

Р.Е. КАЛИНИН ¹, И.А. СУЧКОВ ², А.С. ПШЕННИКОВ ¹,
А.А. НИКИФОРОВ ¹

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России ¹,
ГУЗ «Рязанский областной клинический кардиологический диспансер» ²,
Российская Федерация

Цель. Выявить частоту мутаций по ряду генов у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

Материал и методы. В рамках гранта Президента РФ № МД-2536.2011.7. проведено обследование 42 пациентов. Первую группу (23 человека) составили пациенты со II а стадией заболевания, которые получали консервативную терапию. Вторую группу (19 человек) составили пациенты с II б-III стадией заболевания, которым проводились реконструктивные операции. Контрольная группа – 6 здоровых добровольцев.

Результаты. Выявлено, что концентрация метаболитов NO, по сравнению с NTZ, у гетерозигот и MTZ была меньше на 20-25% в независимости от группы исследования. Как показал анализ, количество пациентов HTZ по MTHFR выше, чем в контрольной группе. Гетерозиготность по данному признаку является фактором риска развития гипергомоцистеинемии, а следовательно неблагоприятного течения заболевания. Отмечено, что гетерозиготность по AGTR1 может создать благоприятные условия для развития гиперплазии интимы. Особенно это может быть выражено при сочетании полиморфизма по AGTR1 и JAK II.

Заключение. Полиморфизм по изучаемым генам играет важную роль в прогрессировании атеросклероза, развитии гиперплазии интимы и рестеноза зоны реконструкции.

Ключевые слова: атеросклероз, полиморфизм генов, дисфункция эндотелия, NO-синтаза.

Objectives. To identify the incidence of certain genes mutations in patients with obliterating atherosclerosis of the lower limbs arteries.

Methods. 42 patients were examined in terms of grant of the President of Russian Federation № MD-2536.2011.7. The first group (23 patients) included patients with stage II a disease who underwent a conservative therapy. The second group (19 patients) included patients with stage II b-III disease who underwent a reconstructive surgery. Control group included 6 healthy volunteers.

Results. It was found out that the concentration of NO metabolites comparing to the NTZ is 20-25% lower in heterozygotes and MTZ regardless of the study group. The tests showed that the number of MTHFR HTZ subjects is higher in the study groups rather than in the control group. Heterozygosity of MTHFR is a risk factor for hyperhomocysteinemia and subsequently unfavorable course of the disease. It was noticed that heterozygosity of AGTR1 might cause favorable conditions for the development of intimal hyperplasia. Such feature might be especially observed within AGTR1 and JAK II polymorphism.

Conclusions. Polymorphism of the studied genes plays an important role in progression of atherosclerosis, development of intimal hyperplasia, and restenosis of reconstruction area.

Keywords: atherosclerosis, gene polymorphism, endothelial dysfunction, NO-synthase

Введение

Значение эндотелиальной дисфункции как критерия стратификации риска облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей (ОААНК) широко обсуждается. В связи с этим, большой интерес вызывает поиск возможных детерминант развития эндотелиальной дисфункции (ЭД) у пациентов с ОААНК [1, 2, 3].

Одним из генов, роль которого в развитии ЭД и атеросклероза широко обсуждается в последние годы, является ген эндотелиальной NO-синтазы. NOS-3 участвует в синтезе NO эндотелием и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления. NO угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток, а также обладает протективным эффектом в отношении агрегации тромбоцитов, а

также ингибирует адгезию лейкоцитов к эндотелию. Все это позволяет предположить наличие связи полиморфизма гена NO-синтазы 3 типа с течением и прогрессированием атеросклероза, что было подтверждено в экспериментальных работах [2, 4, 5].

Обзор исследований полиморфных вариантов гена, кодирующего фермент метилентетрагидрофолатредуктазу (MTHFR) позволил найти связь с сосудистой патологией и ЭД. Известно, что патофизиологический механизм гипергомоцистеинемии приводит к угнетению синтеза окиси азота, нарушению вазоконстрикции, возникновению тромбов и формированию липидных бляшек [6, 7].

Среди большого числа генов - кандидатов особое внимание привлекает ген рецептора (тип 1) ангиотензина 2 (AGTR1) [8, 9, 10].

