

На правах рукописи

Тимижева Калима Бадиноквна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ ИН-СТЕНТ РЕСТЕНОЗА
КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**

1.5.7. Генетика
3.1.20. Кардиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре биологии и общей генетики медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Научные руководители:

Азова Мадина Мухамедовна, доктор биологических наук, профессор
Шугушев Заурбек Хасанович, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Пономаренко Ирина Васильевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры медико-биологических дисциплин Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства науки и высшего образования РФ

Глезер Мария Генриховна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой кардиологии факультета усовершенствования врачей Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

Козлов Кирилл Ленарович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией патологической физиологии сердечно-сосудистой системы отдела клинической геронтологии и гериатрии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Защита диссертации состоится 28 февраля 2024 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета ПДС 0300.005 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-0300005>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.005
кандидат биологических наук, доцент

Гигани Ольга Олеговна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сердечно-сосудистые заболевания становятся все более серьезной угрозой для жизни человека, являясь основной причиной госпитализации и смертности во всем мире. Ишемическая болезнь сердца (ИБС), в частности, является третьей по распространенности причиной смертности во всем мире, накладывая серьезное бремя на здоровье и экономику большинства развитых стран [Brown J.C. et al., 2023; Emery C. et al., 2020]. Патоморфологической основой ИБС является прогрессирующее сужение коронарных артерий из-за увеличения в объеме атеросклеротических бляшек, расположенных под эндотелием. Уменьшение просвета коронарных артерий, ограничение кровотока и недостаточное снабжение сердечной мышцы питательными веществами и кислородом в конечном итоге вызывают инфаркт миокарда (ИМ) [Yelamanchili V.S. et al., 2023]. С целью восстановления нормального кровотока и профилактики других критических последствий сужения коронарных сосудов были разработаны специальные устройства – так называемые стенты. Имплантация стентов относится к малоинвазивным процедурам по сравнению с кардиохирургическими операциями и связана с более низкой смертностью в отдаленном периоде и лучшими краткосрочными результатами у пациентов с тяжелой сопутствующей патологией [Choubey R.K. et al., 2020].

Коронарные стенты вошли в десятку главных медицинских достижений XXI века [Cockerill I. et al., 2021]. Их появление стало новым этапом в лечении больных с острым коронарным синдромом и ИМ, благодаря возможности предупреждать некроз миокарда и осложнения острого периода заболевания путем прямого восстановления кровотока в целевой артерии. Баллонная ангиопластика (БАП) и стентирование также улучшают качество жизни пациентов со стабильной ИБС, снижая количество приступов стенокардии, потребность в нитратах и увеличивая толерантность к физической нагрузке.

Однако, использование первого поколения стентов часто ограничивалось рестенозом в месте имплантации устройства, что приводило к несостоятельности установленного стента и требовало повторного вмешательства. Для решения этой проблемы спустя годы были разработаны и внедрены в практику стенты с лекарственным покрытием (СЛП), которые сегодня стали важным элементом в лечении пациентов с ИБС [Pilgrim T. et al., 2021]. Несмотря на то, что современные платформы стентов с лекарственным покрытием (СЛП) значительно улучшили как с точки зрения безопасности, так и с точки зрения эффективности процедуру чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ), рестеноз внутри стента (РВС) продолжает возникать у значительной части пациентов. Последние исследования показывают, что каждая десятая процедура ЧКВ в США проводится в связи с РВС [Moussa I.D. et al., 2020]. Широкое внедрение ЧКВ с применением СЛП во всем мире и возрастающая сложность ИБС, которую лечат в повседневной практике,

позволяют предположить, что бремя заболевания, связанное с рестенозом в стенте, в ближайшие годы, как ожидается, возрастет [Kastrati A. et al., 2020].

На сегодняшний день точный механизм развития рестеноза не ясен, однако известно множество факторов риска развития рестеноза, такие как сахарный диабет, курение, острый коронарный синдром, повторные вмешательства в целевом сегменте, минимальный диаметр стента, протяженный стеноз, устьевое поражение, хронические окклюзии коронарных артерий [Akboga M.K. et al., 2019; Elmore J.B. et al., 2016; Lee M.S. et al., 2016; Omeh D.J. et al., 2022; Zotz R.J. et al., 2019]. В случае, когда рестеноз развивается при отсутствии всех известных клинических, ангиографических и интраоперационных факторов риска, говорят о генетических факторах риска. Все больше исследований сегодня показывает важную роль генетических и эпигенетических факторов в процессах развития РВС [Bagyura Z. et al., 2017; Feng S. et al., 2019; Kakavandi N. et al., 2021; Pleva L. et al., 2015; Zhu M. et al., 2017].

Таким образом, рестеноз – краеугольный камень в эндоваскулярной хирургии, основное осложнение после ЧКВ, причинные механизмы которого не раскрыты окончательно. Несмотря на огромный прогресс в медицинских технологиях, рестеноз до сих пор остается ограничивающим фактором развития эндоваскулярной хирургии, приводя к повторным вмешательствам и увеличивая затраты здравоохранения во всем мире, исчисляемые миллиардами долларов [Jukema J.W. et al., 2012]. Определение факторов риска и механизмов, лежащих в основе возникновения рестеноза, необходимо не только для понимания самого процесса, но и для стратификации риска пациентов, подвергающихся коронарному стентированию. Кроме того, эти факторы могут стать базой для персонафицированного подхода в клинической практике и разработки индивидуального скрининга пациента до интервенционного вмешательства [Jukema J.W. et al., 2012]. Тенденция развития медицины персонафицированной, профилактической, превентивной, основанной на самых новых биомедицинских методах и разработках активно внедряется и поддерживается государством, так как данный подход является залогом социально-экономического успеха общества.

В этой связи представляются актуальными все меры, направленные на предупреждение данного осложнения, в том числе определение прогностических маркеров и создание шкал риска развития РВС для дальнейшего использования в клинической практике, стратификации пациентов по риску развития РВС, выявления групп высокого риска и оптимизации тактики лечения у данных пациентов.

Степень разработанности темы. В ряде исследований последних лет продемонстрировано увеличение абсолютного числа рестеноза внутри СЛП [Aoki J et al., 2021; Moussa I.D. et al., 2020; Omeh D.J. et al., 2022]. Многие исследователи ведут активный поиск факторов риска развития РВС для определения механизмов его развития и разработки профилактических мероприятий [Alfonso F. et al., 2014; Dangas G.D., et al., 2010; Shlofmitz E. et al.,

2019], однако результаты носят противоречивый характер. Наряду с клиническими исследованиями выполняется большое количество молекулярно-генетических исследований для идентификации генетических маркеров РВС [Огородова Л.М. и др., 2017; Шувалова Ю. А. и др., 2011; Kastrati A. Et al., 2000; Koch W. et al., 2001; Monraats P.S. et al., 2005; Sampietro M.L. et al., 2011; Verschuren J.J. et al., 2012; van Tiel C.M. et al., 2010]. Работ, проводящих полную оценку различных факторов риска развития РВС, в том числе генетических, направленных на определение комбинированного риска развития рестеноза и разработку комплексного подхода к профилактике и лечению данного осложнения, в научной литературе не представлено.

Цель работы. Исследовать ассоциацию полиморфизмов генов, вовлеченных в регуляцию деятельности сердечно-сосудистой системы, с развитием рестеноза у пациентов русской этнической принадлежности со стабильной ИБС после баллонной ангиопластики и стентирования коронарных артерий с применением СЛП, а также оценить прогностическую ценность клинических, ангиографических и генетических предикторов рестеноза в СЛП.

Задачи исследования

1. Провести сравнительное исследование клинических, лабораторных и ангиографических данных пациентов с наличием либо отсутствием рестеноза после ЧКВ.

2. Исследовать частоты аллелей и генотипов по полиморфным локусам кандидатных генов у пациентов в исследуемых группах.

3. Провести сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов по исследуемым полиморфизмам в зависимости от сроков развития рестеноза и возраста пациентов.

4. Разработать клинико-генетическую шкалу риска развития рестеноза внутри СЛП.

