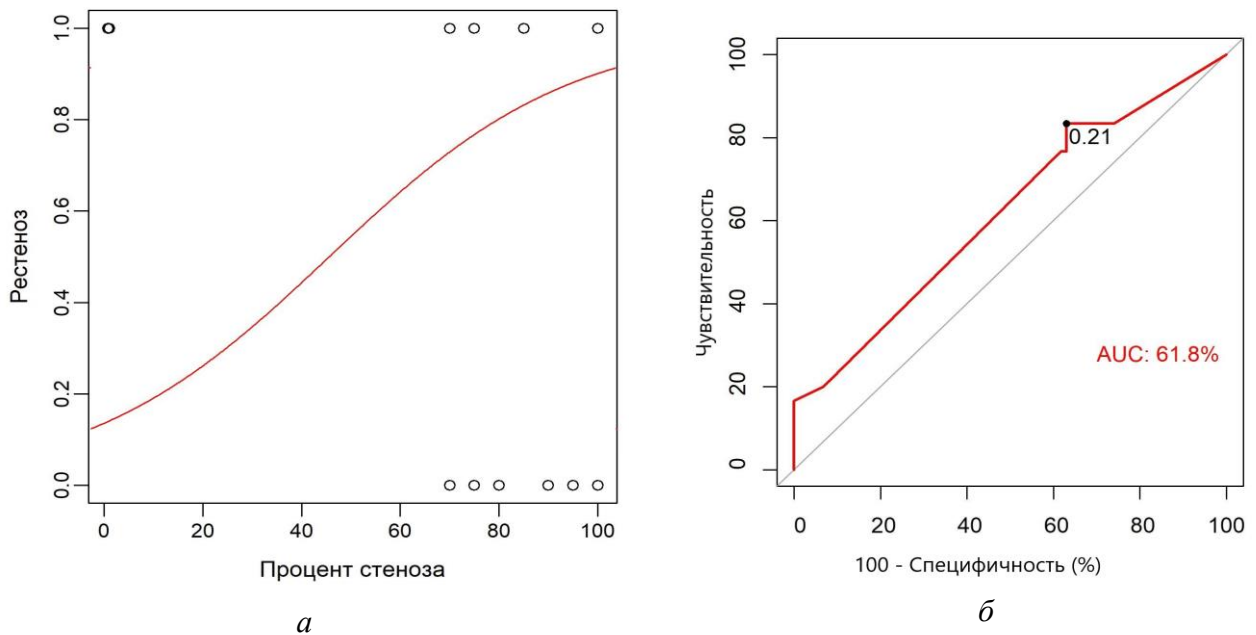


Рисунок 6 – Зависимость исхода от значения показателя «% стеноза» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «% стеноза» (б)

Логистическая кривая (рисунок 7,а) демонстрирует, что наличие у пациента генотипа «GG» полиморфизма 894G/T соответствует малой вероятности рестенозирования, наличие генотипа «TT» незначительно увеличивает вероятность рестенозирования, наличие генотипа «GT» значительно, по сравнению с другими генотипами полиморфизма 894G/T, увеличит вероятность рестенозирования стента. Чувствительность модели была равна 76,92 %, специфичность — 54,67 %, площадь под ROC-кривой — 65,3 % (рисунок 7,б).

Уравнение регрессии для модели № 4 (показатель артериальной гипертензии):

$$\text{Исход} = \exp(-1,61 + 1,56 \cdot \text{АГ}) / (1 + \exp(-1,61 + 1,56 \cdot \text{АГ})), \quad (4)$$

где АГ — бинарный показатель наличия артериальной гипертензии: равен «1» при наличии АГ, «0» — отсутствие АГ.

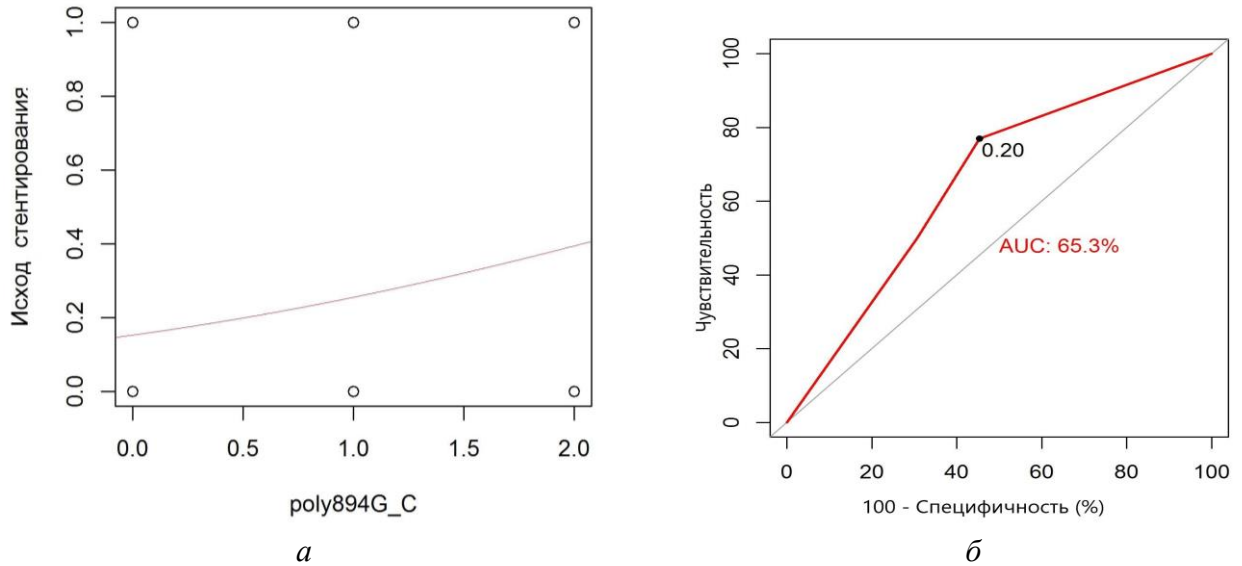


Рисунок 7 – Зависимость исхода от значения показателя «полиморфизм 894 G/T» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «полиморфизм 894 G/T» (б)

По логистической кривой на рисунке 8,а видно, что наличие артериальной гипертензии увеличивает вероятность неблагоприятного исхода после стентирования, и наоборот, отсутствие артериальной гипертензии уменьшает вероятность неблагоприятного исхода. Чувствительность модели составила 62,07 %, специфичность — 74,32 %, площадь под ROC-кривой — 68,02 % (рисунок 8,б).

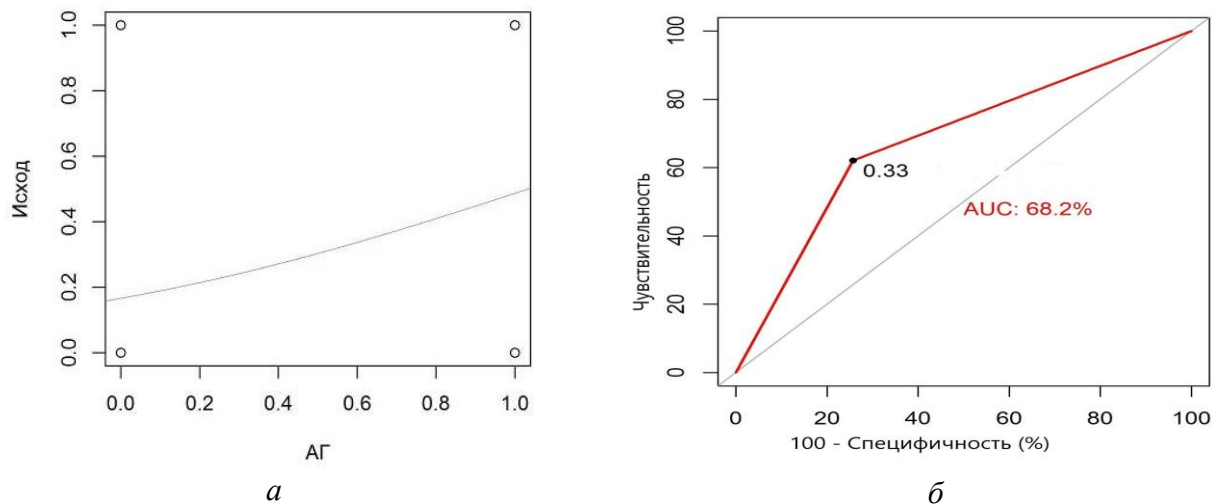


Рисунок 8 – Зависимость исхода от значения показателя «артериальная гипертензия» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «артериальная гипертензия» (б)

Уравнение логит-регрессии для модели № 5 (гаплотип «TCabGT11»):

$$\text{Исход} = \exp(-1,17 + 2,96 \times \text{TCabGT11}) / (1 + \exp(-1,17 + 2,96 \times \text{TCabGT11})), \quad (5)$$

где бинарный показатель «TCabGT11» принимал значение «1» при наличии гаплотипа, «0» — при отсутствии гаплотипа.

Как видно на рисунке 9,а, наличие у пациента гаплотипа TCabGT11 увеличивает вероятность рестенозирования, и наоборот, отсутствие у пациента гаплотипа TCabGT11 уменьшает вероятность рестенозирования. Чувствительность модели 20,69 %, специфичность — 98,67 %, площадь под ROC-кривой — 59,7 % (рисунок 9,б).

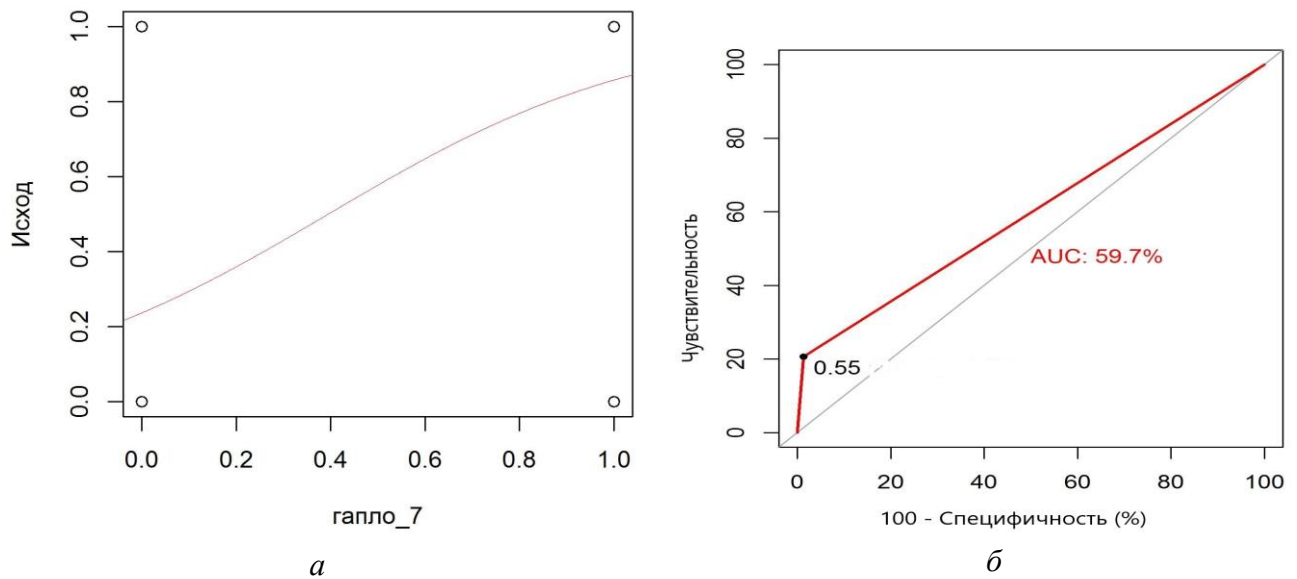


Рисунок 9 – Зависимость исхода от значения показателя гаплотип «TCabGT11» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «гаплотип TCabGT11» (б)

Уравнение логит-регрессии для модели № 6 (гаплотип «TTabGG11»):

$$\text{Исход} = \exp(-0,81 - 16,76 \cdot \text{TTabGG11}) / (1 + \exp(-0,81 - 16,76 \cdot \text{TTabGG11})), \quad (6)$$

где бинарный показатель TTabGG11 = 1 при наличии гаплотипа, TTabGG11 = 0 при его отсутствии.

Логистическая кривая на рисунке 10,а демонстрирует уменьшение вероятности рестенозирования после стентирования коронарной артерии при

наличии у пациента гаплотипа *TTabGG11*, а вот отсутствие этого гаплотипа, напротив, способствует росту риска рестенозирования. Чувствительность модели была равна 100 %, специфичность — 13,33 %, площадь под ROC-кривой — 56,70 % (рисунок 10,б).

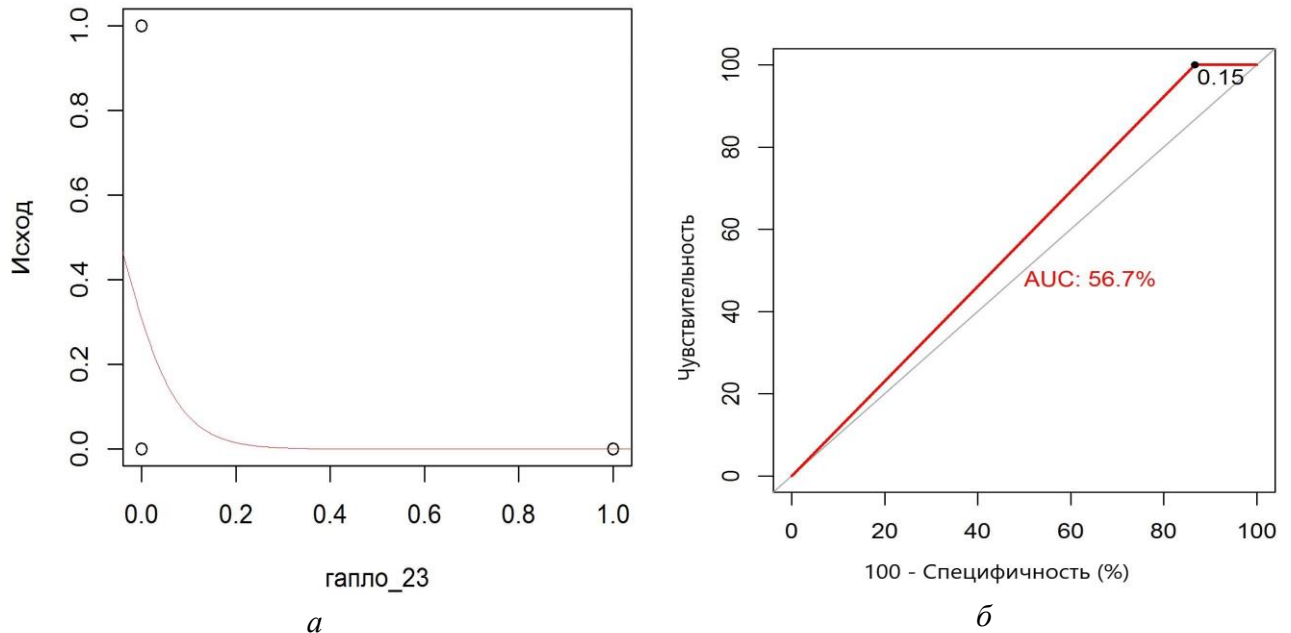


Рисунок 10 – Зависимость исхода от значения показателя «*TTabGG11*» (а) и ROC-кривая чувствительности (Se) и специфичности (Spe) для показателя «*TTabGG11*» (б)

Таким образом, интерпретируя результаты анализа с помощью логистической регрессии и ROC-анализа (таблица 8), следует отметить, что наименьшей прогностической точностью обладали показатели гаплотипов *TCabGT11* и *TTabGG11* (AUC 59,7 % и 56,7 % соответственно).

Более высокие показатели отмечались для переменных «протяженность стеноза» (AUC = 63 %); «сужение артерии (процент стеноза)» (AUC = 61,78 %). Самые высокие значения площади под кривой выявлены для переменных «полиморфизм 894 G/T» гена *eNOS* и «артериальная гипертензия» (AUC 65,3 % и 68,2 % соответственно).

Таблица 8 – Характеристики предрасполагающих факторов развития рестеноза после стентирования коронарных артерий

Показатель	Se, %	Spe, %	Threshold	AUC, %	Уровень p для модели
Протяженность стеноза	50	74,32	> 0,33	63,0	0,006
Сужение артерии (%)	83,33	36,99	> 0,21	61,78	0,001
Полиморфизм 894G/T гена <i>eNOS</i>	76,92	54,67	> 0,20	65,30	0,013
Артериальная гипертензия	62,07	74,32	> 0,33	68,20	0,001
<i>TCabGT11</i>	20,69	98,67	> 0,55	59,70	0,001

Примечания. Se – чувствительность модели, Spe – специфичность модели, Threshold – точка отсечения значения исхода, полученного с помощью модели, при котором достигаются соответствующие значения Se и Spe, AUC – площадь под ROC-кривой

3.6 Молекулярный механизм формирования эндотелиальной дисфункции и рестеноза стентов у больных ИБС с наличием полиморфного варианта G894T гена eNOS

Наличие полиморфизма *rs1799983* ведет к замене аминокислотного остатка в составе эндотелиальной NO-синтазы в позиции 298. При данной модификации происходит замена гидрофильного, полярного, отрицательно заряженного глутамина на аспарагин.

На рисунке 11 показано, 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» примерно после 6–7 нс симуляции. Это указывает на нестабильность структуры и возможные серьезные перестройки внутри белковых молекул. При внесении замены (*rs1799983*) динамика значений RMSD а.о. мономера 2 отлична от первоначальной белковой молекулы. Также заметно отличие в поведении мономера 1. При внесении мутации значения RMSD а.о. мономера 1 значительно быстрее выходили на «плато» и среднее значение

RMSD оставалось ниже, чем у «нормального» мономера. Это свидетельствует о жесткости структуры модифицированного мономера 1.