Через этот тип рецепторов опосредуется не только вазоконстрикторное действие АТ₂, но и экспрессия факторов роста и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов. Продукт гена AGTR1 обуславливает основные кардиоваскулярные эффекты АТ₂. Полиморфизм гена AGTR1 A1166C является маркером повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [11, 12]. Вариантный аллель 1166C встречается с частотой 30-40% в европейских популяциях [7, 8].

В передаче внутриклеточного сигнала от активированного AGTR1 участвуют целые семейства тирозинкиназ, основными из которых являются Янус-киназы (JAK). Семейство JAK интересно тем, что вовлекаются в процессы роста клеток гладкой мускулатуры сосудов, а также в процессы индукции ранних генов. Показано, что JAK способны активировать семейство факторов транскрипции, называемых сигнальными трансдукторами и активаторами транскрипции (STATs). Значение киназ фокального адгезивного комплекса связано с регулированием роста, формы и размера гладкомышечных клеток. Полиморфизм генов JAK немаловажен в развитии и прогрессировании атеросклероза [7, 12].

Цель исследования: выявить частоту мутаций по ряду генов у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

Материал и методы

В рамках гранта Президента РФ № МД-2536.2011.7. проведено обследование 42 пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, находившихся на лечении в клинике сосудистой хирургии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России, по определению генотипа по: термолабильному варианту A222F(677C->T) MTHFR, NOS 3, AGTR1, JAK 2. Генотип пациентов изучали методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами «SNP-экспресс» на базе центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрав-

соцразвития России.

Пациенты были разделены на 2 группы. Первую группу составили пациенты со II а стадией заболевания по классификации Покровского-Фонтена, которые получали консервативную терапию. В группу вошло 23 пациента.

Вторую группу составили пациенты с II б-III стадией заболевания по классификации Покровского-Фонтена, которым проводились реконструктивные операции. В группу вошло 19 пациентов.

Также в исследование вошло 6 здоровых добровольцев, которые составили контрольную группу.

Материалом для исследования являлась кровь пациентов, забор которой проводили до начала лечения.

Результаты и обсуждение

По изучаемым генам соотношение нормозигот (NHZ), гетерозигот (HTZ) и мутаций (MTZ) в группах сравнения было следующее (таблица 1).

Репрезентативность групп прослеживается и по генному составу: отмечается схожее соотношение гетерозигот и гомозигот исследуемых генов во всех группах.

Одним из основных генов, полиморфизм которого играет важную роль в развитии эндотелиальной дисфункции, гиперплазии интимы и прогрессировании атеросклероза, является ген NO-синтазы 3 типа. В нашем исследовании 65% пациентов первой группы, 58% пациентов второй группы были HTZ по eNOS. В контрольной группе HTZ не было (рис. 1). Количество мутаций по исследуемому гену во всех группах было сопоставимо: 26% в первой группе, 31% во второй и 33,4% в контрольной группе.

Выявлено, что концентрация метаболитов NO, по сравнению с NTZ, у гетерозигот и MTZ была меньше на 20-25% в независимости от группы исследования. Базальная секреция NO у этих пациентов была подавлена, что подтверждалось низкой концентрацией метаболитов оксида азота 3,45 мкМ – 4,01 мкМ. Ответной

Таблица

Результаты генетического анализа												
Группа	Гены											
	MTHFR			JAK 2			AGTR1			NOS 3		
	HTZ	NTZ	MTZ	HTZ	NTZ	MTZ	HTZ	NTZ	MTZ	HTZ	NTZ	MTZ
Контрольная группа	33,2	50,2	16,6	0	100	0	33,3	33,3	33,3	0	66,6	33,4
I группа	48	39	13	9	91	0	56,5	39	4,5	65	9	26
II группа	47	42	11	11	89	0	42	42	16	58	11	31