Научная новизна исследования. Впервые проанализировано влияние на развитие РВС после стентирования коронарных артерий с применением СЛП у пациентов со стабильной ИБС русской этнической принадлежности 22 полиморфных локусов 18 кандидатных генов, связанных с наиболее значимыми факторами, вовлеченными в развитие сердечно-сосудистых заболеваний (*eNOS rs1799983*, *ITGB3 rs5918*, *ApoE rs769452*, *IL6 rs1800795*, *IL10 rs1800871*, *AGT rs699*, *rs4762*, *AGTR1 rs5186*, *AGTR2 rs1403543*, *ACE rs4646994*, *CYP11B2 rs1799998*, *REN rs41317140*, *rs2368564*, *ECE1 rs1076669*, *EDNRA rs5333*, *DNMT1 rs8101626*, *DNMT3B rs1569686*, *rs2424913*, *MTHFR rs1801133*, *rs1801131*, *MTR rs1805087* и *MTRR rs1801394*). Данные по исследованию полиморфных локусов генов *ENDRA rs5333*, *ECE1 rs1076669*, *IL10 rs1800871*, *DNMT1 rs8101626*, *DNMT3B rs1569686*, *rs2424913*, *MTHFR rs1801131*, *MTR rs1805087*, *MTRR rs1801394* относительно данной патологии отсутствуют и в зарубежной литературе. Впервые показано, что риск развития РВС после имплантации СЛП достоверно выше у носителей полиморфных вариантов генов *AGT rs699 (TT)*, *REN rs2368564 (AA)*, *DNMT3B rs1569686 (TT)*

и rs2424913 (TT). Выполненная в рамках настоящей работы стратификация пациентов по сроку развития рестеноза после ЧКВ и возрасту позволила выявить необнаруженные ранее специфические генетические факторы риска для лиц старше и младше 65 лет и полиморфные варианты генов, предрасполагающие к раннему и позднему РВС. Разработана шкала риска развития рестеноза внутри СЛП на основе клинических и генетических факторов. Дополнен клинический алгоритм ведения пациентов с РВС.

Теоретическая и практическая значимость. Данные, полученные в процессе исследования, свидетельствуют об ассоциации полиморфизмов генов ренин-ангиотензин-альдостероновой (РААС), эндотелиальной и воспалительной систем, фолатного цикла и ДНК-метилтрансфераз с возникновением РВС у пациентов со стабильной формой ИБС после имплантации СЛП. Выявление связи между развитием рестеноза и наличием исследуемых генотипов позволяет рекомендовать генотипирование по данным полиморфным вариантам генов при индивидуальном прогнозировании возникновения рестеноза внутри СЛП.

Клинико-генетическая шкала риска развития рестеноза внутри СЛП, а также дополненный клинический алгоритм ведения пациентов с РВС могут быть рекомендованы к использованию при определении тактики ведения пациента для воздействия на модифицируемые факторы риска и выбора метода реваскуляризации с целью дальнейшего снижения необходимости повторного инвазивного вмешательства.

Методология и методы диссертационного исследования. Дизайн исследования построен по принципу «случай-контроль». В ходе анализа данных контрольных коронароангиограмм в исследование включены 175 пациентов. Из них 113 пациентов с наличием РВС после планового коронарного стентирования с применением СЛП (54 пациента – группа I) либо его отсутствием (59 пациентов - группа II) в среднем через 12 месяцев после ЧКВ и 62 пациента (группа III) с интактными коронарными артериями в качестве контрольной группы. В зависимости от сроков возникновения рестеноза группа I была стратифицирована на подгруппы с ранним РВС (до 12 месяцев) и поздним РВС (после 12 месяцев), по возрасту - на подгруппу пациентов младше 65 лет и старше 65 лет. Для всех обследуемых лиц был выполнен анализ клинических и ангиографических данных.

Для определения встречаемости исследованных полиморфных локусов кандидатных генов было выполнено генотипирование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени либо с последующей рестрикцией продуктов амплификации ДНК. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ «R language» и SPSS Statistica 26.0

Основные положения, выносимые на защиту

1. Риск развития РВС в СЛП связан с наличием у пациентов сахарного диабета 2 типа, мультифокального атеросклероза и многососудистого поражения коронарного русла, что позволяет полагать, что системная

эндотелиальная дисфункция является общим патогенетическим субстратом данных заболеваний.

2. Рестенозирование СЛП ассоциировано с полиморфизмами генов *AGT rs699 (TT)*, *REN rs2368564 (AA)*, что свидетельствует о том, что снижение способности к вазодилатации как следствие гиперактивации РААС является одним из главных патогенетических механизмов развития рестеноза в СЛП. Более того, гетерозиготность по *AGTR1 rs5186 (AC)* и/или *eNOS rs1549758 (CT)*, сопровождающаяся повышенной чувствительностью к ангиотензину II и сниженным уровнем продуцируемого эндотелием NO, приводят к более быстрому рестенозированию стентированного участка артерии.

3. Ассоциация полиморфизмов генов *DNMT3B rs1569686 (TT)*, *rs2424913 (TT)* с развитием рестеноза указывает на то, что метилирование ДНК также относится к числу молекулярных механизмов развития рестеноза.

4. Наличие ассоциации полиморфизмов генов *DNMT3B rs1569686*, *MTR rs1805087*, *eNOS rs1799983*, *CYP11B2 rs1799998*, *REN rs41317140* с поздним РВС позволяет полагать, что длительное воздействие эндотелийзависимых вазоконстрикторов и высокого уровня гомоцистеина может спровоцировать развитие повторного сужения в целевом сегменте в средне-отдаленном периоде.

5. Полиморфные варианты генов *eNOS rs1549758 (CT)*, *DNMT3B rs1569686 (TT)* в сочетании с возрастом младше 65 лет ассоциированы с развитием РВС после имплантации СЛП, следовательно, снижение уровня NO и гипергомоцистеинемия играют важную роль в рестенозировании СЛП у лиц молодого возраста, в то время как у пожилых пациентов более значимой оказывается эндотелиальная дисфункция, на что указывает ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов генов *REN rs2368564 (AA)*, *ENDRA rs5333 (CC)*, *ECE1 rs1076669 (TT)* с рестенозом у лиц старше 65 лет.

Степень достоверности. Достоверность результатов проведенной работы подтверждается достаточным объемом проведенных исследований, применением современных технологий генотипирования с использованием методов статистической обработки данных, соответствующих поставленным задачам.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены на научных конференциях: FEBS Congress (Прага, 2018 г., 2019 г., 2021 г.), World Congress of Cardiology (Дубай, 2018 г.), Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных «SCIENCE4HEALTH» (Москва, 2019 г.), Межвузовская конференция «Генетика в системе медицинских наук» (Москва, 2019 г.), Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2020 г.), IX съезд РОМГ (Москва, 2020 г.), Ежегодная Всероссийская научно-практическая конференция «Кардиология на марше» (Москва, 2021 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 1.5.7. Генетика, а именно п. 19 (Генетика человека. Медицинская генетика.

Наследственные болезни. Медико-генетическое консультирование. Болезни с наследственной предрасположенностью. Генетика старения. Иммуногенетика. Онкогенетика. Генетика поведения. Молекулярно-генетическая/биохимическая диагностика заболеваний человека. Фармакогенетика. Генотоксикология. Генетическая терапия), а также паспорту специальности 3.1.20. Кардиология, а именно п. 11 (Генетика (генодиагностика и генотерапия) сердечно-сосудистых заболеваний) и п. 14 (Медикаментозная и немедикаментозная терапия, реабилитация и диспансеризация пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, индексируемых в базах WoS/Scopus, 1 статья – в журнале из перечня РУДН.

Внедрение результатов исследования. Результаты представленной работы внедрены в учебный процесс при изучении дисциплин «Биология», «Биология с основами медицинской генетики» и «Молекулярная генетика в практической биологии и медицине» на кафедре биологии и общей генетики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Личный вклад автора. Автор систематизировал данные литературы по теме диссертации. Автор самостоятельно производил формирование клинических групп пациентов, анализ лабораторных, ангиографических и клинических данных. Диссертантом самостоятельно проведены молекулярно-генетические исследования. Описание полученных результатов было выполнено автором лично. Также автор принимал участие в анализе данных и написании научных работ. Диссертационная работа написана лично автором.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 9 рисунков и 13 таблиц. Библиография включает 219 источников российской и зарубежной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Дизайн исследования. На первом этапе были проанализированы данные пациентов русской этнической принадлежности, проходивших эндоваскулярное лечение в кардиологическом и кардиохирургическом отделениях в период с октября 2016 г. по сентябрь 2019 г. После проведения follow-up коронароангиографии нами было отобрано в исследование 54 пациента с ИБС, которым в анамнезе было выполнено плановое коронарное стентирование с использованием СЛП и был выявлен гемодинамически значимый РВС в среднем через 12 месяцев после ЧКВ (группа I); 59 пациентов с ИБС, стентированных в анамнезе с применением СЛП и без признаков РВС

в среднем через 12 месяцев после ЧКВ (группа II); 62 пациента с интактными коронарными артериями по данным коронарографии в качестве контрольной группы (группа III). В зависимости от сроков возникновения рестеноза группа I была стратифицирована на подгруппы с ранним РВС до 12 месяцев (n=22) и поздним РВС после 12 месяцев (n=32). По возрасту группа I была разделена на подгруппы пациентов младше 65 лет (n=36) и старше 65 лет (n=18). Критерии включения в исследование: возраст старше 45 лет, русская этническая принадлежность, наличие гемодинамически значимого рестеноза стента с лекарственным покрытием или отсутствие признаков рестеноза стентов с лекарственным покрытием или отсутствие признаков атеросклероза коронарных артерий по данным ангиографии. Критерии исключения: наличие острого коронарного синдрома (инфаркт миокарда с подъемом или без подъема сегмента ST, нестабильная стенокардия) на момент рандомизации; наличие почечной, печеночной недостаточности, онкологических заболеваний, системных заболеваний, острого инфекционного заболевания на момент рандомизации; отказ пациента от участия в исследовании.