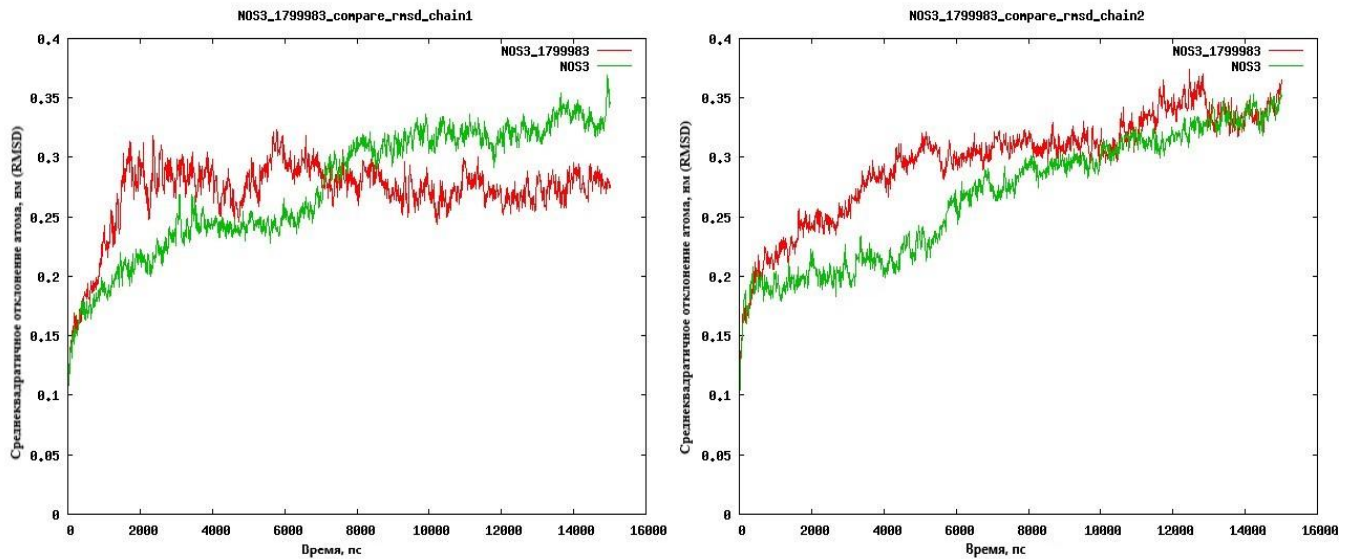


Рисунок 11 – Среднеквадратичное отклонение положения атомов а.о. обоих мономеров в ходе симуляции молекулярной динамики. Значения среднеквадратичных отклонений а.о. мономера 1(слева) и мономера 2 (справа). Зеленая линия — нормальный фермент, красная — фермент с мутацией

На рисунке 12 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 месте контакта двух мономеров.

В случае мономера 1 при внесении мутации происходило уменьшение флуктуаций остатков, попадающих в участок «гибкой руки» (это лабильный участок фермента, который при внесении мутаций находится в открытой конформации, а затем переходит в закрытую путем перемещения одного или нескольких доменов). Этот результат связан с общим снижением значений RMSD мономера 1 при внесении мутации.

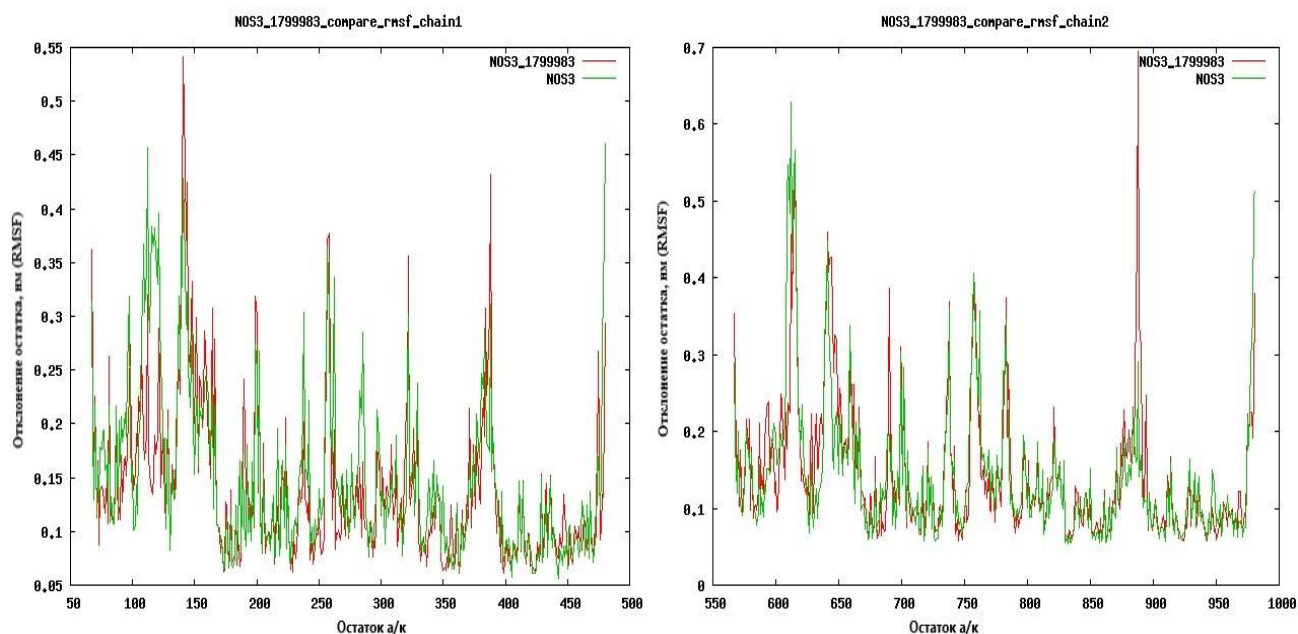


Рисунок 12 – Значение флуктуаций аминокислотных остатков нормальных и модифицированных мономеров NOS3 в ходе симуляции молекулярной динамики

Анализ отклонений только остатков «гибкой руки» показал соответствие предыдущим результатам (рисунок 13).

Результаты оценки RMSD остатков «гибкой руки» сопоставимы с представленными на рисунке 13. 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 14). При внесении мутации этого не происходит.

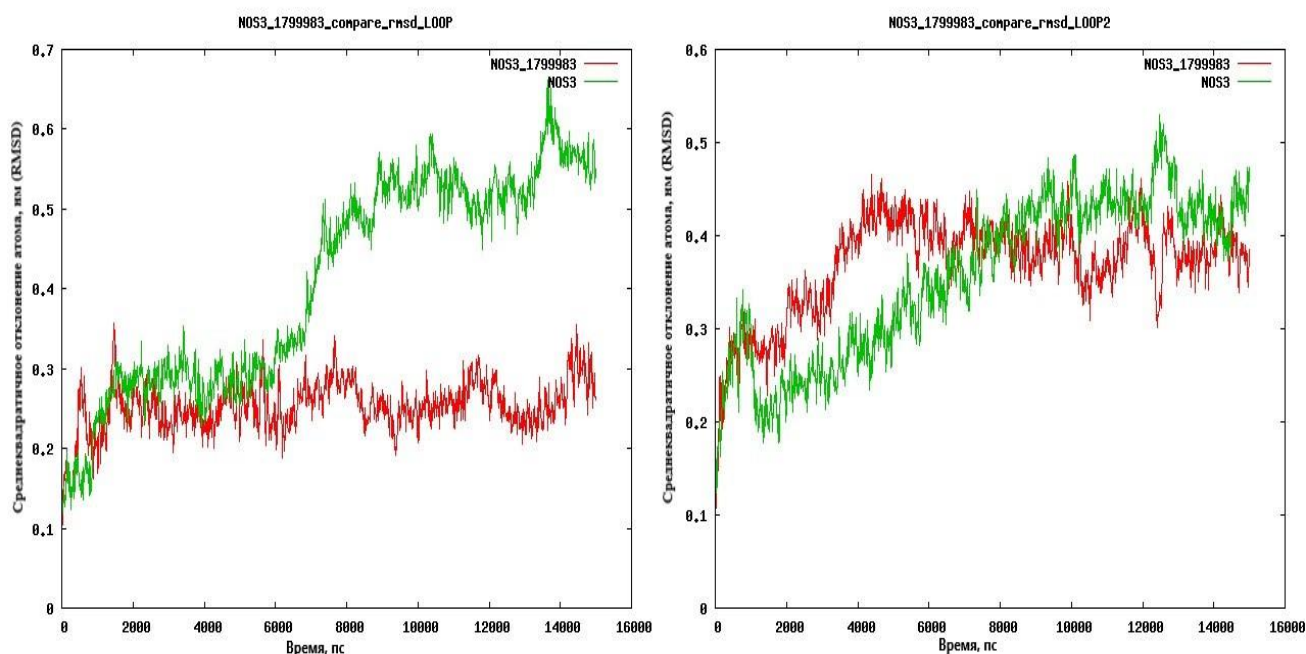


Рисунок 13 – Значения среднеквадратичных отклонений остатков 105–125 мономеров (аминокислотные остатки «гибкой руки») при симуляции молекулярной динамики

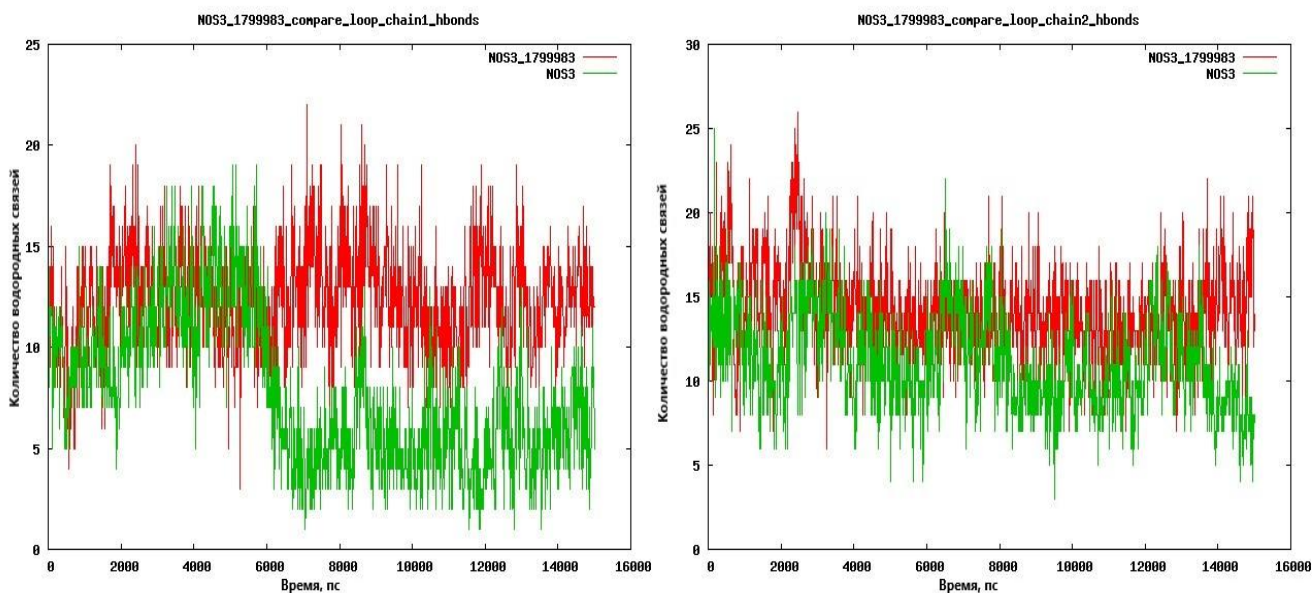


Рисунок 14 – Динамика количества водородных связей между остатками 105–125 и другими а.о. мономера

При внесении замены 298 *Glu>Asp* в аминокислотную последовательность NOS3 происходит временное увеличение числа водородных связей между мономерами фермента (рисунок 15).

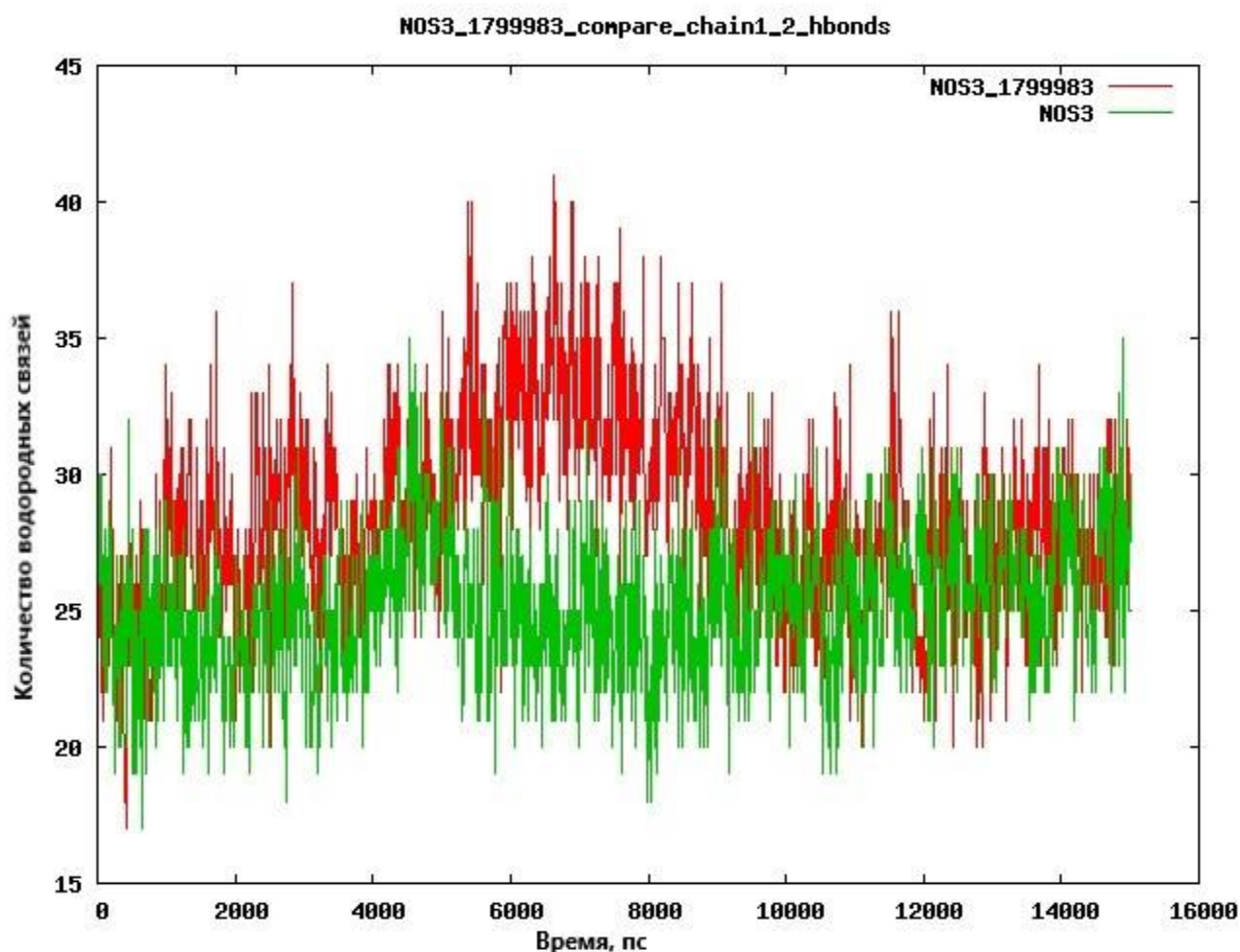


Рисунок 15 – Динамика количества водородных связей между остатками мономеров 1 и 2 в ходе симуляции молекулярной динамики

Для оценки возможной перестройки остатков в месте контактов между мономерами оценены значения RMSD (рисунок 16).

На рисунке 16 показано, что отличия RMSD при внесении мутации достаточно значительны (около 4 Å). Однако в нормальном ферменте остатки отклонялись чуть меньше.

На рисунке 17 приведена оценка общей площади контактирующих остатков мономеров. Так же как и RMSD при внесении модификации, происходило увеличение площади контакта в ходе симуляции.