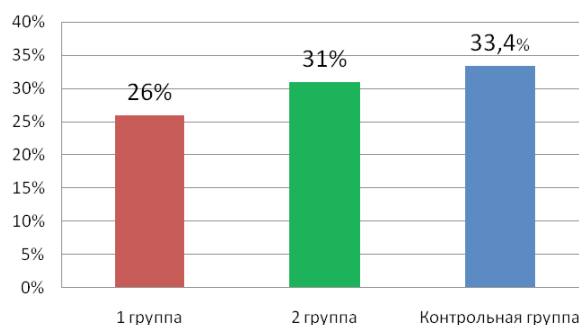


Рис. 1. Количество мутаций по eNOS

реакции на эндотелиотропную терапию в виде повышения секреции NO не зарегистрировано в течение всего времени наблюдения. Также у данных пациентов наблюдалась выраженное атеросклеротическое поражение сосудов, склонность к прогрессированию, а у пациентов, которым выполнялись реконструктивные операции, наблюдался рестеноз зоны реконструкции, что снижало эффективность оперативного пособия. Результаты лечения пациентов с мутацией eNOS намного уступают результатам пациентов нормозиготных по указанному гену. Основным критерием эффективности терапии у данной категории пациентов с ОААНК является увеличение расстояния, пройденного до появления болевого синдрома, показатели лодыечно-плечевого индекса.

Как показал анализ, количество пациентов HTZ по MTHFR выше, чем в контрольной группе. Ген играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Нарушение фермента приводит к избыточному накоплению гомоцистеина в плазме крови — гипергомоцистеинемии (ГГ), что создает благоприятные условия для развития и прогрессирования атеросклероза. Гетерозиготность по данному признаку является фактором риска развития ГГ, а следовательно неблагоприятного течения заболевания. Мутации по изучаемому гену встречались в контрольной группе — 16,6%, группе № II — 11%, группе № I — 13% (рис. 2).

Нами не выявлено, корреляционной связи между генетическим статусом по MTHFR и отдаленными результатами течения атеросклероза в различных группах исследования, однако у некоторых пациентов HTZ и MTZ по метилентетрагидрофолатредуктазе наблюдалась снижение эффекта эндотелиотропной терапии и склонность к прогрессированию атеросклероза, рестенозу зоны реконструкции оперированных пациентов.

Анализ полиморфизма генов по JAK II выявил схожие во всех группах сочетания: мутаций по данному гену не встречалось во всех группах, у большинства пациентов на-

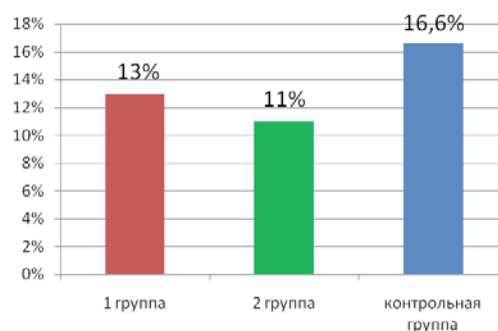


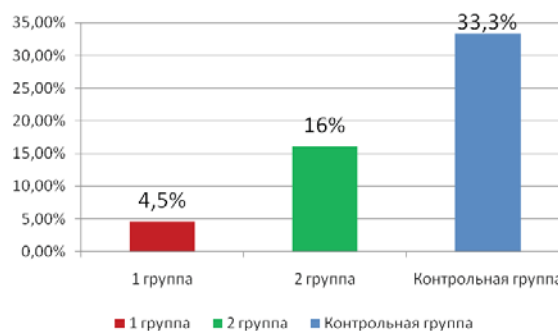
Рис. 2. Количество мутаций по MTHFR

блюдалась нормозиготность по данному гену. Количество гетерозигот по JAK II 9% и 11% в первой и второй группах, соответственно. В контрольной группе все исследуемые нормозиготны по исследуемому гену. Гетерозиготность по JAK II может привести к нарушению процесса роста и пролиферации клеток гладкой мускулатуры сосудов, что может привести к развитию гиперплазии интимы и рестенозу зоны реконструкции. Полученные результаты, а точнее отсутствие HTZ в группе здоровых добровольцев, может говорить о значимости полиморфизма генов по JAK II в развитии и течении атеросклероза, особенно в сочетании с полиморфизмом других изучаемых генов.

Распределение пациентов по AGTR1 следующее: 56,5%, 42% и 33,3% гетерозигот в первой, второй и контрольной группах соответственно. Количество мутаций по исследуемому гену было следующим: первая группа — 4,5%, во второй — 16%, в контрольной группе — 33,3% (рис. 3).