Проведение диссертационного исследования было одобрено Комитетом по Этике медицинского института РУДН (протокол №1 от 20.09.2018 г.).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось по стандартной методике с использованием набора реагентов «ДНК-Экстран-1» (Синтол, Россия).

Генотипирование. Исследование генных полиморфизмов *REN rs41317140*, *ECE1 rs1076669*, *EDNRA rs5333*, *DNMT1 rs8101626*, *DNMT3B rs1569686*, *DNMT3B rs2424913* выполнялось методом полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией ДНК с использованием рестриктаз компании Сибэнзим (Россия). Детекцию продуктов рестрикции и амплификации выполняли методом гель-электрофореза (табл.1).

Таблица 1. Условия генотипирования

Генные полиморфизмы	Праймеры	Температура отжига	Рестриктаза	Длина фрагментов ДНК, пн
<i>REN rs41317140</i>	F:5'GCTGTCTTCTGGTGGTACTGCC3' R:5'TGCTGGCCATGAACTGGTTCTAGC3'	60°C	TaqI	T: 570, 394 C: 964
<i>ECE1 rs1076669</i>	F:5'TAGAGCCCTGGGCCTGTGAGGAGGAGCA3' R: 5'CTTACCATCTGTCCGGTGGTGTGATG3'	64°C	BstYI	C: 172, 38 T: 111, 61, 38
<i>EDNRA rs5333</i>	F: 5'TTTCTCACTTTCCTTTAGCG3' R: 5'ACCTAAGTAATTCACATCCGG3'	50°C	BstAFI	T: 154 C: 67, 87
<i>DNMT1 rs8101626</i>	F: 5'CAAATGGGCCACCTAGACAC3' R: 5'GGCAGAGATTTGAGCCAGAAG3'	67°C	BStMAI	A: 640 G: 474, 166
<i>DNMT3B rs1569686</i>	F: 5'GAGGTCTCATTATGGCCTAGG3' R: 5'GGGAGCTCACCTTCTAGAAA3'	49°C	PVull	T: 132, 93 G: 225
<i>DNMT3B rs2424913</i>	F: 5'TGCTGTGACAGGCAGAGCAG3', R: 5'GGTAGCCGGGAACTCCACGG3'	65°C	ASPA2I	C: 380 T: 207, 173

Генотипирование по полиморфным локусам *MTHFR rs1801133*, *MTHFR rs1801131*, *MTR rs1805087*, *MTRR rs1801394*, *ITGB3 rs5918*, *eNOS rs1549758*, *eNOS rs1799983*, *eNOS rs2070744*, *IL6 rs1800795*, *IL10 rs1800871*, *AGT rs699*, *AGT rs4762*, *AGTR1 rs5186*, *AGTR2 rs1403543*, *ACE rs4646994*, *CYP11B2 rs1799998* и *REN rs2368564* проводили с использованием готовых наборов реагентов для ПЦР в режиме реального времени (Синтол, Россия). Генотипирование по локусам *EDN1 rs5370*, *ApoE rs769452* осуществляли методом аллель-специфичной ПЦР с использованием наборов реагентов «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», Россия).

Статистический анализ результатов исследования. Полученные в ходе проведенного исследования данные были проанализированы с использованием программного обеспечения R-language и SPSS Statistics 26. Для сравнения частот генов и генотипов в изучаемых группах применялись критерий хи-квадрат (χ^2), точный критерий Фишера и независимый Т-критерий. Также осуществлялся расчет отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ). Была выполнена проверка равновесия Харди-Вайнберга в контрольной группе. Значение $P < 0,05$ считалось статистически значимым. Оценка возможных предикторов рестеноза выполнялась с помощью модели пропорциональных рисков Кокса. Статистическая валидация многофакторной модели осуществлялась методом ROC.

Результаты исследования и обсуждение

Сравнительная клиническая характеристика пациентов. Был проведен сравнительный анализ факторов риска ИБС, предрасполагающих к развитию повторного сужения целевой артерии после стентирования с применением СЛП у исследуемых пациентов. Группа пациентов с развитием РВС не отличалась от группы сравнения (пациенты с отсутствием РВС) по большинству факторов риска, группы были сопоставимы по возрасту, наличию таких факторов риска, как курение, абдоминальное ожирение, дислипидемия. Также не было выявлено достоверных различий в наличии артериальной гипертензии, инфаркта миокарда в анамнезе, исходном уровне систолического и диастолического АД. Достоверные отличия были выявлены по двум клиническим параметрам: встречаемости сахарного диабета 2 типа (53% и 8%, соответственно; $p < 0,001$) и частоте мультифокального атеросклероза (47% и 20%, соответственно; $p < 0,001$).

Сахарный диабет является одним из предикторов развития РВС в СЛП по результатам большого количества исследований [Feng Q. et al., 2022; Ullrich H. et al., 2022; Wilson S. et al., 2022]. Шведские ученые, проанализировав данные более 35 тыс. пациентов после ЧКВ с использованием СЛП различных типов, выявили, что частота рестеноза значительно выше у пациентов с сахарным диабетом [Fröbert O. et al., 2009], схожие данные получили отечественные исследователи [Каретникова В.Н. и др., 2022], что согласуется с результатами представленной работы.

Частота мультифокального атеросклероза в нашем исследовании была в 2 раза выше у пациентов с рестенозом в СЛП. В ряде работ также была показана предикторная роль мультифокального атеросклероза в развитии РВС [Сикало А.Н., 2019; Gheini A. et al, 2021].

До коронарного вмешательства средние уровни липидов у исследуемых пациентов в группе I с РВС составляли: общий холестерин (ОХС) $5,2 \pm 1,7$ ммоль/л, холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛВП) $1,4 \pm 0,6$ ммоль/л, холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛНП) $2,3 \pm 1,2$ ммоль/л; в группе II без рестеноза в СЛП: ОХС $4,3 \pm 1,8$ ммоль/л, ХС-ЛВП $1,5 \pm 0,5$ ммоль/л, ХС-ЛНП $2,4 \pm 0,9$ ммоль/л.

Медикаментозное лечение пациентов после процедуры ЧКВ включало оптимальную медикаментозную терапию с двойной антиагрегантной терапией в соответствии с общепринятыми рекомендациями (ацетилсалициловая кислота, клопидогрел/тикагрелор) и терапию статинами в максимально переносимых высоких дозировках (аторвастатин 40-80 мг) для достижения целевых значений липидных показателей.

Сравнительный анализ клинических и лабораторных показателей исследуемых групп пациентов на этапе контрольной коронарографии выявил отсутствие статистически достоверных различий по всем параметрам, кроме сахарного диабета и мультифокального атеросклероза. Через 12 месяцев после коронарного вмешательства средние уровни липидов у исследуемых пациентов в группе I с РВС составили: ОХС $4,1 \pm 0,6$ ммоль/л, ХС-ЛВП $1,4 \pm 0,2$ ммоль/л, ХС-ЛНП $1,9 \pm 0,5$ ммоль/л; в группе II без рестеноза в СЛП: ОХС $3,9 \pm 0,5$ ммоль/л, ХС-ЛВП $1,5 \pm 0,4$ ммоль/л, ХС-ЛНП $2,1 \pm 0,7$ ммоль/л. Достоверной разницы между группами с наличием или отсутствием РВС при уровне ХС-ЛНП ниже 1,8 ммоль/л обнаружено не было.

Сравнительная ангиографическая характеристика пациентов. Характер поражения коронарного русла на момент первичного ЧКВ был сопоставим в обеих группах пациентов с РВС и без рестеноза. Тотальные окклюзии коронарных артерий определялись у 23% пациентов в первой и 22% пациентов во второй группах ($p > 0,05$). Суммарная длина имплантированных стентов составила в среднем 52,5 мм и 47 мм, соответственно ($p > 0,05$). Минимальный диаметр стентов был равен 3,1 мм и 2,9 мм, соответственно ($p > 0,05$). Статистически достоверные отличия обнаружены по частоте многососудистого поражения коронарных артерий, 68% против 47%, соответственно ($p = 0,004$).