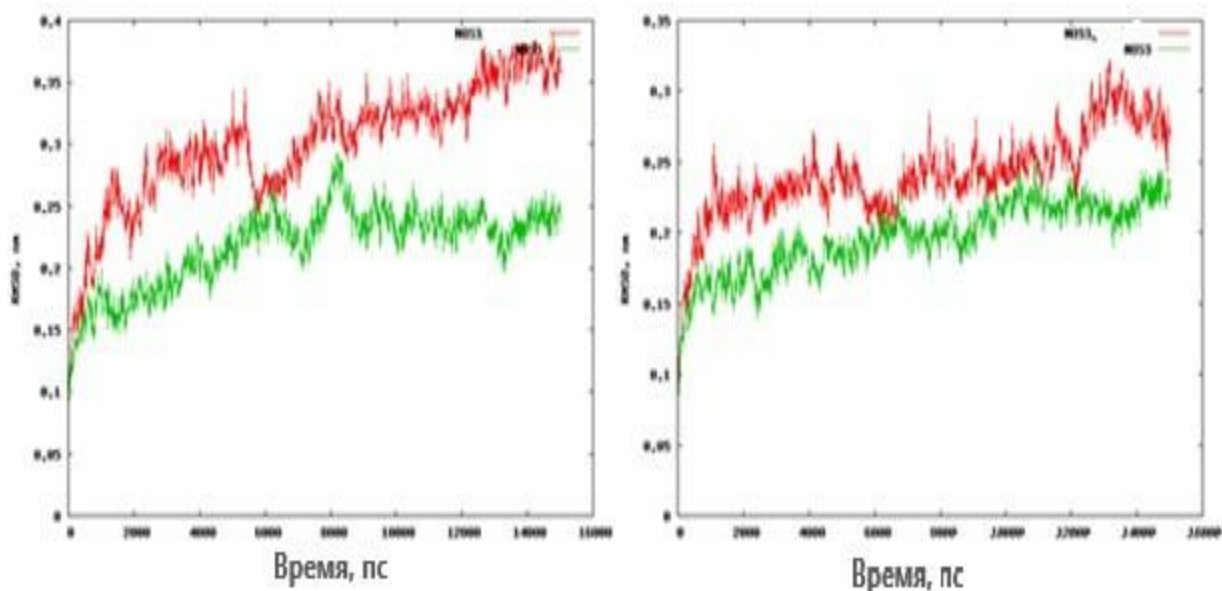


Рисунок 16 – Значения среднеквадратичных отклонений остатков, участвующих в контакте двух мономеров фермента

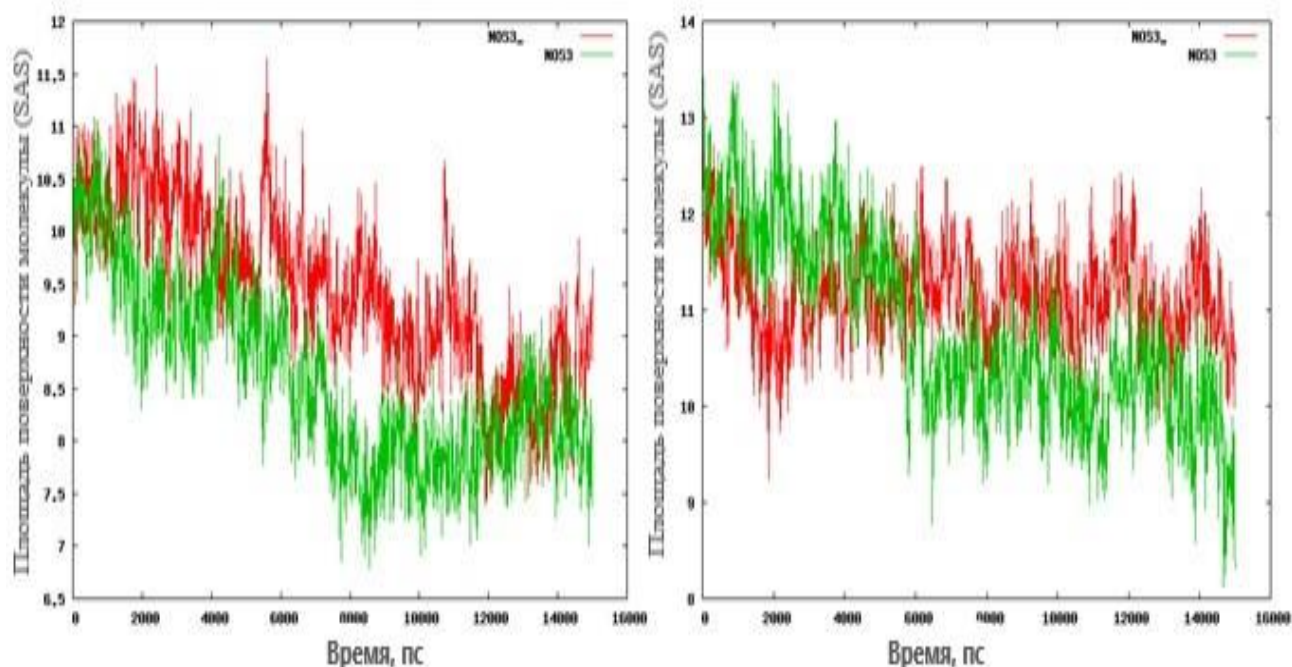


Рисунок 17 – Значения площади поверхности, доступной растворителю для мономеров *NOS3* в ходе симуляции молекулярной динамики

Для оценки конформационных перестроек внутри молекулы белка использовали алгоритм DSSP (оценка площади поверхности атомов во вторичной структуре белка). В ходе симуляций в нормальной *NOS3* перестроек не обнаружено. Однако в мутантной *NOS3* отмечается разрушение элементов

вторичной структуры, что подтверждается наличием «шумов» на N-конце мономера 1 и 2 NOS3.

На рисунке 18 показано, что 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 нм².

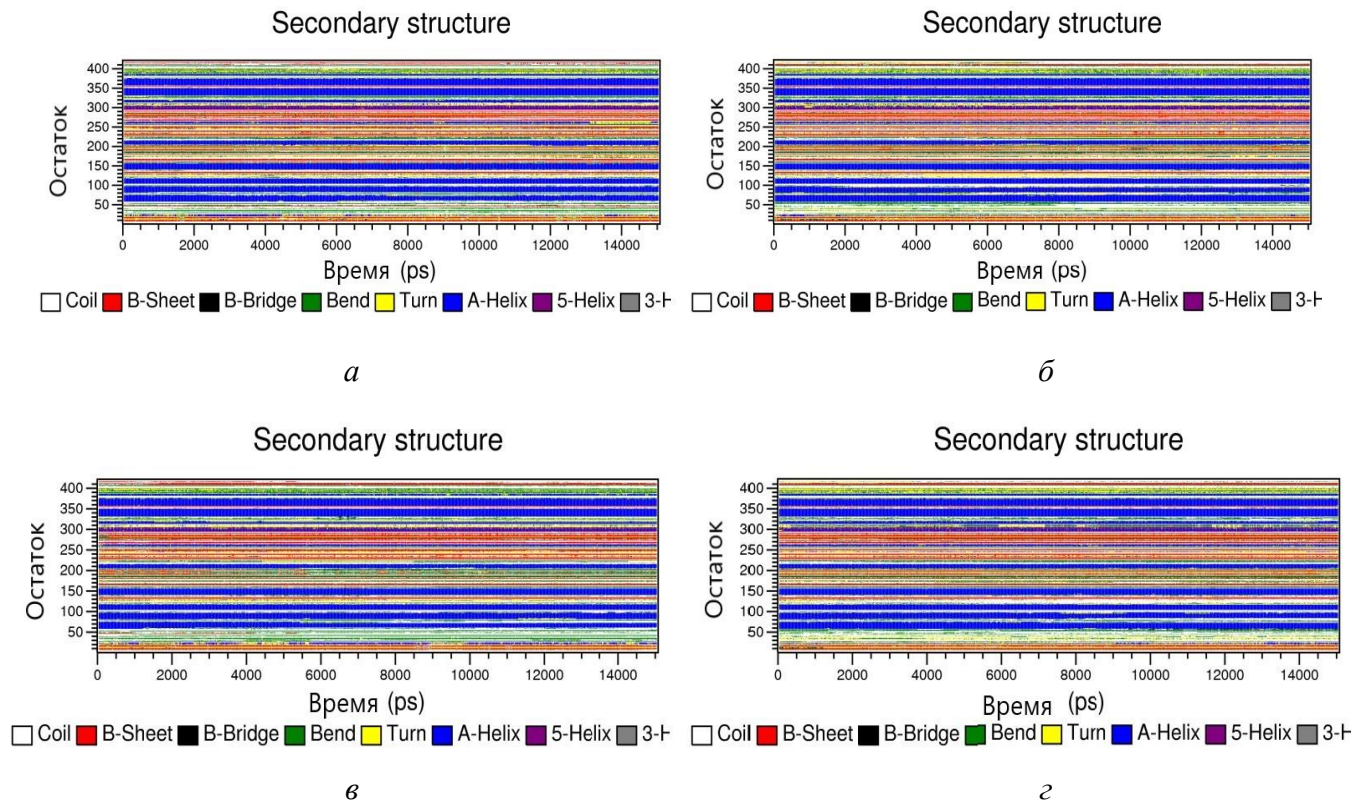
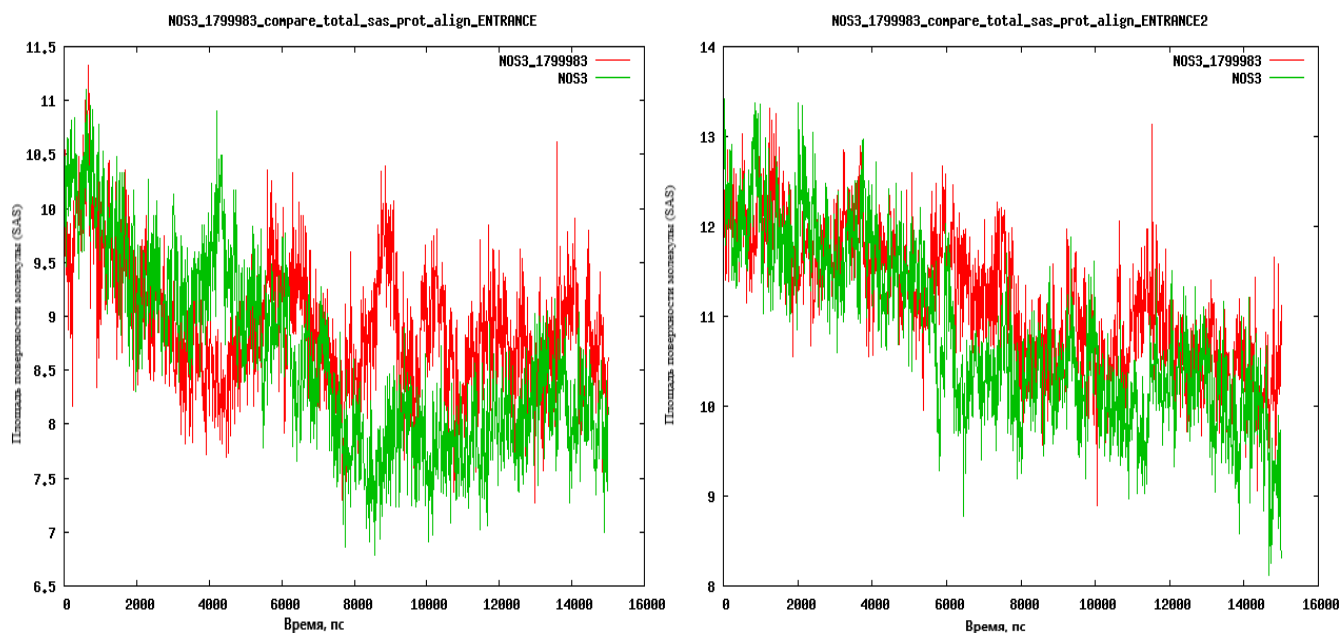


Рисунок 18 – Стабильность элементов вторичных структур в ходе симуляции молекулярной динамики: а — мономер 1 нормальной синтазы; б — мономер 2 нормальной синтазы; в — мономер 1 модифицированной синтазы; г — мономер 2 модифицированной синтазы

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. Результаты приведены на рисунках 19–20.

Аналогично на рисунках 20 и 21: 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 19 – Изменение площади поверхности «входа»
в активный центр субъединиц фермента**

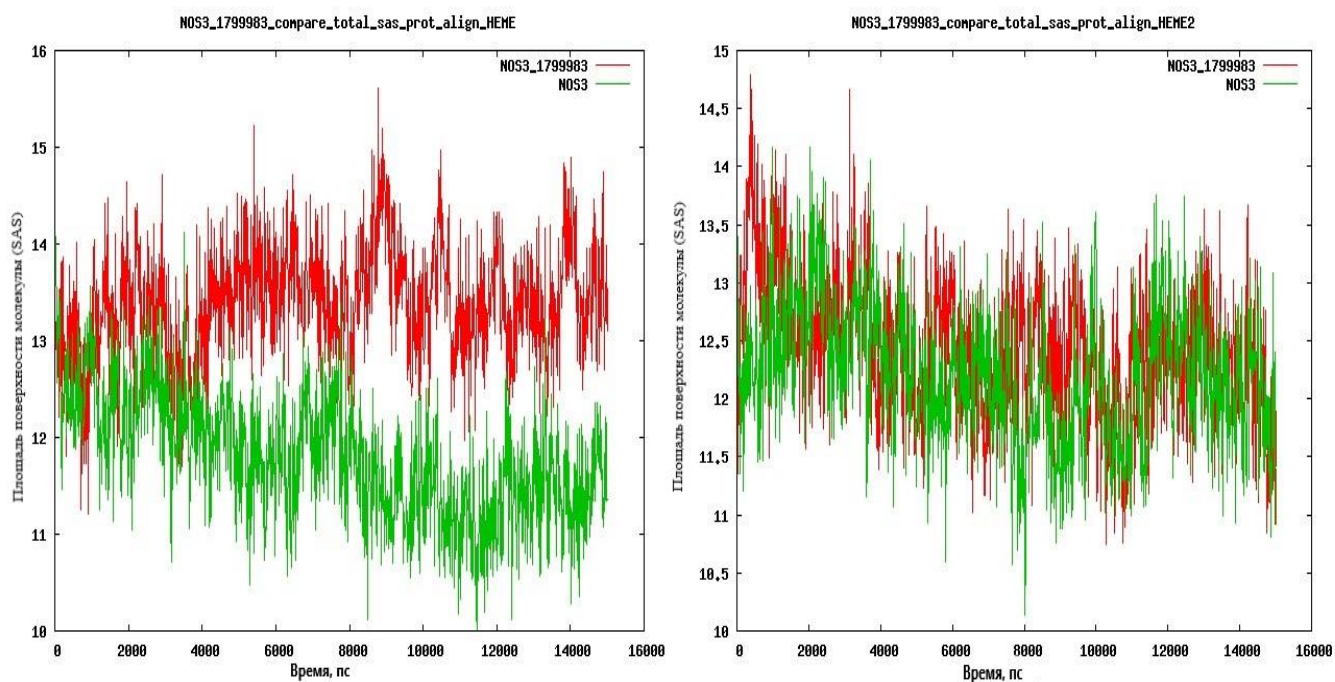


Рисунок 20 – Изменение площади поверхности окружения кофактора

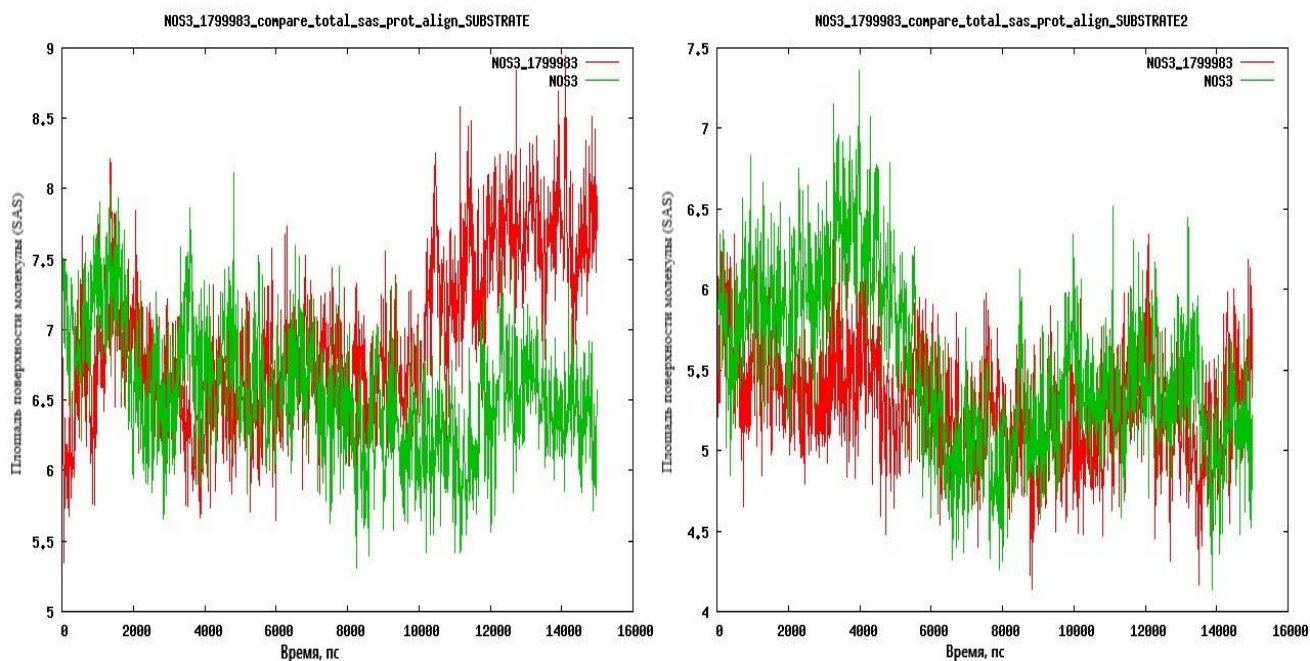


Рисунок 21 – Изменение площади поверхности сайта связывания кофактора

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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внедрение новых методов лечения в интервенционной кардиологии в конце прошлого века привело не только к снижению летальности и частоты инвалидизации после острого инфаркта миокарда, но и к увеличению средней продолжительности жизни человека. Стентирование коронарных артерий снизило число дорогостоящих, травматичных и длительных операций аортокоронарного шунтирования. В настоящее время в мире ежегодно выполняется более 4 млн операций стентирования коронарных артерий. Самым распространенным осложнением стентирования является РВС, при этом широкое внедрение в клиническую практику СЛП позволило лишь частично решить проблему рестеноза. Клинически проявляющееся рестенозирование в стенте происходит, по данным различных авторов, у 12–32 % пациентов, а ангиографические проявления рестенозирования, даже при использовании СЛП последнего поколения, составляют в среднем 12 % (Alfonso F. et al., 2014; Byrne R. et al., 2015).

Этим объясняется большое число исследований, посвященных выяснению причин патогенеза РВС, в том числе генетической подверженности данному осложнению. Воздействие NO-синтаз на развитие дисфункции эндотелия коронарных артерий не вызывает сомнений. В то же время исследования, посвященные изучению влияния полиморфизмов генов *eNOS*, а также *iNOS* на вероятность рестенозирования в стенте, единичны и основаны на небольшом количестве клинических наблюдений. Вышесказанное свидетельствует об актуальности данного исследования, результаты которого сформировали новые представления о роли генов NO-синтаз в формировании предрасположенности к патологической пролиферации сосудистой стенки, стентированных КА у больных ИБС. Для достижения цели — определения полиморфных вариантов генов NO-синтаз, ассоциированных с риском развития рестеноза коронарных артерий и изучения механизма развития эндотелиальной дисфункции и рестеноза стентов — в исследование включено 764 представителя русской этнической группы

Сибирского региона, из которых 484 пациента с ИБС, а 280 человек составили контрольную группу. Общее количество пациентов, направленных на стентирование, составило 212 человек. Из них в группу пациентов без рестеноза вошло 150 чел. (группа II), с рестенозом — 62 чел. (группа III).

При сравнении групп пациентов с рестенозом и без рестеноза нами найдены статистически значимые различия между ними по протяженности стеноза, степени сужения коронарной артерии и факту наличия артериальной гипертензии. По остальным факторам (пол, возраст, наличие в анамнезе сахарного диабета) достоверных различий не выявлено.