Необходимо отметить, что у двух пациентов контрольной группы с мутацией по AGTR1 наблюдалась нормозиготность по другим исследуемым генам. Вероятнее, что полиморфизм по AGTR1 не является определяющим в развитии атеросклероза. Однако гетерозиготность по AGTR1 может создать благоприятные условия для прогрессирования атеросклероза, развития гиперплазии интимы за счет вазоконстрикторного действия ангиотензина 2, пролиферации гладкомышечных клеток сосудов. Особенно это

Рис. 3. Количество мутаций по AGTR1



может быть выражено при сочетании полиморфизма по AGTR1 и JAK II.

Очевидно, что диагностика генетического статуса пациента нуждается во внедрении в ежедневную практику и может рекомендоваться абсолютно всем больным ОААНК и в ряде клинических ситуаций изучение полиморфизма ряда генов может скорректировать лечебную тактику. Такими клиническими ситуациями считаем: развитие ОААНК у лиц моложе 50 лет, «злокачественное» течение заболевания, устойчивость к лекарственной терапии, в том числе эндотелиотропной, выраженные рестенозы зон реконструкций. Но на сегодняшний день этому препятствует ряд организационных причин.

Выводы

1. Полиморфизм по изучаемым генам играет важную роль в прогрессировании атеросклероза, развитии гиперплазии интимы и рестеноза зоны реконструкции.

2. Наличие мутаций по eNOS существенно снижает эффективность эндотелиотропной терапии.

3. Полиморфизм по MTHFR может привести к развитию гипергомоцистеинемии, а следовательно, неблагоприятному течению атеросклероза.

4. Сочетание полиморфизма по AGTR1 и JAK II создают благоприятные условия для развития дисфункции эндотелия.

5. Генетический анализ по ряду генов эндотелиальной дисфункции может повлиять на выбор лечебной тактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дисфункция эндотелия: связь с полиморфизмом гена рецептора (тип 1) ангиотензина II у больных ишемической болезнью сердца / Л. О. Минушкина [и др.]. — М.: ООО «Мир Науки и Культуры», Copyright © 2000-2009. — Электрон. дан. — Режим доступа <http://nature.web.ru/db/search.html>.
2. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene / X. L. Wang [et al.] // *Nat. Med.* — 1996. — Vol. 2. — P. 41-45.
3. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population / S. Ichihara [et al.] // *Am. J. Cardiol.* — 1998. — Vol. 81. — P. 83-86.
4. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease / M. G. Colombo [et al.] // *Clin. Chem.* — 2003. — Vol. 49. — P. 389-395.
5. Genetic contribution of the endothelial constitutive

nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels / X. L. Wang [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1997. — Vol. 17. — P. 3147-3153.

6. TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease / A. Gardemann [et al.] // *Eur. Heart J.* — 1999. — Vol. 10. — P. 584-592.

7. Welch, G. Homocysteine and atherosclerosis / G. Welch, J. Loscalzo // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338, N 15. — P. 1042-1050.

8. Полиморфизм гена ангиотензин превращающего фермента при сердечно-сосудистой патологии / В. И. Целуйко [и др.] // *Цитология и генетика.* — 2002. — Т. 36, № 5. — С. 30-33.

9. Ferrario, C. M. A new myocardial conversion of angiotensin I / C. M. Ferrario, M. C. Chappell // *Curr. Opin. Cardiol.* — 1994. — Vol. 9, N 5. — P. 520-526.

10. Guanylylcyclase A inhibits angiotensin II type 1A receptor mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart / Y. Li [et al.] // *Circulation.* — 2002. — Vol. 106, N 13. — P. 1722-1728.

11. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells / J. Tsai [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 97. — P. 146-153.

12. Voetsch, B. Genetic determinants of arterial thrombosis / B. Voetsch, J. Loscalzo // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 216-229.

Адрес для корреспонденции

390026, Российская Федерация,
г. Рязань, ул. Стройкова, д. 96,
Рязанский областной клинический
кардиологический диспансер,
отделение сосудистой хирургии,
тел. +7 903 836-24-17
e-mail: suchkov_med@mail.ru,
Сучков Игорь Александрович

Сведения об авторах

Калинин Р.Е., д.м.н., доцент, профессор кафедры ангиологии, сосудистой хирургии, оперативной и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Сучков И.А., к.м.н., сердечно-сосудистый хирург ГУЗ «Рязанский областной клинический кардиологический диспансер».

Пшенников А.С., ассистент кафедры ангиологии, сосудистой хирургии, оперативной и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Никифоров А.А., к.м.н., доцент, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Поступила 04.11.2011 г.