Ассоциация полиморфных вариантов исследованных генов с РВС. Как известно, в формировании предрасположенности к мультифакторным состояниям, таким как рестеноз, участвует множество генов. Влияние каждого отдельного гена на риск развития рестеноза может быть относительно небольшим, но в сочетании с внешними провоцирующими факторами (как правило, модифицируемыми), может привести к формированию

патологического процесса. В рамках данной работы была исследована возможная ассоциация с РВС аллелей и генотипов по полиморфным локусам генов РААС (ренина *REN rs41317140* и *REN rs2368564*, ангиотензиногена *AGT rs699* и *AGT rs4762*, рецептора типа 1 к ангиотензину II *AGTR1 rs5186*, рецептора типа 2 к ангиотензину II *AGTR2 rs1403543*, ангиотензинпревращающего фермента *ACE rs4646994*, альдостеронсинтазы *CYP11B2 rs1799998*), эндотелиновой системы (предшественника эндотелина-1 *EDN1 rs5370*, эндотелин-превращающего фермента *ECE1 rs1076669*, ЕТА-рецептора *EDNRA rs5333*), эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS rs1549758*, *eNOS rs1799983*, *eNOS rs2070744*), интерлейкина 6 *IL6 rs1800795*, интерлейкина 10 *IL10 rs1800871*, аполипопротеина Е *ApoE rs769452*, интегрина бета-3 *ITGB3 rs5918*, ферментов фолатного цикла (метилентетрагидрофолатредуктазы *MTHFR rs1801133* и *MTHFR rs1801131*, метионинсинтазы *MTR rs1805087*, метионинсинтазы-редуктазы *MTRR rs1801394*), ДНК-метилтрансферазы 1 *DNMT1 rs8101626* и ДНК-метилтрансферазы 3В (*DNMT3B rs2424913*, *DNMT3B rs1569686*).

Сравнительный анализ распределения генотипов по изучаемым генным полиморфизмам в группах пациентов с рестенозом и без РВС после ЧКВ выявил статистически значимые различия по четырем полиморфным локусам (рис.1).

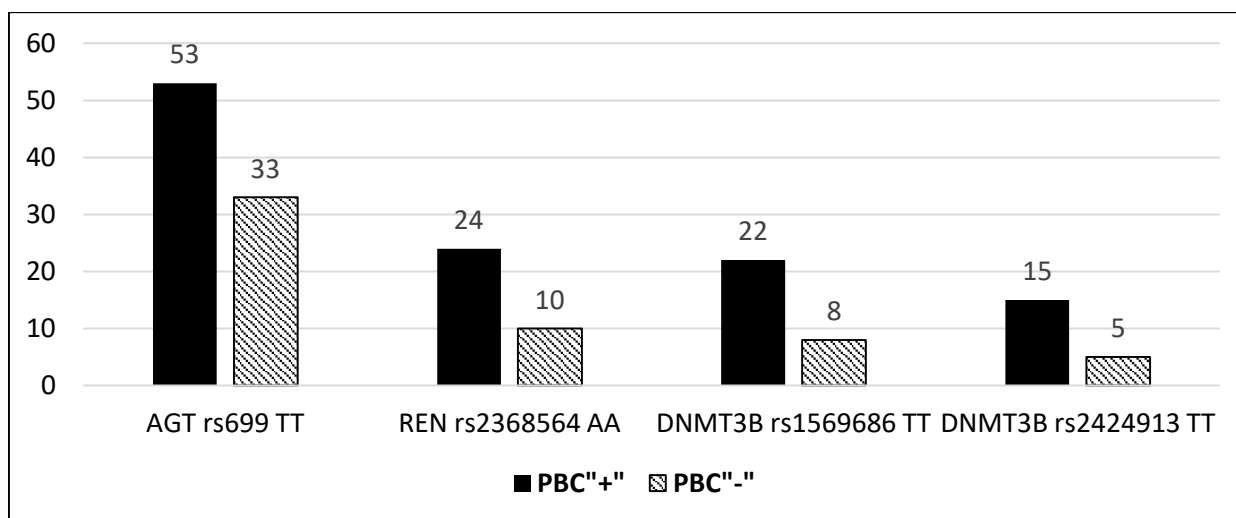


Рисунок 1. Частота (%) генотипов, ассоциированных с РВС, в группах пациентов с РВС и без рестеноза после ЧКВ

Среди известных на сегодняшний день полиморфных локусов гена *AGT* наиболее активно изучается *rs699*. Гомозиготы *CC* по полиморфизму *rs699* имеют повышенный на 10-20% уровень *AGT* в плазме [Jeunemaitre X., 2008; Nakajima T. et al, 2002]. Литературные данные относительно ассоциации полиморфизмов гена *AGT* с развитием рестеноза противоречивы. Результаты ряда исследований не выявили наличия ассоциации [Gross C.M. et al, 2007; Monraats P.S. et al, 2004; Osadnik T. et al, 2016; Zhu M. et al, 2017]. Нами

обнаружена ассоциация генотипа *TT* по полиморфизму *AGT rs699* с рестенозом ($p=0,017$). В подгруппе с РВС увеличена частота гомозигот по мажорному аллелю *T* (ОШ 2,362; 95%ДИ 1,111-5,020), что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения значимости уровня ангиотензиногена в развитии РВС.

Известно, что полиморфизм *REN rs2368564* ассоциирован с артериальной гипертензией [Frossard P.M. et al., 1998; Fu Y. et al., 2001; Zhang G. et al., 2017], но его возможная взаимосвязь с рестенозом коронарных артерий ранее не изучалась. В рамках настоящего исследования установлено, что распределение аллелей и генотипов по полиморфизму *REN rs2368564* в группе пациентов с рестенозом достоверно отличается от такового среди пациентов без РВС ($p=0,002$ и $0,0004$, соответственно), что позволяет говорить об ассоциации минорного генотипа *AA* с развитием рестеноза внутри стента у пациентов со стабильной ИБС после имплантации СЛП (ОШ 4,062; 95%ДИ 1,758-9,382).

При анализе встречаемости полиморфных вариантов гена *DNMT3B* обнаружено, что частоты минорных генотипов *TT* по *rs1569686* и *rs2424913* достоверно выше в группе пациентов с РВС по сравнению с группой пациентов без рестеноза ($p<0,0001$ и $p=0,007$ соответственно). Подсчет отношения шансов показал, что оба генотипа ассоциированы с развитием РВС (для *rs1569686 TT* ОШ 6,679; 95%ДИ 2,658-16,778; для *rs2424913 TT* ОШ 3,353; 95%ДИ 1,169-9,616). В настоящее время выявлена роль *DNMT1 rs8101626*, *DNMT3B rs1569686* и *DNMT3B rs2424913* в развитии различных онкологических заболеваний и патологии беременности [Бао Q. et al., 2012; Liu Y. et al., 2020; Ahmed A.A.M. et al, 2020; Mostowska A. et al, 2013], но насколько нам известно, представленная работа является первой, в которой оценивается ассоциация полиморфизмов генов ДНК-метилтрансфераз с ИБС и рестенозом.

По остальным исследованным локусам достоверных отличий между группами пациентов с РВС и без РВС после стентирования обнаружено не было. Однако стратификация пациентов с рестенозом по срокам развития осложнения и возрасту позволила установить наличие ряда специфических генетических предикторов.

Также следует отметить, что при сравнении с контрольной группой (пациентами с интактными коронарными артериями по данным коронарографии) были выявлены полиморфные варианты, ассоциированные с ИБС, но не с предрасположенностью к рестенозу в целом. К таковым относятся аллель *A* по полиморфизму *AGTR2 rs1403543*, генотипы *ACE rs4646994 DD* и *REN rs41317140 TT*, причем последний обнаружен только среди пациентов с ИБС.

Генные полиморфизмы, ассоциированные со сроком развития РВС. Для исследования генетических аспектов срока развития рестеноза был проведен сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов по

изучаемым генным полиморфизмам в подгруппах с РВС до 12 месяцев и позже. По ряду полиморфных локусов были обнаружены статистически значимые отличия (рис. 2).

Распределение генотипов по полиморфизму *AGTR1 rs5186* достоверно отличается в подгруппе пациентов с ранним развитием рестеноза ($p=0,031$) и характеризуется явным преобладанием гетерозигот *AC*. *AGTR1 rs5186* является одним из наиболее изученных локусов гена *AGTR1*. Показана ассоциация аллеля *C* с повышенной экспрессией гена [Haas U. et al., 2012]. Сведения относительно ассоциации данного полиморфизма с РВС противоречивы [Gross C.M. et al, 2007; Li Y. et al., 2015]. Нами обнаружено выраженное увеличение частоты гетерозигот в подгруппе пациентов с ранним развитием рестеноза (ОШ 2,121; 95%ДИ 1,196-3,775). Вероятно, нарушение баланса в экспрессии рецепторов ангиотензина II, а именно умеренное повышение экспрессии рецепторов 1 типа и снижение экспрессии рецепторов 2 типа, играет значимую роль в развитии рестеноза, особенно в течение первого года после ЧКВ.