В соответствии с задачами исследования изучена возможная ассоциация полиморфизмов генов NO-синтаз с ИБС.

Следует отметить, что влияние различных полиморфизмов гена *eNOS* на развитие и особенности течения сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ИБС (таблица 9), широко изучается в мире.

Таблица 9 – Найденные ассоциации полиморфизма гена eNOS с сердечно-сосудистыми заболеваниями у представителей разных популяций

Ссылка	Популяция	Ассоциация
-786 T/C полиморфизм		
Chilardi G. et al., 2002	Европейская популяция	Риск развития ИБС выше у пациентов носителей генотипа C/C
Досенко В.С. и соавт., 2005	Украинская популяция	Гомозиготы с патологическим C/C генотипом в 2,5 раза чаще встречаются среди больных с ОКС
Yoshimura M. et al., 2000	201 пациент с коронарным спазмом и 345 добровольцев	Данный полиморфизм — наиболее влиятельный фактор риска коронарного спазма
Takagi S. et al., 2001	Японская популяция их 2020 пациентов	Носительство пациентами гомозиготного аллеля C увеличивает риск коронарного спазма
Jeerooburkhan N. et al., 2008	3052 мужчин из Европейской популяции с ИБС и 2000 мужчин – контрольная группа	Данный полиморфизм не влияет существенно на содержание в плазме NO и на риск развития ИБС в популяции европейских мужчин среднего возраста
Rossi G.P. et al., 2006	Европейская популяция, GENICA study (1999–2001)	Полиморфизм гена eNOS связан с повышенным риском развития ИБС

Ссылка	Популяция	Ассоциация
Liu D. et al., 2016	6192 больных ИБС и 9281 здоровый человек	Доказана ассоциация полиморфизма с риском развития ИБС
Tangurek B. et al., 2006	211 человек (в возрасте 27–85 лет) турецкой популяции	Частота распространения <i>C</i> -аллеля выше среди больных ИБС. Данный полиморфизм является фактором риска ИБС в турецкой популяции
Rossi G.P. et al., 2003	1225 европейцев. Из них 1106 пациент с ИБС. Контрольную группу составили 119 человек	<i>C</i> -аллель связан с более высоким риском множественного поражения коронарных артерий у европейцев, больных ИБС
Ciftci C. et al., 2008	10 пациентов с ОКС, 20 с хроническими формами ИБС, 31 – контрольная группа. Исследование проводилось в турецкой популяции	Отмечалась более высокая частота встречаемости генотипа <i>C/C</i> у пациентов с ОКС, чем в контрольной группе. <i>T/T</i> генотип чаще встречается у пациентов с ИБС
Ghilardi G. et al., 2002	Итальянская популяция: 88 больных, 133 – контрольная группа	Наличие <i>C</i> -гомозиготного аллеля является независимым фактором риска развития атеросклероза сонных артерий
Пархоменко А.Н. и соавт., 2008	249 пациентов с ОКС украинской популяции	Частота встречаемости генотипа <i>C/C</i> достоверно выше в группе больных с ОКС
Пархоменко А.Н. и соавт., 2005	221 больной с острым коронарным синдромом и 83 здоровых индивидуума Европейской популяции	Наличие генотипа <i>C/C</i> увеличивает вероятность развития ОКС в украинской популяции
Nakayama M. et al., 2013	209 мужчин и 238 женщин японской популяции	Курение в сочетании с полиморфизмом повышает риск коронарного спазма
Augeri A.L. et al., 2009	49 больных АГ Европейской популяции	У носителей <i>C</i> -аллеля обнаружено более благоприятное антигипертензивное влияние аэробных упражнений, чем у носителей <i>T</i> -аллеля
<i>G894T</i> полиморфизм		
Cam S.F. et al., 2005	115 больных ИБС и 83 здоровых лица турецкой популяции	<i>T/T</i> генотип связан с риском развития ИБС
Li Y.Y., 2010	11248 человек китайской популяции	Наличие <i>T</i> -аллеля связано с риском развития АГ в китайской популяции
Xin Y. et al., 2009	1181 больной АГ с ГЛЖ и 1341 пациент с АГ без ГЛЖ (китайская популяция)	Гомозиготы по аллелю <i>T</i> имеют высокий риск развития ГЛЖ при наличии АГ
Zhang K. et al., 2012	Метаанализ включал 2994 больных и 3130 лиц группы контроля азиатской популяции	Полиморфизм гена eNOS играет важную роль в развитии ИБС среди лиц азиатской популяции. Носительство генотипа <i>TT</i> увеличивает риск развития ИБС

Ссылка	Популяция	Ассоциация
Тепляков А.Т. и соавт., 2012	165 пациентов с ИБС, осложненной ХСН.	Гомозиготы по аллелю <i>T</i> имеют более выраженные нарушения эндотелиальной вазодилатации по сравнению с носителями. Выявлена ассоциативная связь с риском развития ИБС и тяжестью протекания ХСН
* Шувалова Ю.А. и соавт., 2011	101 пациент российской популяции	Имеется вероятность фактора риска развития рестеноза после стентирования коронарных артерий непокрытыми стентами у российских мужчин
Markus H.S. et al., 1998	361 европейский пациент с ишемическим инсультом	Связан с ишемическими цереброваскулярными заболеваниями
Балацкий А.В. и соавт., 2013	183 человека российской популяции	Наличие <i>G/G</i> генотипа, ассоциировано с высоким уровнем каталитической активности eNOS у лиц, перенесших ИМ без предварительного коронарного анамнеза
4a / 4b полиморфизм — VNTR		
Yang Y. et al., 2014	Метаанализ 10617 больных ИБС и 8302 человека контрольной группы	Является фактором риска развития ИБС
Milutinović A. et al., 2005	403 европейских мужчины, 215 из них страдали ИБС	Не является генетическим маркером развития ИБС
Полунина О.С. и соавт., 2013	Российская популяция. 35 больных ИБС, 35 ХОБЛ, 40 сочетает ХОБЛ и ИБС	<i>4a/4b</i> генотип достоверно чаще встречается у больных ХОБЛ и ИБС, Доказана роль <i>4a</i> -аллеля в развитии ИБС (как при мононозологии, так и при ассоциации с ХОБЛ)
Ekmeçci A. et al., 2013	35 пациентов с ИМ и 50 здоровых лиц турецкой популяции	Установлена ассоциация данного полиморфизма с ранним развитием атеросклероза и ИМ
Yang Yujiao et al., 2014	Метаанализ, включавший 10617 больных и 8302 здоровых лица сплошной выборки	Может быть фактором риска развития ИБС, особенно у африканцев
Salimi S. et al., 2006	Иранская популяция (141 больной с ангиографически подтвержденной ИБС, 159 – здоровые лица)	Полиморфизм не является независимым фактором риска развития ИБС в данной популяции
Kunnas T., 2004	700 финских мужчин	Не выявлено значительных различий между генотипами и выраженностью атеросклеротических поражений
Munshi A. et al., 2010	640 человек индийской популяции	Носители <i>4a</i> -аллеля склонны к развитию инсульта
Комбинация полиморфизмов		
Alp E. et al., 2009	Турецкая популяция (146 больных ИБС и 122 здоровых лица)	Не выявлено существенных ассоциаций между полиморфными вариантами и ИБС

Ссылка	Популяция	Ассоциация
* Colombo M.G. et al., 2003	226 пациентов после стентирования КА (Великобритания)	Носители <i>C</i> аллеля полиморфизма <i>T-786 C</i> и <i>T</i> аллеля полиморфизма <i>894 GT</i> гена <i>eNOS</i> ассоциировано с рестенозом
Park K.-W. et al., 2004	164 пациента с ОКС и 142 контрольных лица корейской популяции	Наличие генотипа <i>bb</i> генотипа <i>ab</i> полиморфизма гена <i>eNOS</i> является протективным фактором при развитии рестеноза
Li J. et al., 2010	Мета-анализ включал 56 исследований (азиатских и неазиатских)	<i>G894T</i> и <i>T-786C</i> полиморфизмы гена <i>eNOS</i> ассоциированы с ИБС среди азиатской и неазиатской популяций
Casas J.P. et al., 2004	9867 больных ИБС и 13161 человек контрольной группы	Не выявлено значимой связи <i>C</i> -аллеля полиморфизма <i>T-786C</i> и аллеля <i>G</i> полиморфизма <i>G894T</i> гена <i>eNOS</i> с развитием ИБС
Fatini C. et al., 2004	477 человек итальянской популяции	Носительство (<i>4a4a</i> / <i>-786CC</i>) гаплотипа ассоциировано с риском развития рестеноза. Наличие сопутствующей гипергомоцистеинемии повышает вероятность развития повторного стеноза
In Jai Kim et al., 2007	147 больных ИБС, 222 здоровых пациента (корейская популяция)	Сочетание <i>-786TC</i> и <i>4a/4b</i> генотипов ассоциировано с развитием ИБС у корейцев
Granath B. et al., 2001	573 белых австралийца больных ИБС и 624 здоровых лица	Не выявлено ассоциации <i>G894T</i> полиморфизма с ИБС. Не найдено различий в частоте, с которой встречается аллель <i>4b/4b</i> , <i>894G/T</i> , <i>-786C/T</i> у больных с ИБС и здоровых лиц
Примечание. * Исследования, посвященные генетическим предикторам рестеноза стента		

В диссертационной работе исследованы пять полиморфизмов гена *eNOS* (*G894T*, *VNTR*, *774 C/T*, *-786T/C* и *691C/T*) и один полиморфизм гена *iNOS* (*(CCTTT)n*).

Согласно полученным результатам, генотипы полиморфных вариантов *774 C/T* и *691C/T* гена *eNOS* находились в соответствии с равновесием Харди – Вайнберга. Однако обнаружены статистически значимые отклонения распределения генотипов полиморфизмов *G894T*, *VNTR*, *-786T/C* гена *eNOS* ($p < 0,05$) и статистически значимое ($p < 0,05$) отклонение распределения генотипов полиморфизма *(CCTTT)n* гена *iNOS* от равновесия Харди – Вайнберга,

которое связано с отклонением уровня гетерозиготности в сторону увеличения уровня гетерозигот.

Нами установлено, что носители гомозигот по *T*-аллелю (генотип *TT*) полиморфизма *G894T* гена *eNOS* статистически значимо ($p < 0,05$) чаще встречались в группе пациентов с ИБС по сравнению с группой контроля. Расчет рисков показал, что риск формирования ИБС у пациентов-гетерозигот *GT* и гомозигот *TT* достоверно выше ($OR = 1,25$ и $1,77$, $p < 0,05$) соответственно. Развитие ИБС у пациентов, гомозиготных по аллелю *G*, достоверно ниже.

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 (Zhang K. et al., 2012).

Авторы предположили следующий механизм влияния полиморфизма *G894T* гена *eNOS* на развитие ИБС среди лиц азиатской популяции: наличие мутантного аллеля *T* данного полиморфизма приводит к конформационному изменению аспарагиновой аминокислоты, что предопределяет ее внутриклеточное расщепление с образованием двух фрагментов с молекулярными массами 100 и 35 кД. Следствием такого расщепления является непосредственное снижение активности фермента у носителей аллеля *T* (гомозигот *TT*) и уменьшение эндотелий-зависимой дилатации сосудов с последующим развитием ИБС (Zhang K. et al., 2012).

Однако в другой работе опубликовано опровержение результатов исследования расщепления аспарагиновой аминокислоты у носителей мутантного аллеля *T* полиморфизма *G894T* (Kayhan F.E. et al., 2016). Ученые выдвинули предположение, что описанная ранее фрагментация *eNOS*, вероятно, могла быть следствием нарушения пробоподготовки образцов в эксперименте. Ими также продемонстрировано, что количество образуемой *eNOS* и ее активность, а также восприимчивость к клеточному стрессу не различались у расщепленной и нерасщепленной форм *eNOS*. В связи с этим внимание ученых привлекла гипотеза о реализации эффектов полиморфизма *G894T* гена *eNOS* (гомозигот *TT*) за счет

опосредуемого генотипами взаимодействия eNOS с регуляторным белком кавеолином-1 (Kayhan F.E. et al., 2016). Предположительно, полиморфизм *G894T* гена eNOS приводит к усилению связывания кавеолина-1 с оксигеназным доменом eNOS, нарушая взаимодействие последнего с кальмодулином, тем самым угнетая активность фермента, что понижает концентрацию нитритов в сыворотке крови.

Установлено, что активность *eNOS* у носителей генотипов *GT* и *TT* полиморфизма *G894T* гена eNOS была более низкой, чем у носителей генотипа *GG*, что было обусловлено сниженной диссоциацией eNOS из комплекса с кавеолином-1 (примерно на 35 %) (Wrzosek M. et al., 2015). Возможно, именно этот механизм обеспечивает снижение функциональной активности *eNOS*, которая определялась у пациентов-гетерозигот *GT* и гомозигот *TT*, ассоциированной с высоким риском развития ИБС.

Согласно результатам наших исследований, частота гомозигот по аллелю *C* полиморфизма *-T786C* гена *eNOS* в группе ИБС статистически значимо ($p < 0,05$) выше. Расчет рисков показал, что предрасположенность к формированию ИБС у пациентов – носителей гомозигот по аллелю *C* достоверно выше ($OR = 2,93$, $p < 0,05$).

Предположительный молекулярный механизм данной ассоциации связан с инактивацией промотора. Снижение функциональной активности промотора связано с репрессорным репликационным белком A1 (Forconi S. et al., 2017). Он известен как белок, обладающий способностью к связыванию с одноцепочечными молекулами ДНК и необходимый для репарации, репликации и рекомбинации. Именно 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, белковых молекул eNOS и снижению синтеза NO. Результаты исследования А.М. Elakkad созвучны нашим данным об ассоциации полиморфизма *-T786C* гена eNOS с ИБС. Ученые доказали, что введение олигонуклеотидной последовательности, комплементарной к белку A1, восстанавливает транскрипционную активность

промотора гена eNOS при наличии указанного полиморфизма (Elakkad A.M. et al., 2017). Более того, замена тимина на цитозин в позиции -786 в области промотора гена NOS3 ассоциирована с более узким просветом проксимальных и дистальных сегментов коронарных артерий, а также с более выраженными вазоконстрикторными эффектами ацетилхолина в данных сосудах (Vecoli C. et al., 2012). Эти данные согласуются с нашим исследованием, в котором обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение степени сужения коронарных артерий у пациентов с рестенозом. Согласно данным логистической регрессии сужение коронарных артерий у данной группы пациентов являлось предрасполагающим этиологическим фактором развития рестеноза в стенке. Чувствительность модели составила 83,33 %, специфичность — 36,99 %, площадь под ROC-кривой — 61,8 % (см. рисунок 6,б).

Результаты настоящей работы согласуются с данными диссертационной работы Э.Ф. Муслимовой (2016), согласно которым частота гомозигот по аллелю *C* полиморфизма -*T786C* гена eNOS в группе больных ИБС также статистически значимо ($p < 0,05$) выше. Кроме того, автором выявлена ассоциация генотипа *C/C* полиморфизма -*T786C* с тяжестью функционального класса (ФК) стенокардии ($p = 0,044$). Больные с генотипом *T/C* отличались от носителей генотипов *T/T* и *C/C* наименьшей фракцией выброса левого желудочка при первичной госпитализации ($p = 0,033$). Автор доказал, что носительство генотипов *T/T* и *C/C* ассоциировано с неблагоприятным течением ИБС (Муслимова Э.Ф., 2016).

Несмотря на противоречивость данных об ассоциации полиморфизма *VNTR* гена eNOS с развитием ИБС, нами установлено, что частота встречаемости аллелей *a* (генотипы *aa*) полиморфизма *VNTR* гена eNOS статистически значимо ($p < 0,05$) выше в группе больных ИБС по сравнению с группой контроля. Риск формирования ИБС оказался достоверно выше у больных – носителей гомозиготного аллеля *a* (OR = 1.4, $p < 0,05$).

Считается, что наличие аллеля *a* (генотип *aa*) полиморфизма *VNTR* гена eNOS ассоциировано с большим числом малых (коротких) интерферирующих РНК (siRNA, от англ. small interfering RNA) 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).

Проведенное нами исследование показало, что частота генотипа XX полиморфизма $(CCTTT)n$ гена iNOS в группе ИБС также достоверно выше ($p < 0,05$), причем риск формирования ИБС статистически значимо выше у гетерозигот по аллелю X ($OR = 1,49, p < 0,05$).

Важно отметить, что полиморфизмы, локализованные в промоторной области гена iNOS, влияют как на активность, так и на количество образующегося фермента и, следовательно, на синтез ими оксида азота. Более высокий риск формирования ИБС у гетерозигот по аллелю X полиморфизма $(CCTTT)n$ гена iNOS может быть связан с нарушением активности фермента. В частности, может происходить разобщение iNOS непосредственно как за счет снижения димеризации данной изоформы, так и с помощью нарушения биосинтеза ее кофактора ВН4. В исследованиях также показано, что наличие генотипа XX полиморфизма $(CCTTT)n$ гена iNOS у больных ИБС снижает активность фермента за счет супрессии фосфорилирования iNOS в позиции Ser1177 киназой Akt и активации фосфорилирования киназой PKC в участке Thr495 с последующим снижением количества оксида азота в сыворотке крови (Shen J. et al., 2007).

Аналогичные результаты в других популяциях получены Р.С. Карповым и соавт. (2012). Им верифицированы ассоциативные взаимосвязи полиморфизмов генов iNOS $(CCTTT)n$ и eNOS $(Glu298Asp)$ с риском развития ИБС у жителей Сибирского региона. Полиморфизм гена eNOS $(Glu298Asp)$ ассоциирован с нарушением ЭЗВД (Карпов Р.С. и др., 2012; Пархоменко А.Н. и др., 2015; Kim M.S. et al., 2011).

Можно предположить, что ингибирующее влияние на активность iNOS, обусловленное исследуемым полиморфизмом, связано с ЭД и усиленной продукцией эндотелина-1. Последний относится не только к мощным вазоконстрикторным эндотелиальным факторам, но и обладает митогенными и

хемотоксическими свойствами, что индуцирует пролиферацию ГМК сосудов. В то же время эндотелин-1 через эндотелиновые рецепторы типа А может ингибировать активность iNOS и продукцию NO, вызываемую провоспалительным IL-1 (Dai X. et al., 2016).

Установлена ассоциация ряда полиморфизмов генов NOS с рестенозом стентов.

В патофизиологии рестеноза важную роль наряду с другими факторами играет дисфункция эндотелиальных клеток на фоне длительно продолжающегося воспаления, прорастания эндотелия в просвет стента, а также прямой контакт интимы коронарных артерий с кровотоком вследствие очаговой десквамации эндотелия (Бернс С.А., 2011; Tomas L., 2015).

Таким образом, основную роль в развитии рестеноза играют клетки эндотелия коронарных артерий, состояние которых определяется уровнем синтеза NO, контролируемого генами eNOS. Патологические изменения синтеза NO стимулируют процесс пролиферации гладкомышечных клеток артериальной стенки, который является рилизинг-фактором в формировании «неоинтимы», что является причиной рестеноза в стенте (Каражанова Л.К., 2012; Шамес Д.В., 2017; Le Tourneau et al., 2001; Levinsson T.A. et al., 2014).

В ходе масштабных программ GENDER в 1998 году (Genetic Determinants of Restenosis, Jukema J.W.), CAPARES в 2002 году (Coronary AngioPlasty Amlodipine Restenosis Study), RESEARCH, ISAR-STEREO-2 в 2003 году (Strut thickness effect on restenosis outcome) проведено целенаправленное изучение генетики рестенозов. В ходе мультицентрового исследования изучены 45 генов – потенциальных предикторов рестеноза, имеющих отношение к биологически активным веществам, определяющим различные патофизиологические эффекты в стенте.

В итоге установлено только 6 генов — *AGTR1*, *FGB*, *GPX1*, *MMP12*, *KAT2B* и *VDR*, являющихся предикторами развития рестеноза в европейской популяции (Koerfer Putting R., 2005; Schleithoff S.S. et al., 2012; Zittermann A. et al., 2015; Kayhan F.E. et al., 2016). Согласно результатам данных исследований

статистически значимого влияния на развитие рестеноза гены синтетазы оксида азота не оказывали.

По результатам нашего исследования распределение генотипов изученных полиморфизмов гена *eNOS* в группе с рестенозом подчинялось закону Харди – Вайнберга. Обнаружено статистически значимое отклонение распределения генотипов полиморфизма $(CCTTT)_n$ гена *iNOS* от равновесия Харди – Вайнберга, которое связано с отклонением уровня гетерозиготности в сторону увеличения уровня гетерозигот ($H_o = 0,27$, $H_e = 0,36$, $D = 0,34$).

Нами установлено достоверное различие между частотами генотипов полиморфизма *VNTR* гена *NOS3* в группе с рестенозом и без него ($\chi^2 = 17,23$, $p < 0,05$). Расчет рисков показал, что формирование рестеноза стентов достоверно выше у носителей, гомозиготных по минорному аллелю *a*, и у гетерозигот *ab*. В свою очередь наличие у больного гомозиготы по дикому аллелю *b* снижает риск развития рестеноза.

Jones K. et al. (2015) в ходе исследования, проведенного в репрезентативной группе (1850) пациентов, перенесших стентирование коронарных артерий, выявили достоверную ассоциацию встречаемости генотипов полиморфизма *VNTR* гена *NOS3* с частотой рестеноза в стенке, что совпадает с результатами наших исследований.

Анализ полиморфизма $894 G/T$ гена *eNOS* показал достоверное различие между частотами генотипов в группе с рестенозом и без него ($\chi^2 = 13,16$, $p < 0,05$). Расчет рисков позволил установить, что формирование рестеноза достоверно выше у носителей, гомозиготных по минорному аллелю *T* и гетерозигот *GT* ($OR = 1,75$ и $2,36$, $p < 0,05$) соответственно.

Полученные в диссертационной работе данные согласуются с исследованиями, проведенными Khalkhai-Ellis Z. et al. (2010), в которых установлена ассоциация полиморфизма $G894T$ гена *eNOS* со снижением уровня NO. В работе показано, что редукция активности фермента *eNOS* в случае замены на мутантный аллель *T* снижает фосфорилирование *eNOS* в позиции Ser1177 и повышает его связывание с кавеолоином.

Известно, что оксид азота является мощным вазодилататором, ингибирует рост ГМК, предотвращает агрегацию тромбоцитов, ингибирует адгезию лейкоцитов к сосудистой стенке, а также обладает антиоксидантными свойствами (Афанасьев А.С., 2013; Дашкова А.А., 2015; Alderton W.K. et al., 2001; Poulos T.L., 2005; Daff S., 2010; Juni R.P., 2016; Li H., 2016; Liu D. et al., 2017). В этой связи NO препятствует тромбообразованию, воспалению и гиперплазии неоинтимы, т.е. оказывает влияние на все звенья рестеноза внутри стента. Возможно, уменьшением его протективной роли у носителей, гомозиготных по минорному аллелю *T*, и гетерозигот *GT* полиморфизма *894 G/T* гена *eNOS* можно объяснить негативную ассоциацию полиморфизмов данного гена с процессами развития рестеноза (Березикова Е.Н., 2017; Nakayama M. et al., 2000; Alkharfy K.M. et al., 2010; Yao Y.S. et al., 2013).

Согласно результатам исследования Colombo M.G. et al. (2003), проведенного у 226 пациентов жителей Великобритании после успешного стентирования коронарных артерий, у пациентов – носителей *C* аллеля полиморфизма *T-786C* и аллеля *T* полиморфизма *G894T* гена *eNOS* диагностирована достоверно большая частота рестенозов. При изучении полиморфизма *G894T* гена *eNOS* у 226 пациентов, которым выполнено стентирование коронарных артерий по поводу ИБС, установлена взаимосвязь полиморфизма с повышенной вероятностью развития рестеноза в стенте. Гомозиготный аллель *T* полиморфизма *Glu298Asp* гена *eNOS* встречался статистически значимо чаще, чем гомозиготный по аллелю *G* (Шувалова Ю.А. и др., 2008; Козлов К.Л. и др., 2017; Gomma et al., 2002). Согласно данным Johansson J. et al. (2015), предпринявших исследование у 580 мужчин скандинавской популяции, перенесших стентирование коронарных артерий, в группе пациентов с рестенозом практически в 2 раза чаще встречался минорный аллель *T* полиморфизма *G894T* гена *eNOS*.

Возможно, молекулярный механизм рестенозирования у носителей, гомозиготных по минорному аллелю *T*, и гетерозигот *GT* полиморфизма *894 G/T* гена *eNOS*, связан с активацией эндотелиновых рецепторов типа *A*

эндотелином-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).

Следующей задачей нашего исследования было выявление ассоциации гаплотипов полиморфных вариантов генов NO-синтаз с развитием рестеноза в стенте. Найдены единичные работы, посвященные ассоциации гаплотипов полиморфных вариантов генов NO-синтаз с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Так, Martinelli N. et al. в бразильской популяции (n = 145) определили гаплотип, обладающий протективным эффектом в отношении хронической сердечной недостаточности (786C / 4b / Asp298) гена eNOS. Авторы объясняют такой результат преобладанием пациентов негроидной расы (Martinelli N.C. et al., 2012).

Tardelli M. et al. в результате проведенных исследований делают вывод о том, что для итальянской популяции два полиморфизма гена eNOS связаны с существенными ангиографическими изменениями. Ученые предполагают, что сочетание двух типов полиморфизмов *T-786C* и *G894T* гена eNOS образует гаплотип (*786 C/ 894 T*), ассоциированный с риском развития ИБС (Tardelli M. et al., 2014; Liu D. et al., 2017).

Нами не было обнаружено исследований, посвященных ассоциации гаплотипов генов NO-синтаз с развитием рестеноза.

В рамках данного исследования в процессе анализа частот встречаемости отдельных гаплотипов в группах больных без рестенозов и с рестенозами выявлены два достоверно чаще встречающиеся гаплотипа:

- *TCabGT11* – наиболее часто встречается у больных с рестенозом;
- *TTabGG11* – встречается только у больных с благоприятными исходами.

Несомненно, существует много причин рестенозирования в стенте. Thomas L. на основании анализа современного состояния эндоваскулярной технологии приводит 2 группы проблем.

1. Механические проблемы:

- Stent underexpansion — недораздутие, недораскрытие стента, которое обычно возникает во время процесса имплантации. В таком случае, даже если стент хорошо адаптирован к сосудистой стенке, его просвет меньше, чем должен быть;

- Malapposition — неправильное положение стента, когда стент не прилежит плотно к стенке артерии. Так образуется пространство между стентом и стенкой артерии, которое заполняется кровью с последующим тромбообразованием;

- слишком маленькие стенты;
- извилистые и скрученные артерии;
- технические трудности при имплантации стента, которые могут приводить к удалению части лекарственного покрытия со стента, что приводит к неравномерной локализации антитромбоцитарного препарата.

2. Технические проблемы, связанные со стентом:

- стенты, которые не покрывают область артериальной стенки, травмированной при ангиопластике;

- слишком длинные стенты;
- использование перекрывающихся друг друга или вплотную расположенных стентов;

- переломы стентов;

- короткие промежутки между стентами;

- неэффективный кровоток по стенту (Thomas L. et al., 2016).

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 нашего 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 генотипа *GT* и *TT* (AUC 65,30 %, $p < 0,05$) и гаплотипа *TCabGT11* (AUC 59,70 %, $p < 0,05$) увеличивают вероятность рестенозирования в стенте.

Напротив, у пациентов – носителей гаплотипа *TTabGG11* демонстрируется меньшая вероятность рестенозирования после стентирования КА (AUC 56,7 %, $p < 0,05$).

Таким образом, нами впервые установлено, что в популяции русской этнической группы Сибирского региона наличие у пациентов с ИБС вышеописанных предрасполагающих факторов ассоциировано с увеличением риска РВС. В этом случае пациентам необходимо обращать особое внимание на компенсацию и лечение ИБС. Для пациентов с выявленными предикторами при планировании эндохирургического вмешательства следует выбирать стенты с лекарственным покрытием, а также проводить комплекс послеоперационных профилактических мероприятий, направленных на предотвращение развития ЭД и РВС. При наличии гаплотипа *TTabGG11* у пациента наиболее вероятен благоприятный исход, а риск рестенозирования минимален.

При изучении механизма формирования эндотелиальной дисфункции и рестеноза стентов у больных ИБС с наличием полиморфного варианта *G894T* (*rs1799983*) нами установлено, что наличие данного полиморфизма ведет к замене аминокислотного остатка в позиции 298. При данной модификации происходит замена гидрофильного, полярного, отрицательно заряженного глутамина на аспарагин.

Установлено, что введенная замена приводит к изменению подвижности отдельных элементов структуры белка.

При внесении замены (*rs1799983*) отмечалось нарушение в поведении мономера 1, значение RMSD мутированного мономера резко отличалось от

первичной белковой молекулы и значительно быстрее выходило на «плато», а среднее значение RMSD оставалось ниже, чем у «нормального» мономера. Данный факт свидетельствует о жесткости структуры модифицированного мономера 1.

При внесении мутации в мономере 1 происходило уменьшение флуктуаций остатков, попадающих в участок «гибкой руки». При симуляции мутированной NO-синтазы происходила стабилизация на уровне 105–125 а.о. в мономере 1. Значения RMSD оставались на уровне 3,5 Å, в то время как при симуляции нормальной NOS 3 «гибкая рука» значительно отклонялась после 6 нс симуляции. Оценка количества водородных связей между а.о. 105–125 показала, что при изменении положения «гибкой руки» в нормальной синтазе происходит уменьшение водородных связей, однако при внесении мутации этого не происходит.

При внесении замены 298 *Glu>Asp* в аминокислотную последовательность NOS3 происходило временное увеличение числа водородных связей между мономерами фермента. Установлено, что отличия RMSD при внесении мутации достаточно значительны (около 4 Å). Оценка общей площади контактирующих остатков мономеров, как и при RMSD, показало увеличение площади контакта в ходе симуляции.

Важными факторами, влияющими на каталитическую активность NOS3, являются структура сайта связывания субстрата и окружение кармана с коферментом – гемом. В работе исследованы три 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, что влекло за собой увеличение площади сайта связывания субстрата и площади кармана с гемом. На поведение соответствующих участков в мономере 2 внесение мутации не влияло.

Для оценки конформационных перестроек внутри молекулы белка использовали алгоритм DSSP. В ходе симуляций в мутантной NOS3 отмечалось

разрушение элементов вторичной структуры белка, что подтверждается наличием «шумов» на N-конце мономера 1 и 2. В нормальной NOS3 перестроек не обнаружено.

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

По данным Doshi A. et al., полиморфизм *G894T* экзона 7 характеризуется заменой азотистого основания гуанин (*G*) на тимин (*T*), приводящей к замене глутаминовой аминокислоты (*Glu*) на аспарагиновую (*Asp*) в положении 298 белка eNOS (*Glu298Asp*), что совпадает с данными, полученными в нашем исследовании.

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 разницы в активности белка eNOS среди носителей генотипов *GG*, *GT* и *TT*. Так, в уже упоминавшемся исследовании *in vitro* A. Doshi не выявлено достоверной разницы в количестве матричной РНК eNOS и экспрессии белка этой NO-синтазой у носителей редкого аллеля *T* (гомозиготы *TT* и гетерозиготы *GT*) по сравнению с гомозиготами *GG* (Doshi A.A., 2012). 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: 35 кДа N-терминальный и 100 кДа C-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). В исследовании Fairchild T.A. et al. показано, что в культуре клеток COS7, трансфектованных ДНК нормального гена *eNOS* и гена с полиморфизмом *G894T*, разницы в уровне выделения в среду метаболитов NO не выявлено, то есть как нормальный, так и мутантный белок является каталитически активным и обеспечивает нормальный синтез NO в обычных условиях культивирования. Однако при уменьшении pH среды ниже 5,0 в течение 10 ч происходили образование 100 кДа фрагмента и уменьшение периода полураспада мутантной формы фермента. Применение различных экстремальных факторов, в частности влияния гипоксической смеси в течение 48 часов, воспроизведения оксидантного стресса с помощью перекиси водорода или влияния цитостатика на стауроспорину, не приводило к фрагментации мутантного варианта eNOS. Авторы не исключают, что феномен кислотического 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).

Недостаточность синтеза NO ведет к развитию эндотелиальной дисфункции, которая является причиной развития рестенозирования в стенке. Таким образом, в результате изучения молекулярного механизма доказано, что наличие полиморфного варианта *G894T (rs1799983)* ведет к формированию эндотелиальной дисфункции и рестеноза в стенке.

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 научном 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 (rs1799983)* впервые установлено, что наличие данного полиморфизма ведет к замене аминокислотного остатка в составе эндотелиальной NO-синтазы в позиции 298. При данной модификации происходит замена гидрофильного, полярного, отрицательно заряженного глутамина на аспарагин, следствием чего являются значительные конформационные изменения отдельных элементов внутри фермента - увеличение жесткости структуры модифицированного мономера 1 и уменьшение флуктуаций аминокислотных остатков, попадающих в участок «гибкой руки» данного мономера, увеличение числа водородных связей между мономерами фермента, увеличение площади сайта связывания субстрата и площади кармана с гемом, разрушение вторичной структуры белка. Таким образом формируется недостаточность синтеза эндогенного NO с последующим развитием эндотелиальной дисфункции, являющейся причиной рестеноза в стенке.

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)_n* 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АГ — артериальная гипертензия
- АД — артериальное давление
- АДМА — асимметричный диметиларгинин
- АПФ — ангиотензинпревращающий фермент
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ГЛЖ — гипертрофия левого желудочка
- ГМК — гладкомышечные клетки
- ИБС — ишемическая болезнь сердца
- ИЛ-10 — интерлейкин-10
- ИМ — инфаркт миокарда
- КА — коронарные артерии
- МД — молекулярная динамика
- НАДФН — никотинамиддинуклеотидфосфат
- ОКС — острый коронарный синдром
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- РВС — рестеноз внутри стента
- СД — сахарный диабет
- СЛП — стент с лекарственным покрытием
- ФК — функциональный класс стенокардии
- ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких
- ХСН — хроническая сердечная недостаточность
- цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат
- ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство
- ЭД — эндотелиальная дисфункция
- ЭЗВД — эндотелий-зависимая вазодилатация
- DSSP (Dictionary of Protein Secondary Structure) — площадь поверхности атомов во вторичной структуре белка

eNOS (NOS3) (endothelial nitric oxide synthase) — эндотелиальная NO-синтаза

iNOS (NOS2) (inducible nitric oxide synthase) — индуцибельная NO-синтаза

nNOS (NOS1) (neuronal nitric oxide synthase) — нейрональная NO-синтаза

NO — оксид азота

RMSD (Root Mean Square Deviation) — среднеквадратичное отклонение положения атомов молекулы во времени

RMSF (Root Mean Square Fluctuation) — отклонение конкретной частицы (атома, остатка) от ее первоначального состояния

SAS (Solvent Accessible Surface) — площадь поверхности молекулы, доступная для растворителя

TNF- α (tumor necrosis factor α) — фактор некроза опухолей альфа

VNTR (variable number of tandem repeats) — полиморфизм переменного числа нуклеотидных повторов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассоциация генетического полиморфизма гена эндотелиальной синтазы азота с сердечно-сосудистой патологией / А.А. Куба, Ю.М. Никонова, О.М. Феликсова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 3. — С. 23–27.
2. Афанасьев, А.С. Сравнительное исследование изменений энергетического метаболизма в кардиомиоцитах крыс при постинфарктном кардиосклерозе и сахарном диабете / А.С. Афанасьев, М.В. Егорова, С.В. Попов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — Т. 156, № 8. — С. 149–152.
3. Балацкий, А.В. Ассоциация молекулярно-генетических факторов с развитием инфаркта миокарда у лиц без ранее верифицированной стенокардии напряжения и критериями нестабильности атеросклеротических бляшек: дис. ... канд. мед. наук / А.В. Балацкий. — М., 2014. — 186 с.
4. Березикова, Е.Н. Клинико-генетические и нейрогормональные механизмы развития ишемического ремоделирования, апоптоза миокарда и сердечной недостаточности: инновационная стратегия персонализированной диагностики, профилактики и лечения: дис. ... д-ра мед. наук / Е.Н. Березикова. — Томск, 2015. — 316 с.
5. Бернс, С.А. Причины рестеноза в стенке после интервенционного лечения пациентов с острым коронарным синдромом с элевацией сегмента ST / С.А. Бернс, Е.А. Шмидт, О.Л. Барбараш // Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2011. — № 3. — С. 29–34.
6. Влияние генетического полиморфизма ангиотензин I – превращающего фермента на клинический результат чрескожных коронарных вмешательств у больных ишемической болезнью сердца / Ю.И. Бузиашвили, И.В. Кокшенёва, М.А. Какауридзе [и др.] // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. — 2018. — Т. 19. — № 1. — С. 45–55.