По полиморфизму *AGT rs4762* наблюдается снижение частоты гетерозиготного генотипа среди пациентов с рестенозом (ОШ 0,396; 95%ДИ 0,170-0,430) с наименьшей встречаемостью у лиц с поздним рестенозом (ОШ 0,255; 95%ДИ 0,098-0,667), что позволяет рассматривать его в качестве маркера протекции развития рестеноза, особенно, в средне-отдаленном периоде.

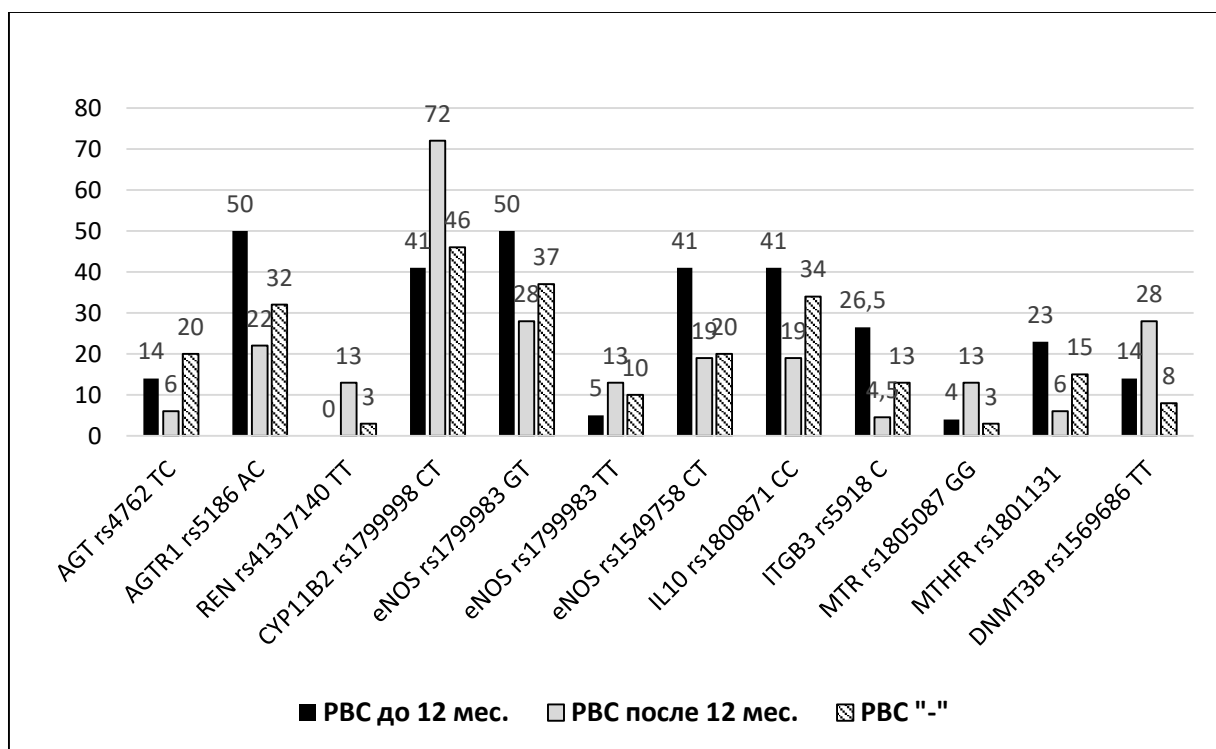


Рисунок 2. Частота (%) генотипов и аллелей, ассоциированных со сроком развития РВС, в группе пациентов без рестеноза и в подгруппах пациентов с РВС до 12 месяцев и после 12 месяцев после ЧКВ

При изучении встречаемости генотипов по полиморфному локусу *REN rs41317140* выявлены достоверные отличия между контрольной группой и пациентами с ИБС ($p=0,0002$). Гомозиготы по минорному аллелю *T* обнаружены только среди пациентов с ИБС, причем все лица с РВС, имевшие указанный генотип, оказались среди пациентов, у которых рестеноз развился позже 12 мес. после ЧКВ. Сходные результаты были получены и Afruza R. et al., изучавшими ассоциацию данного полиморфизма с артериальной гипертензией: гомозиготы по минорному аллелю в контрольной группе отсутствовали и были выявлены только среди пациентов с АГ.

Среди пациентов, у которых рестеноз развился позже 1 года после ЧКВ, преобладают гетерозиготы по полиморфизму *CYP11B2 rs1799998*, чем они достоверно отличаются и от группы без РВС ($p=0,0005$). Полиморфизм *CYP11B2 rs1799998* оказывает влияние на экспрессию одноименного гена. Существуют некоторые исследования о его ассоциации с сердечно-сосудистой патологией [Byrd J.V. et al., 2015; Fontana V. et al., 2014; Wang X. et al., 2019]. Ryu SK et al. не выявили ассоциации данного полиморфизма с рестенозом. Аналогичный результат для общей группы пациентов с РВС был получен и в нашем исследовании. Вместе с тем, обращает на себя внимание радикально отличающееся от остальных подгрупп распределение генотипов по данному полиморфизму среди пациентов, у которых рестеноз развился позже 1 года, характеризующееся преобладанием гетерозигот (ОШ 3,019; 95%ДИ 1,677-5,432).

В ряде исследований продемонстрирована значимая роль полиморфизмов *eNOS rs1799983* и *rs2070744* в развитии атеросклероза, артериальной гипертензии, стенокардии и острого инфаркта миокарда, гипергомоцистеинемии [Levinsson A. et al., 2014; Oliveira-Paula G.H. et al., 2017]. Существуют отдельные исследования, показавшие ассоциацию аллеля *C* по полиморфизму *rs2070744* с развитием РВС у пациентов после имплантации стентов с лекарственным покрытием [Zeng W.P. et al., 2017] и наличие взаимосвязи гетерозиготного генотипа *GT rs1799983* с рестенозом [Огородова Л.М. и др., 2017]. Анализ распределения генотипов по полиморфизму *eNOS rs1549758*, проведенный в рамках нашего исследования, выявил достоверно более высокую частоту гетерозиготных носителей в подгруппе с ранним РВС, чем с поздним ($p=0,0005$) и группе без рестеноза ($p=0,001$, ОШ 2,78; 95%ДИ 1,478-5,227). При исследовании данных по полиморфизму *eNOS rs1799983* не было выявлено достоверной связи с рестенозом в целом, но распределение генотипов в подгруппах с ранним и поздним рестенозом достоверно различалось ($p=0,003$): в подгруппе с поздним РВС чаще встречались минорные гомозиготы, но была ниже встречаемость гетерозигот. Полученные результаты позволяют полагать, что данный полиморфный локус может иметь прогностическую ценность при определении возможных сроков развития РВС при наличии прочих предрасполагающих факторов.

По данным некоторых авторов полиморфизм *IL10 rs1800871* ассоциирован с ИБС, а также риском развития системного васкулита с преимущественным поражением коронарного русла [Kumari R. et al., 2018], однако отсутствуют данные о его роли в развитии рестеноза внутри стента. Изучение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *IL10 rs1800871* выявило статистически достоверные отличия между подгруппами пациентов с рестенозированием до 1 года и позже после ЧКВ. При этом гомозиготы *CC* значительно чаще встречаются в подгруппе пациентов с ранним рестенозом ($p=0,001$). Существует мнение, что, будучи локализованным в промоторной области, данный полиморфизм может влиять на выработку *IL10*, что в свою очередь, может приводить к нарушению ингибирования провоспалительных маркеров и развитию ряда хронических воспалительных заболеваний. Следует отметить, что отличий от группы без РВС обнаружено не было.

Анализ частот генотипов по полиморфизму *rs5918* гена интегрина бета-3 не выявил достоверных отличий между исследованными группами. Однако, было установлено, что наличие минорного аллеля *C* в генотипе ассоциировано с более ранним развитием рестеноза ($p<0,05$). Клинически указанный полиморфный вариант является предиктором высокого риска развития инфаркта миокарда, особенно у мужчин молодого возраста, при наличии факторов риска развития атеросклероза, таких как гипертония, дислипидемия и сахарный диабет [Shoenfeld Y. et al., 2001]. Данные, полученные в ходе нашего исследования, позволяют полагать, что минорный аллель *C* по полиморфизму *rs5918* гена *ITGB3* можно рассматривать в качестве предиктора раннего рестеноза, но требуются дальнейшие исследования в выборках большего объема.