7. Влияние полиморфизма гена ITGB3 на частоту развития артериальной гипертензии у больных с острым коронарным синдромом / Т.Ю. Зотова, Г.И. Мяндина, В.А. Фролов [и др.] // Клиническая медицина. — 2013. — № 8. — С. 22–24.
8. Влияние полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота на состояние сосудистого эндотелия у больных бронхиальной астмой / И.В. Севостьянова, Л.П. Воронина, Е.А. Полунина [и др.] // Астраханский медицинский журнал. — 2013. — Т. 8, № 3. — С. 83–85.
9. Всемирный атлас профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и борьбы с ними [Электронный ресурс] / под ред. S. Mendis, P. Puska, B. Norrving; Всемирная организация здравоохранения. — Женева, 2013. — Режим доступа: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/112548>.
10. Гарднер, Р.С. Сердечная недостаточность: пер. с англ. / Р.С. Гарднер, Т.А. МакДонаг, Н.Л. Уолкер ; под ред. С.Н. Терещенко. — М.: МЕДпресс-информ, 2014. — 360 с.
11. Генетические предикторы развития эндотелиальной дисфункции у больных ишемической болезнью сердца, осложненной хронической сердечной недостаточностью / Е.Н. Березикова, А.А. Попова, А.Т. Тепляков [и др.] // Сердечная недостаточность. — 2017. — № 3. — С. 25–28.
12. Дашкова, А.А. Роль полиморфизма некоторых генов системы гемостаза и фолатного цикла в возникновении рестеноза у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца после коронарного стентирования / А.А. Дашкова, Г.А. Чумакова // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2012. — № S1. — С. 115–116.
13. Диагностика и лечение хронической ишемической болезни сердца [Электронный ресурс] : клинические рекомендации. — М., 2013. — Режим доступа: <http://www.cardioweb.ru/klinicheskie-rekomendatsii>.
14. Диспансеризация определенных групп взрослого населения [Электронный ресурс]: методические рекомендации / С.А. Бойцов, П.В. Ипатов,

А.М. Калинина [и др.]. — 3-е изд. — М., 2015. — Режим доступа: <http://www.tfoms.yar.ru/news/index.php?news=734>.

15. Интервенционная кардиология: коронарная ангиография и стентирование : руководство / А.П. Савченко, О.В. Черкавская, Б.А. Руденко [и др.]. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 448 с.

16. Каражанова, Л.К. Молекулярно-генетические основы диагностики и лечения ишемической болезни сердца: обзор литературы / Л.К. Каражанова, Ш.Т. Жукушева, А.А. Чиныбаева // Наука и здравоохранение. — 2014. — № 3. — С. 4–11.

17. Козлов К.Л. Экспрессия сигнальных молекул в культуре эндотелия человека при атеросклерозе и рестенозе коронарных артерий / К.Л. Козлов, И.И. Болотов, Н.С. Линькова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2017. — № 2. — С. 119–122.

18. Кузнецова, Т.Ю. Полиморфизм Glu298Asp гена эндотелиальной NO-синтазы и особенности течения артериальной гипертензии / Т.Ю. Кузнецова, И.П. Дуданов, Д.В. Гаврилова // Медицинский академический журнал. — 2007. — Т. 7, № 2. — С. 49–60.

19. Медикаментозное сопровождение чрескожного коронарного вмешательства / под ред. В.И. Ганюкова, А.В. Протопопова. — Новосибирск : АРЕАЛ, 2014. — 252 с.

20. Молекулярная клиническая диагностика. Методы : пер. с англ. / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — 558 с.

21. Муслимова, Э.Ф. Молекулярно-генетические факторы развития осложнений после стентирования коронарных артерий у больных хронической ИБС : дис. ... канд. мед. наук / Э.Ф. Муслимова. — Томск, 2016. — 246 с.

22. Национальные рекомендации ОССН, РКО и РНМОТ по диагностике и лечению ХСН / В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев, Г.П. Арутюнов [и др.] // Сердечная недостаточность. — 2013. — Т. 14, № 7. — С. 379–472.

23. Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы у больных с острыми коронарными синдромами — распространенность, значение для

прогноза и выбора тактики лечения / А.Н. Пархоменко, Я.М. Лутай, О.И. Иркин [и др.] // Кардиология. — 2015. — № 10. — С. 89–92.

24. Полиморфизм генов eNOS и iNOS при хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца / А.Т. Тепляков, С.Н. Шилов, Е.Н. Березикова [и др.] // Кардиология. — 2010. — Т. 50, № 4. — С. 23–30.

25. Полиморфизмы генов eNOS и GPx-1 ассоциированы с риском развития рестеноза после стентирования коронарных артерий непокрытыми стентами / Ю.А. Шувалова, А.И. Каминный, А.Н. Мешков [и др.] // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. — 2011. — № 25. — С. 47–53.

26. Полиморфные маркеры генов эндотелиальной NO-синтазы и сосудистого рецептора ангиотензина II и предрасположенность к ишемической болезни сердца / Д.А. Чистяков, В.В. Носиков, Л.О. Минушкина [и др.] // Генетика. — 2000. — № 12. — С. 1707–1711.

27. Приступа, Л.Н. Ассоциация аллельных полиморфизмов гена эндотелиальной NO-синтазы с развитием ишемической болезни сердца / Л.Н. Приступа, О.С. Погорелова // J. Clin. Exp. Med. Res. — 2015. — Т. 3, № 3. — С. 375–386.

28. Распространенность аллелей полиморфных вариантов Leu33Pro и Leu66Arg гена ITGB3 у жителей Сибирского региона / И.А. Гончарова, Н.П. Бабушкина, Л.И. Минайчева [и др.] // Генетика. — 2013. — № 8. — С. 877–880.

29. Рекомендации по диабету, предиабету и сердечно-сосудистым заболеваниям. EASD/ESC / Европейское общество кардиологов // Российский кардиологический журнал. — 2014. — Т. 107, № 3. — С. 7–61.

30. Роль VNTR полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота в развитии респираторно-кардиальной коморбидности / А.Х. Ахминеева, О.С. Полунина, И.В. Севостьянова [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». — 2014. — № 3. — С. 10–14.

31. Роль генетических факторов в механизмах развития ремоделирования коронарных артерий после имплантирования стентов / С.И. Винтизенко, Л.М. Огородова, К.Ю. Рукин [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. — 2015. — Т. 14, № 1. — С. 102–109.

32. Роль генетических факторов в прогнозировании осложнений на протяжении года после инфаркта миокарда / О.А. Макеева, М.В. Зыков, М.В. Голубенко [и др.] // Кардиология. — 2013. — № 10. — С. 16–23.

33. Сумин, А.Н. Периферический атеросклероз, сахарный диабет и отдаленные результаты коронарного шунтирования / А.Н. Сумин // Креативная кардиология. — 2014. — № 4. — С. 5–17.

34. Осипова, Е.С. Факторы риска рестеноза коронарных артерий после стентирования у женщин с ожирением в период менопаузы / Е.С. Осипова // Российский кардиологический журнал. — 2018. — Т. 23, № 5. — С. 34–39.

35. Фармакогенетический контроль полиморфизма I/D гена ангиотензин превращающего фермента — доминирующего фактора риска развития хронической сердечной недостаточности и мишени для лечения эналаприлом / А.Т. Тепляков, С.Н. Шилов, Е.Н. Березикова [и др.] // Кардиология. — 2013. — № 3. — С. 9–14.

36. Шувалова, Ю.А. Влияние полиморфизма генов антиоксидантных ферментов на развитие рестеноза после стентирования коронарных артерий : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ю.А. Шувалова. — М., 2008. — 25 с. // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. — 2008. — № 2. — С. 32.

37. Шамес, Д.В. Рестенозы после стентирования коронарных артерий: факторы риска возникновения, потенциальные возможности профилактики, способы устранения / Д.В. Шамес // Неотложная кардиология. — 2017. — № 3. — С. 38–46.

38. Южно, Е.С. Значение дисфункции эндотелия и вариабельности генов-кандидатов для прогноза у больных острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST : дис. ... канд. мед. наук / Е.С. Южно. — Кемерово, 2015. — 210 с.

39. Клініко-прогностична роль ендотеліальної дисфункції та поліморфних варіантів гена ендотеліальної NO-синтази при хронічній серцевій недостатності / Л.Г. Воронков, І.Д. Мазур, Н.Г. Горовенко [и др.] // Український кардіологічний журнал. — 2015. — № 2. — С. 55–62.
40. A>308G and -1031T>C tumor necrosis factor gene polymorphisms in Tunisian patients with coronary artery disease / L. Ghazouani, S.B. Khalifa, N. Abboud [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. — 2009. — Vol. 47, N 10. — P. 1247–1251.
41. Age and gender differences in the influences of eNOS T-786C polymorphism on arteriosclerotic parameters in general population in Japan / M. Hashimoto [et al.] // Environ Health Prev Med. — 2016. — Vol. 21(4). — P. 274–282
42. A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer / J. Shen, R.T. Wang, L.W. Wang [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2004. — Vol. 22, N 5. — P. 3278–3283.
43. A polymorphism (G894T) in eNOS increases the risk of coronary atherosclerosis rather than intracranial atherosclerosis in Koreans / B.W. Min, J.Y. Na, S.W. Juhng [et al.] // Acta Neurol. Belg. — 2010. — Vol. 110, N 3. — P. 255–262.
44. ABCB1 C3435T polymorphism and the risk of ischemic heart disease: a meta-analysis / Q. Wang, Y.Z. Jin, S.B. Zhou [et al.] // Genet. Test. Mol. Biomarkers. — 2014. — Vol. 18, N 9. — P. 636–645.
45. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)>Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase / T.A. Fairchild, D. Fulton, J.T. Fontana [et al.] // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276, N 28. — P. 26674–26679.
46. Agema, W.R. A meta-analysis of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and restenosis after percutaneous transluminal coronary revascularization: evidence for publication bias / W.R. Agema, J.W. Jukema, A.H. Zwinderman // Am. Heart J. — 2002. — Vol. 144, N 5. — P. 760–768.
47. Alderton, W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles // Biochem. J. — 2001. — Vol. 357, Pt. 3. — P. 593–615.

48. Allelic polymorphism in the promoter (T-->C), but not in exon 7 (G-->T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population / V.E. Dosenko, V.Y. Zagoriy, Y.M. Lutay [et al.] // *Exp. Clin. Cardiol.* — 2006. — Vol. 11, N 1. — P. 11–13.
49. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: Three well-characterized polymorphisms with ischemic stroke / Y.S. Yao, W.W. Chang, Y.L. Jin [et al.] // *Gene.* — 2013. — Vol. 528, N 2. — P. 84–92.
50. Analysis of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with cardiovascular diseases in eastern Taiwan / N.T. Lin, M.J. Lee, R.P. Lee et al. // *Chin. J. Physiol.* — 2008. — Vol. 51, N 1. — P. 42–47.
51. Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model / N. Beohar, J.D. Flaherty, C.J. Davidson [et al.] // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109, N 1. — P. 108–113.
52. Association of Nitric Oxide Levels and Endothelial Nitric Oxide Synthase G894T Polymorphism with Coronary Artery Disease in the Iranian Population / K. Mahmoodi [et al.] // *Vascular Specialist International.* — 2016. — Vol. 32(3). — P. 105–112.
53. Association of Nitric Oxide Levels and Endothelial Nitric Oxide Synthase G894T Polymorphism with Coronary Artery Disease in the Iranian Population / K. Mahmoodi [et al.] // *Vascular Specialist International.* — 2016. — Vol. 32(3). — P. 105–112.
54. Association between 894G>T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and metabolic syndrome / J.C. Piccoli, M.G. Gottlieb, L. Castro [et al.] // *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* — 2008. — Vol. 52, N 8. — P. 1367–1373.
55. Association between polymorphisms of eNOS and GPx-1 genes, activity of free-radical processes and in-stent restenosis / Y.A. Shuvalova, A.I. Kaminyi, A.N. Meshkov [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* — 2012. — Vol. 370, N 1-2. — P. 241–249.

56. Association between the — 786T>C 1polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis / D. Liu, Z. Jiang, L. Dai [et al.] // *Gene*. — 2017. — Vol. 545, N 1. — P. 175–183.

57. Association between the endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and coronary heart disease: a meta-analysis of 39 case-control studies / G.X. Tian, X.T. Zeng, X.B. Wang [et al.] // *Mol. Med. Rep.* — 2013. — Vol. 7, N 4. — P. 1310–1318.

58. Association of a genetic variant of endothelial nitric oxide synthase with the 1 year clinical outcome after coronary stent placement / O. Gorchakova, W. Koch, N. von Beckerath [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2003. — Vol. 24, N 9. — P. 820–827.

59. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis / C. Antoniades, C. Shirodaria, P. Leeson [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2009. — Vol. 30, N 9. — P. 1142–1150.

60. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction [Electronic resource] / G.K. Andrikopoulos, D.K. Grammatopoulos, S.E. Tzeis [et al.] // *BMC Med. Genet.* — 2008. — Vol. 9. — URL: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-9-43>.

61. Association of the eNOS E298D polymorphism and the risk of myocardial infarction in the Greek population / C. Dafni, N. Drakoulis, O. Landt [et al.] // *BMC Med. Genet.* — 2010. — Vol. 11. — P. 133–134.

62. Athappan, G. Clinical outcomes of dialysis patients after implantation of DES: meta-analysis and systematic review of literature / G. Athappan, T. Ponniah // *Minerva Cardioangiol.* — 2009. — Vol. 57, N 3. — P. 291–297.

63. Belmont, J.W. Complex phenotypes and complex genetics: an introduction to genetic studies of complex traits / J.W. Belmont, S.M. Leal // *Curr. Atheroscler. Rep.* — 2005. — Vol. 7, N 3. — P. 180–187.

64. Beta-fibrinogen gene promoter A -455 allele associated with poor longterm survival among 55-71 years old Caucasian women in Finnish stroke cohort [Electronic resource] / M. Martiskainen, N. Oksala, T. Pohjasvaara [et al.] // *BMC Neurol.* — 2014. — Vol. 14. — URL: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-14-137>.
65. Byrne, R.A. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going / R.A. Byrne, M. Joner, A. Kastrati // *European Heart Journal.* — 2015. — Vol. 36, N 47. — P. 3320–3331.
66. Candidate genetic markers and the risk of restenosis after coronary angioplasty / H. Volzke, R. Grimm, D.M. Robinson [et al.] // *Clin. Sci. (Lond).* — 2004. — Vol. 106. — P. 35–42.
67. Clinical and angiographic outcomes of diabetic patients after coronary stenting: a comparison of native vessel stent restenosis rates in different diabetic subgroups / G. Heper, T. Durmaz, S.N. Murat [et al.] // *Angiology.* — 2016. — Vol. 53, N 3. — P. 287–295.
68. Clinical, angiographic, and procedural predictors of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in complex patients: an evaluation from the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) study / P.A. Lemos, A. Hoye, D. Goedhart [et al.] // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109, N 11. — P. 1366–1370.
69. Common NOS1AP variants are associated with a prolonged QTc interval in the Rotterdam Study / A.J. Aarnoudse, C. Newton-Cheh, P.I. de Bakker [et al.] // *Circulation.* — 2007. — Vol. 116. — P. 10–16.
70. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: A randomized controlled trial / G.W. Stone, S.G. Ellis, L. Cannon [et al.] // *JAMA.* — 2005. — Vol. 294. — P. 1215–1223.
71. Comparison of restenosis rate with sirolimus-eluting stent in STEMI patients with and without diabetes at 6-month angiographic follow-up / S. Ma, D. Yang, X. Zhang [et al.] // *Acta Cardiol.* — 2011. — Vol. 66, N 5. — P. 603–606.

72. Cooke, J.P. Does leptin cause vascular disease? / J.P. Cooke, R.K. Oka // *Circulation*. — 2002. — Vol. 106. — P. 1904–1905.
73. Current status and outcomes of coronary revascularization 1999 to 2002: 148,396 surgical and percutaneous procedures / M.J. Mack, P.P. Brown, A.D. Kugelmass [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* — 2004. — Vol. 77, N 6. — P. 761–766.
74. Current treatment of in-stent restenosis / F. Alfonso, R.A. Byrne, F. Rivero [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2014. — Vol. 63, N 24. — P. 2659–2673.
75. Cytochrome P450 2C19*2 polymorphism in patients with stable coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular disease events: results of a long-term follow-up study in routine clinical care [Electronic resource] / D. Rothenbacher, M.M. Hoffmann, L.P. Breitling [et al.] // *BMC Cardiovasc. Disord.* — 2013. — Vol. 13. — URL: <http://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2261-13-61>.
76. Daff, S. NO synthase: structures and mechanisms / S. Daff // *Nitric. Oxide*. — 2010. — Vol. 23, N 1. — P. 1–11.
77. Davignon, J. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis / J. Davignon, P. Ganz // *Circulation*. — 2004. — Vol. 109, N 23, Suppl. 1. — P. 27–32.
78. Dai X. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction / X. Dai, S. Wiernek, J.P. Evans [et al.] // *World J Cardiol.* — 2016. — Vol. 8 (1). — P. 11–23.
79. Doshi, A.A. A promoter polymorphism of endothelial nitric oxide synthase is associated with reduced mRNA and protein expression in failure human myocardium / A.A. Doshi, M.T. Ziolo // *J. Card. Fail.* — 2010. — Vol. 16, N 4. — P. 314–319.
80. Early hypercholesterolemia contributes to vasomotor dysfunction and injury associated atherogenesis that can be inhibited by nitric oxide / K.G. Raman, R.E. Gandley, J. Rohland [et al.] // *J. Vasc. Surg.* — 2011. — Vol. 53, N 3. — P. 754–763.
81. Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression / M.X. Zhang, C. Zhang, Y.H. Shen [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* — 2008. — Vol. 19, N 9. — P. 399–410.