Sun K. et al. (2017) показали, что полиморфизм гена *MTR rs1805087* (генотипы *AG* и *GG*), приводящий к снижению активности фермента метионинсинтазы, связан с развитием атеросклероза. В нашем исследовании гетерозиготный генотип *AG* часто встречался в группе больных ИБС, однако отличия от контроля не достигли значимого уровня (38% vs 28%, $p>0,05$). Вместе с тем, обнаружено, что лица с гомозиготным генотипом *GG* предрасположены к позднему рестенозу ($p=0,02$; ОШ 4,333; 95%ДИ 1,170–16,043).

Анализ результатов генотипирования пациентов по локусу *MTHFR rs1801131* показал отсутствие значимой связи полиморфизма с ИБС и рестенозом в целом, однако стратификация пациентов по срокам развития РВС выявила ассоциацию гомозиготного генотипа *CC* с ранним рестенозом ($p=0,003$; ОШ 2,470; 95%ДИ 1,028-5,938).

Как было отмечено выше, генотип *TT* по полиморфизму *DNMT3B rs1569686* ассоциирован с РВС в целом, причем достоверно чаще встречается у пациентов с развитием рестеноза после 12 мес. ($p=0,004$; ОШ 7,677; ДИ 3,143-18,756).

Возрастные особенности РВС. Для определения значимости исследуемых полиморфных локусов для развития РВС в различных возрастных группах (младше и старше 65 лет) был проведен анализ распределения аллелей и генотипов в этих подгруппах. Полиморфизмы, по которым были обнаружены достоверные отличия, приведены на рис. 3.

В рамках проведенного нами исследования установлено, что среди изученных полиморфных вариантов генов компонентов РААС только генотип *AA* по полиморфизму *REN rs2368564*, ассоциированный с РВС в целом, достоверно чаще встречается у пациентов с рестенозом старше 65 лет ($p < 0,0001$; ОШ 8,014; 95%ДИ 3,487-18,420).

Полиморфный локус *ENDRA rs5333* ассоциирован с атеросклерозом и артериальной гипертензией [Sugawara J. et al., 2018], но исследование его значимости для развития РВС ранее не проводилось. При изучении распределения генотипов были выявлены достоверные различия между подгруппами пациентов ($p = 0,025$). Минорные гомозиготы *CC* значимо чаще встречались в подгруппе пациентов с РВС старше 65 лет, чем в подгруппе младше 65 лет (ОШ 4,918; 95%ДИ 1,328-18,218) и в группе без рестеноза ($p = 0,004$, ОШ 14,754; 95%ДИ 1,866-116,670).

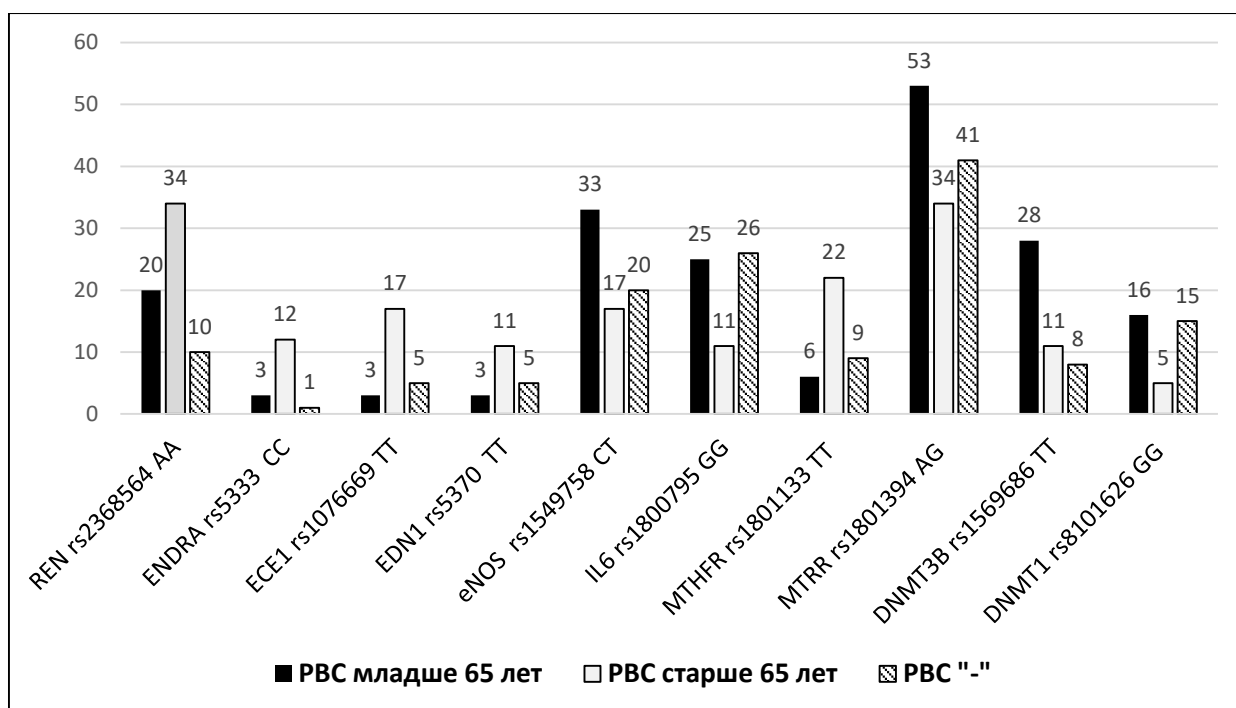


Рисунок 3. Частота (%) генотипов, ассоциированных с возрастом пациентов с РВС, в группе пациентов без рестеноза и в подгруппах пациентов с РВС младше 65 лет и старше 65 лет

Анализ данных по миссенс-варианту *ECE1 rs1076669* также показал достоверное различие между возрастными подгруппами ($p = 0,003$). Частота гомозигот *TT* была статистически значимо выше в подгруппе пациентов

старше 65 лет по сравнению с младшей подгруппой (ОШ 6,343; 95%ДИ 1,780-22,607) и группой без РВС ($p=0,021$, ОШ 3,704; 95%ДИ 1,295-10,595). Как и в случае с вышеописанным полиморфным локусом, исследований, посвященных данному полиморфизму, мало [Seremak-Mrozikiewicz A. et al., 2011], и у пациентов с рестенозом он не рассматривался.

Полиморфизм гена *EDN1 rs5370* в настоящее время уже достаточно широко изучен, показана его ассоциация с дислипидемией, ИБС и артериальной гипертензией [Ahmed M. et al., 2016]. Анализ распределения генотипов и аллелей по указанному полиморфизму выявил достоверные отличия между пациентами старше и моложе 65 лет ($p=0,033$). Следует отметить, что во всех изученных группах преобладают гетерозиготы *GT*, что особенно выражено в подгруппе с ранним рестенозом. Минорные гомозиготы *TT* значимо чаще, чем в других подгруппах, встречались только у пациентов с РВС старше 65 лет.

Достоверные различия выявлены также и по полиморфному локусу *eNOS rs1549758* ($p=0,016$). Гетерозиготы чаще встречаются в младшей подгруппе по сравнению как с подгруппой старше 65 лет (ОШ 2,405; 95%ДИ 1,233-4,689), так и с группой без РВС (ОШ 1,97; 95%ДИ 1,035-3,749).

Исследования на больших выборках показывают ассоциацию повышенного уровня IL6 в плазме с высоким риском неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, в том числе у пациентов с ИБС. Данные о роли уровня IL6 в формировании рестеноза противоречивы. Ряд исследований указывает на значимую роль повышенного уровня IL6 и сниженного уровня IL10 в плазме для развития рестеноза после стентирования с применением голOMETаллических стентов [Kazmierczak E. et al., 2014; Zurakowski A. et al., 2009], но работы относительно значимости данного полиморфизма для развития рестеноза стентов с лекарственным покрытием отсутствуют. Изучение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *IL6 rs1800795* не выявило статистически достоверных отличий между группами пациентов с РВС и без рестеноза. Однако сравнительный анализ данных в подгруппах с РВС младше и старше 65 лет показал, что генотип *GG* встречается достоверно реже в подгруппе пациентов старшей возрастной группе ($p=0,031$), что может свидетельствовать о меньшей значимости провоспалительных факторов в развитии рестеноза у этих лиц.