82. Effect of cytochrome P450 2C19 polymorphism on target lesion outcome after drug-eluting stent implantation in Japanese patients receiving clopidogrel / R. Nishio, T. Shinke, H. Otake [et al.] // *Circ. J.* — 2012. — Vol. 76. — P. 2348–2355.

83. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene on the risk of ischemic heart disease and is-chemic stroke: a meta-analysis / T.V. Pereira, M. Rudnicki, R.F. Franco [et al.] // *Am. Heart J.* — 2007. — Vol. 153. — P. 821–830.

84. Endothelial dysfunction and restenosis following percutaneous coronary intervention / P. Thanyasiri, K. Kathir, D.S. Celermajer [et al.] // *Int. J. Cardiol.* — 2007. — Vol. 119. — P. 362–367.

85. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis / M. Mudau, A. Genis, A. Lochner [et al.] // *Cardiovasc. J. Afr.* — 2012. — Vol. 23, N 4. — P. 222–231.

86. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 4b/a gene polymorphisms and coronary artery disease: evidence from a meta-analysis / Y. Yang, K. Du, Z. Liu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2014. — Vol. 15, N 5. — P. 7987–8003.

87. Endothelial nitric oxide synthase (G894T) gene polymorphism in a random sample of the Egyptian population: comparison with myocardial infarction patients / M.Z. Gad, M.F. Abdel Rahman, I.M. Hashad [et al.] // *Genet. Test Mol. Biomarkers.* — 2012. — Vol. 16, N 7. — P. 695–700.

88. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in patients with coronary artery disease / S. Salimi, M. Cesari, M. Zanchetta [et al.] // *Ann. Saudi Med.* — 2010. — Vol. 30, N 1. — P. 33–37.

89. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects / I.F. Metzger, M.H. Ishizawa, F. Rios-Santos [et al.] // *Pharmacogenomics J.* — 2011. — Vol. 11, N 6. — C. 393–399.

90. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran / S. Salimi, M. Cesari, M. Zanchetta [et al.] // *Indian J. Med. Res.* — 2006. — Vol. 124, N 6. — P. 683–688.

91. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and diabetes mellitus (type II) among South Indians [Electronic resource] / T. Angeline, H.R. Krithiga, W. Isabel [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* — 2011. — Vol. 2011. — URL:<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2011/462607>.

92. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (894G > T and -786T>C) and risk of coronary artery disease in a Saudi population / K.M. Alkharfy, N.M. Al-Daghri, O.S. Al-Attas [et al.] // *Arch. Med. Res.* — 2010. — Vol. 41, N 2. — P. 134–141.

93. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and essential hypertension in Han Chinese / H.G. Wang, J.L. Wang, P. Chang [et al.] // *Genet. Mol. Res.* — 2010. — Vol. 9, N 3. — P. 1896–1907.

94. Endothelial nitric oxide synthase intron 4a/b polymorphism in coronary artery disease in Thrace region of Turkey / N. Sivri, I.S. Farooqi, T.J. Cole [et al.] // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* — 2014. — Vol. 28, N 6. — P. 1115–1120.

95. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism G298T in association with oxidative DNA damage in coronary atherosclerosis / R.G. Kumar, M.K. Spurthi, K.G. Kumar [et al.] // *J. Genet.* — 2012. — Vol. 91, N 3. — P. 349–352.

96. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome / L.D. Monti, C. Barlassina, L. Citterio [et al.] // *Diabetes.* — 2003. — Vol. 52, N 6. — P. 1270–1275.

97. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment / J.W. Knowles, R.L. Reddick, J.C. Jennette [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 105, N 4. — P. 451–458.

98. eNOS gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey / S. Matyar, G. Attila, E. Acartürk [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2005. — Vol. 354, N 1-2. — P. 153–158.

99. ENOS-G894T polymorphism is a risk factor for essential hypertension in China / C. Men, K. Tang, G. Lin [et al.] // *Indian J. Biochem. Biophys.* — 2011. — Vol. 48, N 3. — P. 154–157.

100. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells / A. Aicher, C. Heeschen, C. Mildner-Rihm [et al.] // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9, N 11. — P. 1370–1376.

101. Fleissner, F. Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction / F. Fleissner, T. Thum // *Antioxid Redox Signal.* — 2011. — Vol. 15, N 4. — P. 933–1048.

102. Fleming, I. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase [Electronic resource] / I. Fleming, R. Busse // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2003. — Vol. 284, N 1. — URL: <http://ajpregu.physiology.org/content/284/1/R1.long>.

103. Forconi, S. Endothelium and hemorheology / S. Forconi, T. Gori // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* — 2017. — Vol. 53, N 1-2. — P. 3–10.

104. Förstermann, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease / U. Förstermann // *Pflugers. Arch.* — 2010. — Vol. 459, N 6. — P. 923–939.

105. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W.C. Sessa // *Eur. Heart J.* — 2012. — Vol. 33, N 7. — P. 829–837.

106. Free radical biology of the cardiovascular system / A.F. Chen, D.D. Chen, A. Daiber [et al.] // *Clin. Sci. (Lond.)*. — 2012. — Vol. 123, N 2. — P. 73–91.

107. From endothelial dysfunction to atherosclerosis / S. Sitia, L. Tomasoni, F. Atzeni [et al.] // *Autoimmun. Rev.* — 2010. — Vol. 9, N 12. — P. 830–834.

108. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease / N. Jeerooburkhan, L.C. Jones, S. Bujac [et al.] // *Hypertension.* — 2001. — Vol. 38, N 5. — P. 1054–1061.

109. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice / P.J. Kuhlencordt, J. Chen, F. Han [et al.] // *Circulation.* — 2001. — Vol. 103, N 5. — P. 3104–3109.

110. Genetic polymorphism G894T and the prognosis of heart failure outpatients / O.M. Tardin, S.B. Pereira, M.W. Velloso [et al.] // *Arq. Bras. Cardiol.* — 2013. — Vol. 101, N 4. — P. 352–358.

111. Genetic polymorphism of angiotensin converting enzyme and risk of coronary restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasties: evidence from 33 cohort studies [Electronic resource] / S. Wang, Y. Dai, L. Chen [et al.] // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, N 9. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3787085>.

112. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction / C. Antoniades, D. Tousoulis, C. Vasiliadou [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2005. — Vol. 46, N 6. — P. 1101–1109.

113. Genetic risk factors and restenosis after percutaneous coronary interventions / A. Kastrati, J. Dirschinger, A. Schömig [et al.] // Herz. — 2000. — Vol. 25, N 1. — P. 34–46.

114. Genetic risk for restenosis after coronary stenting / M. Oguri, K. Kato, T. Hibino [et al.] // Atherosclerosis. — 2007. — Vol. 194, N 2. — P. 172–178.

115. Genetic Risk Score of NOS Gene Variants Associated with Myocardial Infarction Correlates with Coronary Incidence across Europe [Electronic resource] / R. Carreras-Torres, S. Kundu, D. Zanetti [et al.] // PLoS One. — 2014.— Vol. 9, N 5. — URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013019>.

116. Genetic variations in nitric oxide synthase 1 adaptor protein are associated with sudden cardiac death in US white community-based populations / W.H. Kao, D.E. Arking, W. Post [et al.] // Circulation. — 2009. — Vol. 119, N 7. — P. 940–951.

117. Gondo K. Is a Bare-Metal Stent Still Useful for Improving the Outcome of Percutaneous Coronary Intervention? From the FU-Registry / K. Gondo, A. Ike, M. Ogawa [et al.] // J. Cardiol. — 2016. — Vol. 69(4). — P. 652–659.

118. Gu, G. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats / G. Gu, C.Q. Wang, H. Fan // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 2006. — Vol. 47, N 5. — P. 711–721.

119. Guo, S.W. Genetic mapping of complex traits: promises, problems, and prospects / S.W. Guo, K. Lange // Theor. Popul. Biol. — 2000. — Vol. 57, N 1. — P. 1–11.

120. Han, R.N. Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice / R.N. Han, D.J. Stewart // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2006. — Vol. 16, N 5. — P. 29–34.

121. Heart disease and stroke statistics-2014 update: A report from the American Heart Association / A. Go, D. Mozaffarian, V. Roger [et al.] // *Circulation.* — 2014. — Vol. 129, N 3. — P. e288–e292.

122. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis / M. Sata, A. Saiura, A. Kunisato [et al.] // *Nat. Med.* — 2002. — Vol. 8. — P. 403–409.

123. Ikeda, U. Interleukin-6 and acute coronary syndrome / U. Ikeda, T. Ito, K. Shimada // *Clin. Cardiol.* — 2001. — Vol. 24, N 3. — P. 701–704.

124. Impact of chronic kidney disease on a re-percutaneous coronary intervention for sirolimus-eluting stent restenosis / Y. Aoyama, H. Hirayama, H. Ishii [et al.] // *Coron. Artery Dis.* — 2012. — Vol. 23, N 8. — P. 528–532.

125. Impaired flow-mediated dilation and risk of restenosis in patients undergoing coronary stent implantation / G. Patti, V. Pasceri, R. Melfi [et al.] // *Circulation.* — 2005. — Vol. 11, N 1. — P. 70–75.

126. Impact of obesity and nitric oxide synthase gene G894T polymorphism on essential hypertension / M. Wrzosek [et al.] // *J Physiol Pharmacol.* — 2015. — Vol. 66(5). — P. 681–689.

127. Incidence and predictors of restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in high-risk patients / A. Berenguer, V. Mainar, P. Bordes [et al.] // *Am. Heart J.* — 2005. — Vol. 150. — P. 536–542.

128. Increased expression and co-localization of ACE, angiotensin II AT(1) receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries / M. Ohishi, G.J. Dusting, P.A. Fennessy [et al.] // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* — 2010. — Vol. 2, N 2. — P. 111–124.

129. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in atherectomy specimens from patients with restenosis after percutaneous transluminal coronary

angioplasty / S. Hokimoto, Y. Oike, T. Saito [et al.] // *Circ. J.* — 2012. — Vol. 66, N 7. — P. 114–116.

130. Inflammation and apoptosis genes and the risk of restenosis after percutaneous coronary intervention / P.S. Monraats, F. De Vries, L.W. de Jong [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics.* — 2006. — Vol. 16, N 10. — P. 747–754.

131. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease / I.J. Kim, J. Bae, S.W. Lim [et al.] // *Thromb. Res.* — 2007. — Vol. 119, N 5. — P. 579–585.

132. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? / A. Singhal, I.S. Farooqi, T.J. Cole [et al.] // *Circulation.* — 2002. — Vol. 106, N 15. — P. 1919–1924.

133. Influence of nitric oxide synthase gene polymorphisms on the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis / M.A. Gonzalez-Gay, J. Llorca, R. Palomino-Morales [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* — 2009. — Vol. 27, N 1. — P. 116–119.

134. Inhibiting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease: promising evidence from rodent models [Electronic resource] / A.J. Szalai, M.A. McCrory, D. Xing [et al.] // *Mediators Inflamm.* — 2014. — Vol. 2014. — URL: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/353614>.

135. Interaction between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 894G>T and intron 4 a/b) and cardiovascular risk factors in acute coronary syndromes / J. Da Costa Escobar Piccoli, V. Manfredini, F.I. Hamester [et al.] // *Arch. Med. Res.* — 2012. — Vol. 43, N 3. — P. 205–211.

136. Interleukin-6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis / Y. Hojo, U. Ikeda, T. Katsuki [et al.] // *Heart.* — 2000. — Vol. 84, N 4. — P. 83–87.

137. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298 / M. Tesauro, W.C. Thompson,

P. Rogliani [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97, N 6. — P. 2832–2835.

138. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury / N. Werner, S. Junk, U. Laufs [et al.] // *Circ. Res.* — 2003. — Vol. 93, N 2. — P. e17–e24.

139. Is polymorphism within eNOS gene associated with the late onset of myocardial infarction? A pilot study / A. Gluba, M. Banach, J. Rysz [et al.] // *Angiology.* — 2009. — Vol. 60, N 5. — P. 588–595.

140. Kang, S.J. Mechanisms of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation: intravascular ultrasound analysis / S.J. Kang, G.S. Mintz, D.W. Park // *Circ. Cardiovasc. Interv.* — 2011. — Vol. 4, N 1. — P. 9–14.

141. Kibos, A. Pathophysiology of coronary artery in-stent restenosis / A. Kibos, A. Campeanu, I. Tintoiu // *Acute Card. Care.* — 2007. — Vol. 9, N 2. — P. 111–119.

142. Kim, M.S. In-stent restenosis / M.S. Kim, L.S. Dean // *Cardiovasc. Ther.* — 2011. — Vol. 29, N 3. — P. 190–198.

143. Kolh, P. Essential messages from the ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization / P. Kolh, W. Wijns // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* — 2012. — Vol. 41, N 5. — P. 983–985.

144. Lack of association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of premature coronary artery disease in the Greek population / M. Vasilakou, V. Votteas, C. Kasparian [et al.] // *Acta Cardiol.* — 2008. — Vol. 63, N 5. — P. 609–614.

145. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population / B. Granath, R.R. Taylor, F.M. van Bockxmeer [et al.] // *J. Cardiovasc. Risk.* — 2001. — Vol. 8, N 4. — P. 235–241.

146. Leptin and vascular smooth muscle cells / M. Trovati, G. Doronzo, C. Barale [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* — 2016. — Vol. 85. — P. 342–346.

147. Leptin-enhanced neointimal hyperplasia is reduced by mTOR and PI3K inhibitors / J. Shan, T.B. Nguyen, H. Totary-Jain [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — Vol. 105, N 48. — P. 19006–19011.

148. Lerman, A. Restenosis: another "dysfunction" of the endothelium / A. Lerman // *Circulation*. — 2005. — Vol. 111, N 1. — P. 8–10.

149. Lesser, I.A. Association between exercise-induced change in body composition and change in cardiometabolic risk factors in postmenopausal South Asian women / I.A. Lesser // *Appl Physiol Nutr Metab*. — 2016. — Vol. 41 (9) . — P. 931–937.

150. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury [Electronic resource] / F.G. Welt, C. Tso, E.R. Edelman [et al.] // *Vasc. Med.* — 2003. — Vol. 8, N 1. — URL: <http://vmj.sagepub.com/content/8/1/1.long>.

151. Li, X.J. Association between clopidogrel resistance and polymorphism of platelet adenosine diphosphate receptor in patients with coronary atherosclerotic disease / X.J. Li, X.M. Chen // *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. — 2014. — Vol. 43, N 3. — P. 333–338.

152. Li, H. Structure-function studies on nitric oxide synthases / H. Li, T.L. Poulos // *J. Inorg. Biochem.* — 2005. — Vol. 99, N 1. — P. 293–305.

153. Li, Y.Y. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis involving 11,248 subjects / Y.Y. Li // *Intern. Med.* — 2011. — Vol. 50, N 19. — P. 2066–2069.

154. Libby, P. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans / P. Libby, A.H. Lichtman, G.K. Hansson // *Immunity*. — 2013. — Vol. 38, N 6. — P. 1092–1094.

155. Libby, P. Inflammation and thrombosis: the clot thickens / P. Libby, D.I. Simon // *Circulation*. — 2001. — Vol. 103, N 1. — P. 1718–1720.

156. Lirk, P. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal / P. Lirk, G. Hoffmann, J. Rieder // *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy*. — 2002. — Vol. 1, N 1. — P. 89–108.

157. Liu, W. Plasma levels of interleukin 18, interleukin 10, and matrix metalloproteinase-9 and -137G/C polymorphism of interleukin 18 are associated with incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention / W. Liu, Y. Liu, H. Jiang [et al.] // *Inflammation*. — 2013. — Vol. 36, N 5. — P. 1129–1135.

158. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice / M. Drab, P. Verkade, M. Elger [et al.] // *Science*. — 2001. — Vol. 293. — P. 2449–2452.

159. Lowenstein, C.J. Beneficial effects of neuronal nitric oxide synthase in atherosclerosis / C.J. Lowenstein // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26, N 7. — P. 1417–1418.

160. Maffia, P. Beneficial Effects of NO-releasing derivative of flurbiprofen (HCT-1026) in rat model of vascular injury and restenosis / P. Maffia, A. Ianaro, R. Sorrentino // *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2002. — Vol. 22, N 3. — P. 263–267.

161. Marsh, N. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology / N. Marsh, A. Marsh // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2000. — Vol. 27, N 4. — P. 313–319.

162. Marx, S.O. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis / S.O. Marx, H. Totary-Jain, A.R. Marks // *Circ. Cardiovasc. Interv.* — 2011. — Vol. 4, N 1. — P. 104–111.

163. McDonald, D.M. Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial cells / D.M. McDonald, N.J. Alp, K.M. Channon // *Pharmacogenetics*. — 2004. — Vol. 14. — P. 831–839.

164. Mel De, A. Nitric oxide: a guardian for vascular grafts? / A. De Mel, F. Murad, A.M. Seifalian // *Chem. Rev.* — 2011. — Vol. 111, N 9. — P. 5742–5767.

165. Metabolic background determines the importance of NOS3 polymorphisms in restenosis after percutaneous coronary intervention: A study in patients with and without the metabolic syndrome / D. Pons, P.S. Monraats, M.P. de Maat [et al.] // *Dis. Markers*. — 2009. — Vol. 26, N 2. — P. 75–83.

166. Minha, S. In-stent restenosis of drug-eluting stents / S. Minha, A.D. Pichard, R. Waksman // *Future Cardiol.* — 2013. — Vol. 9, N 5. — P. 721–731.

167. Mitra, A.K. In stent restenosis: bane of the stent era / A.K. Mitra, D.K. Agrawal // *J. Clin. Pathol.* — 2006. — Vol. 59, N 3. — P. 232–239.