Распределение генотипов по полиморфизмам генов *MTHFR* и *MTRR* в группе с РВС соответствовало таковому в группе без рестеноза. Однако стратификация пациентов с рестенозом по возрасту выявила достоверные различия между подгруппами пациентов с РВС младше 65 лет и старше. Установлено, что гомозиготный генотип *TT* по *MTHFR rs1801133* более чем в 3 раза чаще встречался в подгруппе старше 65 лет ($p = 0,004$; ОШ 3,0; 95%ДИ 1,255–7,173), тогда как частота гетерозигот *AG* по полиморфизму *MTRR rs1801394* была достоверно выше в подгруппе с рестенозом у пациентов моложе 65 лет ($p=0,003$). Известно, что генотипы *AG* и *GG* по полиморфному локусу *MTRR rs1801394* связаны с изменением конформации

метионинсинтазы-редуктазы и снижением ее активности, что приводит к нарушению обмена фолиевой кислоты, гипергомоцистеинемии и атеросклерозу [Sherbak S.G. et al, 2016; Smolkov I.V. et al., 2016].

Ассоциированный с рестенозом в целом генотип *TT* по полиморфизму *DNMT3B rs1569686* также значимо чаще встречался у пациентов младшей возрастной группы ($p=0,001$; ОШ 7,933; 95%ДИ 3,240-19,426). По результатам анализа встречаемости минорного гомозиготного генотипа *GG* по *DNMT1 rs8101626* его можно рассматривать в качестве маркера протекции у пациентов старше 65 лет (ОШ 0,291; 95%ДИ 0,096-0,883).

Обобщая результаты проведенных молекулярно-генетических исследований, следует отметить, что большинство полиморфных локусов генов, ассоциированных с РВС, в различной степени влияют на формирование эндотелиальной дисфункции. Так, снижение экспрессии гена *AGTR2* при наличии аллеля *A*, значимо чаще встречающегося в общей группе пациентов с ИБС, приводит к уменьшению количества рецепторов к АГТ и снижению способности к вазодилатации, что в конечном итоге, ведет к несбалансированному ответу сосудистой стенки на внешние факторы и развитию эндотелиальной дисфункции. Нарушение вазодилатации возможно также при уменьшении выработки АГТ, что может быть обусловлено наличием полиморфизма *AGT rs699 (TT)*. Роль гиперактивации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в развитии РВС подтверждается значимо более высокой встречаемостью у пациентов с рестенозом генотипа *REN rs2368564 AA*, способствующего повышению уровня ренина в плазме крови. Наличие генотипов *AGTR1 rs5186 AC* и/или *eNOS rs1549758 CT*, связанное с гиперчувствительностью к АТ II и сниженной продукцией эндотелиального оксида азота, ассоциировано с более быстрым рестенозированием коронарных артерий, что может говорить об их значимости для срока развития данного осложнения. Впервые выявлена ассоциация полиморфизмов *DNMT3B rs1569686 (TT)* и *DNMT3B rs2424913 (TT)* с РВС. Данный факт указывает на то, что метилирование ДНК также относится к числу молекулярных механизмов, вовлеченных в развитие рестеноза. Ассоциация полиморфных локусов *DNMT3B rs1569686*, *MTR rs1805087*, *eNOS rs1799983*, *CYP11B2 rs1799998*, *REN rs41317140* с поздним РВС позволяет полагать, что длительное воздействие вазоконстрикторов и высокого уровня гомоцистеина может спровоцировать рестеноз внутри стента в средне-отдаленном периоде. Установлено, что генотипы *eNOS rs1549758 CT*, *MTRR rs1801394 AG* и *DNMT3B rs1569686 TT* у лиц младше 65 лет связаны с развитием рестеноза стентов, что указывает на важную роль низкого уровня оксида азота и повышенного уровня гомоцистеина в развитии рестеноза в молодом возрасте, тогда как ассоциация генотипов *REN rs2368564 AA*, *ENDRA rs5333 CC*, *ECE1 rs1076669 TT* с рестенозом у лиц старше 65 лет может свидетельствовать о значимости дисфункции эндотелия у данной группы.

Таким образом, генотипирование по исследованным полиморфным локусам позволяет формировать группы высокого риска развития РВС с целью

проведения лечебно-профилактических мероприятий, направленных на снижение степени данного риска. Однако к клинической интерпретации обнаруженных у конкретного пациента генетических вариантов, которые являются лишь предпосылкой к возникновению патологии, следует подходить чрезвычайно корректно с обязательным учетом других факторов риска (клинических, лабораторных и ангиографических), составляющих комбинированный риск развития РВС.

Прогнозирование риска развития РВС в СЛП. На сегодняшний день лечение РВС является сложной клинической задачей из-за гетерогенности механизмов его развития и относительно высокой частоты рецидивов [Shlofmitz E. et al., 2019]. У большинства пациентов с РВС развивается клиническая картина стабильной ИБС, поэтому вид и сроки вмешательства должны быть тщательно спланированы. Учитывая мультифакториальный характер рестеноза, важным представляется идентификация факторов, приведших к рестенозированию у конкретного пациента как для выявления групп высокого риска по данному осложнению, так и для выработки этиопатогенетически обоснованной и индивидуализированной лечебной тактики [Shlofmitz E. et al., 2019].

Существенным ограничением современных методов лечения рестеноза является «окуло-рестенотический синдром», использование только лишь ангиографических данных, что не дает возможность определить полную картину развития процесса. Тщательный анализ предыдущего интервенционного вмешательства, сложности поражения, типа используемого стента, техники имплантации, а также определение ассоциированных с РВС клинических состояний пациента могут помочь спланировать дальнейшую оптимальную тактику лечения. Методы интракоронарной визуализации, такие как ВСУЗИ и ОКТ, позволяют определить более полную картину развития процесса. Данные методики являются важными инструментами для оценки рестенотического субстрата и механизма развития рестеноза и должны использоваться рутинно. Аналогично нативному стенозу, для определения гемодинамической значимости РВС целесообразно определение фракционного резерва кровотока [Giustino G. et al., 2022]. Указанные методы визуализации способны выявить механические и анатомические факторы, приводящие к рестенозу. При отсутствии вышеперечисленных факторов предполагается наличие генетической предрасположенности к гиперплазии неоинтимы [Shlofmitz E. et al., 2019]. На сегодняшний день обнаружено большое количество полиморфных локусов генов, ассоциированных с гиперплазией неоинтимы [Verschuren J.J. et al, 2012]. В нашем исследовании также были выявлены полиморфизмы, ассоциированные с РВС.

После идентификации всех факторов риска развития РВС, присутствующих у конкретного пациента, представляется важным определение комплексного риска развития РВС с использованием прогностических шкал. В настоящее время представлены несколько

прогностических шкал с использованием клинических и ангиографических характеристик [Габбасов З.А. и др, 2018; Плечев В.В. и др, 2018; Сиваков С.И., 2016; Веселовская Н.Г. и др., 2013; Шамес Д.В. и др, 2019]. Нами предложена прогностическая шкала для определения риска развития рестеноза в СЛП с применением клинических и генетических факторов риска РВС. Для этого был проведен многофакторный анализ пропорциональных рисков по Коксу.

Для оценки вклада сразу нескольких предикторов была построена многофакторная модель регрессии Кокса, предикторы из числа значимых по результатам одномерного анализа вводились последовательно пока предсказательная способность модели не переставала статистически значимо улучшаться. В результате значимыми факторами риска рестеноза показали себя сахарный диабет (ОШ 2,347, 95%ДИ 1,346-4,092, $p=0,003$), мультифокальный атеросклероз (ОШ 2,093, 95%ДИ 1,207-3,627, $p=0,009$), гомозиготный генотип *TT* по полиморфному локусу *DNMT3B rs1569686* (ОШ 2,882, 95%ДИ 1,557-5,333, $p=0,001$). Для создания прогностической шкалы развития рестеноза внутри стента была введена балльная система оценки на основе значений отношения шансов значимых предикторов (путем округления ОШ до целого числа). Таким образом, сахарный диабет оценивался в 2 балла, мультифокальный атеросклероз – 2 балла, а генотип *DNMT3B rs1569686 TT* – 3 балла. Суммарные баллы для каждого пациента являются числовым показателем вероятности развития рестеноза, минимальное значение по шкале – 0, максимальное – 7 баллов. Учитывая распределение баллов среди пациентов (рис. 4), при 0-1 баллах риск рестеноза оценивался как низкий, при 2-4 баллах как средний, и свыше 4 баллов как высокий. ROC-анализ показал высокую предсказательную способность полученной модели, площадь под кривой (AUC) составляет 0,839 (95%ДИ 0,764 - 0,914, $p<0,001$).