168. Monraats, P.S. Genetic predictive factors in restenosis / P.S. Monraats, W. Agema, J.W. Jukema // *Pathol. Biol. (Paris)*. — 2004. — Vol. 52, N 4. — P. 186–195.

169. Morbidelli, L. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis / L. Morbidelli, S. Donnini, M. Ziche // *Curr. Pharm. Des.* — 2003. — Vol. 9, N 3. — P. 521–530.

170. Multi-locus interactions predict risk for post-PTCA restenosis: an approach to the genetic analysis of common complex disease / R.Y. Zee, J. Hoh, W.W. Chang [et al.] // *Pharmacogenomics J.* — 2002. — Vol. 2, N 3. — P. 197–201.

171. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation / N. Melikian, M.D. Seddon, B. Casadei [et al.] // *Trends. Cardiovasc. Med.* — 2009. — Vol. 19, N 3. — P. 256–262.

172. Newton-Cheh, C. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues / C. Newton-Cheh, J.N. Hirschhorn // *Mutat. Res.* — 2005. — Vol. 573, N 1-2. — P. 54–69.

173. Nitric oxide synthase (NOS) single nucleotide polymorphisms are associated with coronary heart disease and hypertension in the INTERGENE study / A. Levinsson, A. Olin, L. Björck [et al.] // *Nitric. Oxide.* — 2014. — Vol. 30, N 39. — P. 1–7.

174. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension / E. Schulz, T. Jansen, P. Wenzel [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* — 2008. — Vol. 10, N 6. — P. 1115–1126.

175. Niu, W. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension / W. Niu, Y. Qi // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6, N 9. — P. 242–266.

176. No predictive value of serum interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in identifying patients with a first restenosis, recurrent restenosis or a history of

restenosis / B. Hudzik, J. Szkodzinski, W. Romanowski [et al.] // *Eur. Cytokine Netw.* — 2009. — Vol. 20, N 3. — P. 135–139.

177. Nwaneri, C. Mortality in type 2 diabetes mellitus: magnitude of the evidence from a systematic review and meta-analysis / C. Nwaneri, H. Cooper, D. Bowen-Jones // *British Journal of Diabetes & Vascular Disease.* — 2013. — Vol. 13, N 4. — P. 192–207.

178. Orlandi, A. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease / A. Orlandi, M. Bennett // *Biochem. Pharmacol.* — 2010. — Vol. 79, N 6. — P. 1706–1713.

179. Outcomes in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention in the current era: A report from the Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial / V. Mathew, B.J. Gersh, B.A. Williams [et al.] // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109. — P. 476–480.

180. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension / U. Landmesser, S. Dikalov, S.R. Price [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111, N 8. — P. 1201–1209.

181. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease / S. Chrissobolis, A.A. Miller, G.R. Drummond [et al.] // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. — 2011. — Vol. 16. — P. 1733–1745.

182. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions / R.P. Juni, H.J. Duckers, P.M. Vanhoutte [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2016. — Vol. 61, N 14. — P. 1471–1478.

183. Oxidative stress is associated with genetic polymorphisms in one-carbon metabolism in coronary artery disease / S. Lakshmi, S. Naushad, D. Rao [et al.] // *Cell. Biochem. Biophys.* — 2013. — Vol. 67, N 2. — P. 353–361.

184. P27 and P53 gene polymorphisms and restenosis following coronary implantation of drug-eluting stents / K. Tiroch, W. Koch, J. Mehilli [et al.] // *Cardiology.* — 2009. — Vol. 12, N 4. — P. 263–269.

185. Petrovic, D. Genetic markers of restenosis after coronary angioplasty and after stent implantation / D. Petrovic, B. Peterlin // *Med. Sci. Monit.* — 2005. — Vol. 11, N 4. — P. 127–135.

186. Plasma asymmetric dimethylarginine predicts restenosis after coronary angioplasty / A. Derkacz, M. Protasiewicz, R. Poręba [et al.] // *Arch. Med. Sci.* — 2016. — Vol. 7, N 3. — P. 444–448.

187. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes / M.P. Reilly, N. Iqbal, M. Schutta [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 89. — P. 3872–3878.

188. Plasma levels of C-reactive protein and interleukin-10 predict late coronary in-stent restenosis 6 months after elective stenting / A. Zurakowski, W. Wojakowski, T. Dzielski [et al.] // *Kardiol. Pol.* — 2009. — Vol. 67, N 6. — P. 623–630.

189. Platelet glycoprotein IIIA P1A1/A2 polymorphism in young patients with ST elevation myocardial infarction and idiopathic ischemic stroke / B.E. Rivera-García, J.C. Esparza-García, J.L. Aceves-Chimal [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* — 2013. — Vol. 384, N 1-2. — P. 163–171.

190. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis / N.C. Martinelli, K.G. Santos, A. Biolo [et al.] // *Nitric Oxide.* — 2012. — Vol. 26, N 3. — P. 141–147.

191. Polymorphisms of the NOS3 gene in Southern Chilean subjects with coronary artery disease and controls / P.C. Jaramillo, C. Lanás, F. Lanás [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2010. — Vol. 411, N 3-4. — P. 258–262.

192. Predictors of angiographic restenosis after drug eluting stents in the coronary arteries: Contemporary practice in real world patients / S. Rathore, M. Terashima, O. Katoh [et al.] // *EuroIntervention.* — 2009. — Vol. 5. — P. 349–354.

193. Pre-procedural plasma levels of C-reactive protein and interleukin-6 do not predict late coronary angiographic restenosis after elective stenting / A. Segev, S. Kassam, C.E. Buller [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2004. — Vol. 25, N 12. — P. 1029–1035.

194. Prevalence of endothelial nitric oxide synthase E298D polymorphism in Turkish patients with essential hypertension / F.E. Kayhan, M. Koldemir, P. Cagatay [et al.] // *Diabetes Metab. Syndr.* — 2016. — Vol. 7, N 1. — P. 12–16.

195. Pevsner Jonathan *Bioinformatics and Functional Genomics* . — 2013. — P. 325.

196. Qidwai, T. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence / T. Qidwai, F. Jamal // *Scand. J. Immunol.* — 2010. — Vol. 72, N 5. — P. 375–387.

197. Rahimi, Z. Association of endothelial nitric oxide synthase gene variant (G894T) with coronary artery disease in Western Iran / Z. Rahimi, R. Nourozi-Rad // *Angiology.* — 2012. — Vol. 63, N 2. — P. 131–137.

198. Raised interleukin 6 concentrations as a predictor of postangioplasty restenosis [Electronic resource] / T. Suzuki, S. Ishiwata, K. Hasegawa [et al.] // *Heart.* — 2000. — Vol. 83, N 5. — URL: <http://heart.bmj.com/content/83/5/578.long>.

199. Raju, T.N. The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936) / T.N. Raju // *Lancet.* — 2000. — Vol. 356, N 9226. — P. 346.

200. Reduction of in-stent restenosis risk on nickel-free stainless steel by regulating cell apoptosis and cell cycle / L. Li, S. Pan, X. Zhou [et al.] // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8, N 4. — P. 621–693.

201. Redwood, S.R. The Year in Cardiology 2012: coronary intervention / S.R. Redwood // *Eur. Heart J.* — 2013. — Vol. 34, N 5. — P. 338–344.

202. Relation of the Glu298Asp polymorphism of the nitric oxide synthase gene to hypertension and serum cholesterol in Japanese workers / T. Sawada, T. Kishimoto, Y. Osaki [et al.] // *Prev. Med.* — 2008. — Vol. 47, N 2. — P. 167–169.

203. Relationship between the G894T polymorphism (Glu298Asp variant) in endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated endothelial function in human atherosclerosis / T.J. Guzik, E. Black, N.E. West [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 100. — P. 130–137.

204. Relationship of interleukin-10 gene polymorphism with restenosis after percutaneous coronary intervention in Chinese / J. Gao, R.Z. Cui, Y.M. Mao [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. — 2011. — Vol. 28, N 1. — P. 42–46.

205. Renin-angiotensin system gene polymorphisms among Saudi patients with coronary artery disease / A. Al-Hazzani, M.S. Daoud, F.S. Ataya [et al.] // *J. Biol. Res. (Thessalon)*. — 2014. — Vol. 21, N 1. — URL: <http://jbiolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/2241-5793-21-8>.

206. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina / Y. Miyamoto, Y. Saito, M. Nakayama [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 2000. — Vol. 9, N 18. — P. 2629–2637.

207. Restenosis after percutaneous coronary intervention is associated with the angiotensin-II type-1 receptor 1166A/C polymorphism but not with polymorphisms of angiotensin-converting enzyme, angiotensin-II receptor, angiotensinogen or heme oxygenase-1 / J.S. Wijpkema, P.L. van Haelst, P.S. Monraats [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. — 2006. — Vol. 16, N 5. — P. 331–337.

208. Resveratrol inhibits neointimal formation after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism / D.M. Breen, V.W. Dolinsky, H. Zhang [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2012. — Vol. 222, N 2. — P. 375–381.

209. Role of cytokines in the pathogenesis of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty / H. Tashiro, H. Shimokawa, K. Sadamatsu [et al.] // *Coron. Artery Dis.* — 2001. — Vol. 12. — P. 107–113.

210. Role of TNF- α in vascular dysfunction / H. Zhang, Y. Park, J. Wu [et al.] // *Clin. Sci.* — 2009. — Vol. 116. — P. 219–230.

211. Saleh, N. Relevance of genetic polymorphisms in inflammatory response to percutaneous coronary intervention / N. Saleh, A. Kovacs, P. Tornvall // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 2009. — Vol. 69, N 7. — P. 736–740.

212. Serum concentrations of MCP-1 and IL-6 in combination predict the presence of coronary artery disease and mortality in subjects undergoing coronary

angiography [Electronic resource] / M. Tajfard [et al.] // *Mol Cell Biochem.* — 2017. — Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28534120>.

213. Schwartz, R.S. Pathophysiology of coronary artery restenosis / R.S. Schwartz, T.D. Henry // *Rev. Cardiovasc. Med.* — 2002. — Vol. 3, N 5. — P. 4–9.

214. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function / C.A. Chen, T.Y. Wang, S. Varadharaj [et al.] // *Nature.* — 2010. — Vol. 468. — P. 1115–1118.

215. Sinici, I. Distribution of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish population / I. Sinici, S. Karahan, E. Atalar // *J. Investig. Med.* — 2009. — Vol. 57, N 7. — P. 769–776.

216. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation / N.M. Caplice, T.J. Bunch, P.G. Stalboerger [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 4754–4759.

217. Stent restenosis, pathophysiology and treatment options: a 2010 update / G.G. Tsigkas, V. Karantalis, G. Hahalis [et al.] // *Hellenic. J. Cardiol.* — 2011. — Vol. 52, N 2. — P. 149–157.

218. Stenvinkel, P. Endothelial dysfunction and inflammation — is there a link? / P. Stenvinkel // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2001. — Vol. 16. — P. 1968–1971.

219. Systematic testing of literature reported genetic variation associated with coronary restenosis: results of the GENDER Study [Electronic resource] / J.J. Verschuren, S. Trompet, I. Postmus [et al.] // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, N 8. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411750>.

220. T(-786)→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with insulin resistance in patients with ischemic or non ischemic cardiomyopathy [Electronic resource] / C. Vecoli, M. Andreassi, R. Liga [et al.] // *BMC Medical Genetics.* — 2012. — Vol. 13. — URL: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-13-92>.

221. T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population /

Y. Han, W. Xu, W. Zhang [et al.] // *Pharmacology*. — 2010. — Vol. 85, N 4. — P. 211–216.

222. T-786C variation in the promoter sequence of human eNOS gene markedly influences its expression level / A.M. Elakkad [et al.] // *Drug Discov Ther.* — 2017. — Vol.11 (4). — P. 193–197.

223. Tardin, O.M. Genetic polymorphism G894T and the prognosis of heart failure outpatients / O.M. Tardin // *Arq. Bras. Cardiol.* — 2013. — Vol. 101, N 4. — P. 352–358.

224. The association of endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with C-reactive protein level and metabolic syndrome in a Chinese study group / M.C. Hsieh, J.Y. Hsiao, K.J. Tien [et al.] // *Metabolism*. — 2008. — Vol. 57, N 8. — P. 1125–1129.

225. The association of eNOS G894T polymorphism with metabolic syndrome and erectile dysfunction / Y.C. Lee, S.P. Huang, C.C. Liu [et al.] // *J. Sex. Med.* — 2012. — Vol. 9, N 3. — P. 837–843.

226. The co-existence of the IL-18+183 A/G and MMP-9 -1562 C/T polymorphisms is associated with clinical events in coronary artery disease patients / T.B. Opstad, A.Å. Pettersen, H. Arnesen [et al.] // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8, N 9. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3764212>.

227. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction [Electronic resource] / T.K. Parpugga, V. Tatarunas, V. Skipskis [et al.] // *Dis Markers*. — 2015. — Vol. 2015. — URL: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2015/260101>.

228. The effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on endothelial function and metabolic risk factors in healthy subjects: the significance of plasma adiponectin levels / A. Imamura, R. Takahashi, R. Murakami [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* — 2008. — Vol. 158, N 2. — P. 189–195.

229. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis / A.H. Gomma,

M.A. Elrayess, C.J. Knight [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2002. — Vol. 23, N 24. — P. 1955–1962.

230. The endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary artery disease: a meta-analysis / J. Li, X. Wu, X. Li [et al.] // *Cardiology.* — 2010. — Vol. 116, N 4. — P. 271–278.

231. The endothelial nitric oxide synthase T-786c mutation, a treatable etiology of Prinzmetal's angina / C.J. Glueck, A. Valdes, D. Bowe [et al.] // *Transl. Res.* — 2013. — Vol. 162, N 1. — P. 64–66.

232. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways / C.R. Triggle, S.M. Samuel, S. Ravishankar [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2012. — Vol. 90, N 6. — P. 713–738.

233. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased coronary heart disease among Asia population: evidence from a Meta analysis / K. Zhang, P. Bai, S. Shi [et al.] // *Thromb. Res.* — 2012. — Vol. 130, N 2. — P. 192–197.

234. The genetics of cardiovascular disease / C. Delles, M.W. McBride, S. Padmanabhan [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 19, N 9. — P. 309–316.

235. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis / T. Suzuki, K. Okumura, T. Sone [et al.] // *Int. J. Cardiol.* — 2002. — Vol. 86, N 1. — P. 71–76.

236. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide / B.A. Veldman, W. Spiering, P.A. Doevendans [et al.] // *J. Hypertens.* — 2002. — Vol. 20, N 10. — P. 2023–2027.

237. The influence of established genetic variation in the haemostatic system on clinical restenosis after percutaneous coronary interventions / D. Pons, P.S. Monraats, M.P. de Maat [et al.] // *Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 98, N 6. — P. 1323–1328.

238. The relationship between angiotensin converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease, and stent restenosis: the role of angiotensin converting enzyme inhibitors in stent restenosis in patients with diabetes mellitus /

S. Guneri, N. Baris, D. Aytakin [et al.] // *Int. Heart J.* — 2005. — Vol. 46, N 5. — P. 889–897.

239. The relationship between endothelial nitric oxide synthase 4a/4b gene polymorphism and premature coronary artery disease / A. Ekmekçi, K.S. Ozcan, B. Güngör [et al.] // *Acta Cardiol.* — 2013. — Vol. 68, N 5. — P. 464–468.

240. The relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786 C) and coronary artery disease in the Turkish population / B. Tangurek, N. Ozer, N. Sayar [et al.] // *Heart Vessels.* — 2006. — Vol. 21, N 5. — P. 285–290.

241. The role of interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in predicting restenosis within stented infarct-related artery / J. Szkodzinski, A. Blazelonis, K. Wilczek [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 22, N 2. — P. 493–500.

242. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study / G.P. Rossi, M. Cesari, M. Zanchetta [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2003. — Vol. 41, N 6. — P. 930–937.

243. Toda, N. Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase / N. Toda, K. Ayajiki, T. Okamura // *J. Hypertens.* — 2009. — Vol. 27. — P. 1929–1940.

244. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide / G.R. Drummond, H. Cai, M.E. Davis [et al.] // *Circ. Res.* — 2000. — Vol. 86. — P. 347–354.

245. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice / X. Gao, S. Belmadani, A. Picchi [et al.] // *Circulation.* — 2007. — Vol. 115, N 2. — P. 245–254.

246. Tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, and interleukin-10 gene polymorphisms and restenosis after coronary artery stenting / W. Koch, K. Tiroch, N. von Beckerath [et al.] // *Cytokine.* — 2003. — Vol. 24, N 4. — P. 161–171.

247. Variants of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with components of metabolic syndrome in an Arab population / K.M. Alkharfy, N.M. Al-Daghri, O.S. Al-Attas [et al.] // *Endocr. J.* — 2012. — Vol. 59, N 3. — P. 253–263.

248. Weintraub, W.S. The pathophysiology and burden of restenosis / W.S. Weintraub // *Am. J. Cardiol.* — 2007. — Vol. 100, N 5A. — P. 3K–9K.

249. Yaghoubi, A.R. T-786C single-nucleotide polymorphism (SNP) of endothelial nitric oxide synthase gene and serum level of vascular endothelial relaxant factor (VERF) in nondiabetic patients with coronary artery disease / A.R. Yaghoubi, F. Khaki-Khatibi // *African Journal of Biotechnology.* — 2012. — Vol. 93, N 11. — P. 15945–15949.

250. Yang, Z. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis / Z. Yang, X.F. Ming // *Clin. Med. Res.* — 2006. — Vol. 4, N 1. — P. 53–65.

251. Yokoyama, M. Oxidant stress and atherosclerosis / M. Yokoyama // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 4, N 2. — P. 110–115.

252. Zhou, L. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications / L. Zhou, D.Y. Zhu // *Nitric. Oxide.* — 2009. — Vol. 20, N 4. — P. 223–230.

253. Zintzaras, E. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis / E. Zintzaras, G. Kitsios, I. Stefanidis // *Hypertension.* — 2006. — Vol. 48, N 4. — P. 700–710.