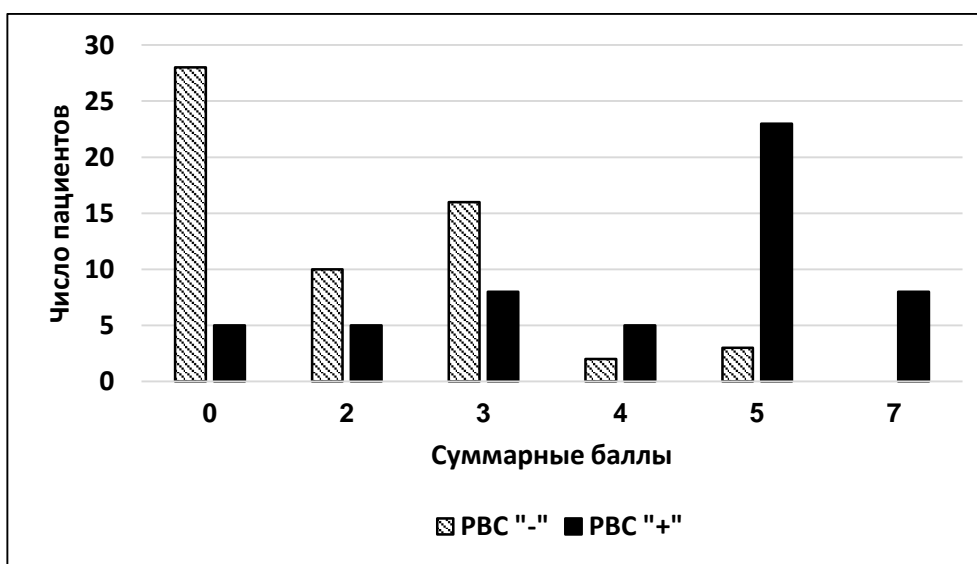


Рисунок 4. Распределение баллов среди пациентов с рестенозом и без РВС

По результатам проведенного многомерного анализа клинических и генетических факторов нами предложена модификация клинического алгоритма ведения пациентов с рестенозом стентов Giustino G. et al. Для увеличения эффективности вторичной профилактики у пациентов с развившимся рестенозом коронарных стентов при исключении механических причин развития РВС возможно проведение генотипирования по полиморфным локусам генов *AGT rs699*, *REN rs2368564*, *DNMT3B rs1569686*, *DNMT3B rs2424913*, продемонстрировавшим ассоциацию с рестенозом в целом.

ВЫВОДЫ

1. Клинические параметры, такие как СД 2 типа, мультифокальный атеросклероз и многососудистое поражение коронарного русла, ассоциированы с развитием РВС в СЛП у пациентов со стабильной ИБС.
2. С рестенозом в целом ассоциированы полиморфизмы *AGT rs699 (TT)*, *REN rs2368564 (AA)*, *DNMT3B rs1569686 (TT)* и *rs2424913 (TT)*.
3. Генотипы *MTHFR rs1801133 TT*, *REN rs2368564 AA*, *ENDRA rs5333 CC*, *ECE1 rs1076669 TT* являются специфическими факторами риска для пациентов старше 65 лет, тогда как *DNMT1 rs8101626 GG* выступает маркером протекции для таких пациентов. Лица моложе 65 лет предрасположены к рестенозу, если они имеют генотипы *eNOS rs1549758 CT*, *DNMT3B rs1569686 TT* или *MTRR rs1801394 AG*.
4. Ранний рестеноз связан с гетерозиготностью по *AGTR1 rs5186 (AC)* и/или *eNOS rs1549758 (CT)*, гомозиготностью по *MTHFR rs1801131 (CC)*; поздний рестеноз чаще встречается у носителей генотипов *eNOS rs1799983 TT*, *CYP11B2 rs1799998 CT*, *REN rs41317140 TT*, *MTR rs1805087 GG* и *DNMT3B rs1569686 TT*.
5. Наличие сахарного диабета 2 типа, мультифокального атеросклероза и гомозиготности по минорному аллелю *T* полиморфного локуса *DNMT3B rs1569686* может быть использовано для индивидуального комплексного прогнозирования риска развития РВС в СЛП у пациентов со стабильной формой ИБС.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам со стабильной формой ИБС, которые направляются на плановые БАП и стентирование с применением СЛП рекомендуется определить комплексный риск развития РВС согласно разработанной прогностической шкале.
2. Для пациентов с сахарным диабетом 2 типа и мультифокальным атеросклерозом рекомендовано проведение молекулярно-генетического тестирования по полиморфному локусу *DNMT3B rs1569686*.
3. При высокой вероятности развития РВС в СЛП (5 баллов и более) рекомендовано рассмотреть использование альтернативных методов лечения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Проведение дальнейших молекулярно-генетических исследований с целью расширения панели генетических маркеров риска и протекции развития РВС.
2. Исследование прогностической значимости выявленных генетических предикторов рестеноза в других этнических группах пациентов.
3. Оценка эффективности предложенного алгоритма тактики ведения пациентов со стабильной ИБС с целью первичной профилактики РВС.

Список сокращений

АКШ – аортокоронарное шунтирование	AGTR1 – рецептор типа 1 к ангиотензину II
БАП – баллонная ангиопластика	AGTR2 – рецептор типа 2 к ангиотензину II
БЛП – баллоны с лекарственным покрытием	CYP11B2 – альдостеронсинтаза
ГМК – гладкомышечные клетки	DNMT – ДНК-метилтрансфераза
ГМС – голометаллические стенты	ECE – эндотелин-превращающий фермент
ИБС – ишемическая болезнь сердца	ENDRA – рецептор эндотелина тип А
ИМ – инфаркт миокарда	EDN1 – эндотелин-1
РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система	eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота
РВС – рестеноз внутри стента	IL – интерлейкин
СД – сахарный диабет	MTHFR –
СЛП – стенты с лекарственным покрытием	метилентетрагидрофолатредуктаза
ПЦР – полимеразная цепная реакция	MTR – метионинсинтаза
АСЕ – ангиотензинпревращающий фермент	MTRR – метионинсинтаза-редуктаза
AGT – ангиотензиноген	REN – ренин

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Богатырева К.Б.**, Азова М.М., Агаджанян А.В., Цховребова Л.В., Аит Аисса А., Шугушев З.Х. Ассоциация полиморфизма T1565C гена ITGB3 с развитием атеросклероза и ин-стент рестеноза коронарных артерий у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца // Научные результаты биомедицинских исследований. 2018. №4. С.3-9. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-1. (SCOPUS)

2. **Timizheva K.B.**, Azova M.M., Ait Aissa A., Aghajanyan A.V., Tskhovrebova L.V., Blagonravov M.L. Association of gene polymorphisms of some

endothelial factors with stent reendothelization after elective coronary artery revascularization // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021. Vol. 171. No. 2. P.194-197. doi: 10.1007/s10517-021-05193-5 (WoS / SCOPUS)

3. Azova M., **Timizheva K.**, Ait Aissa A., Blagonravov M., Gigani O., Aghajanyan A., Tskhovrebova L. Gene polymorphisms of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System as risk factors for the development of in-stent restenosis in patients with stable coronary artery disease // *Biomolecules*. 2021. 11(5):763. doi: 10.3390/biom11050763. (WoS / SCOPUS)

4. **Timizheva K.B.**, Ahmed A.A.M., Ait Aissa A., Aghajanyan A.V., Tskhovrebova L.V., Azova M.M. Association of the DNA Methyltransferase and Folate Cycle Enzymes' gene polymorphisms with coronary restenosis // *Life*. 2022. 12(2):245. doi: 10.3390/life12020245. (WoS / SCOPUS)

5. **Тимижева К.Б.**, Агаджанян А.В., Цховребова Л.В., и др. Оценка роли полиморфных вариантов генов IL6 и IL10 как фактора риска развития рестеноза у пациентов после имплантации стентов с лекарственным покрытием // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2021. Т. 25. №1. С. 48-54. doi: 10.22363/2313-0245-2021-25-1-48-54 (Перечень РУДН)

6. **Bogatyreva K.B.**, Azova M.M., Shugushev Z.K., Aghajanyan A.V., Tskhovrebova L.V., Aissa A.A., Blagonravov M.L., Syatkin S.P. C-reactive protein and renin-angiotensin system gene polymorphisms in patients with coronary artery stenosis // *FEBS Open Bio*. 2018. V.8 (S1). P. 114.

7. **Bogatyreva K.B.**, Shugushev Z.K., Azova M.M., Aghajanyan A.V., Tskhovrebova L.V., Gigani O.O., Aissa A.A. Gene polymorphisms involved in development of in-stent restenosis following coronary implantation of drug-elution stents in patients with stable coronary artery disease // *Global Heart*. 2018. V.13(4). P. 395. DOI:10.1016/j.gheart.2018.09.068

8. **Bogatyreva K.B.**, Azova M.M., Shugushev Z.Kh., Aghajanyan A.V., Tskhovrebova L.V., Ait Aissa A., Gigani O.B. // Renin gene polymorphism rs2368564 is associated with the risk of in-stent restenosis in Russian patients with stable coronary artery disease // *MINERVA MEDICA*, 2019. V.110 (2 Suppl. 1). P.7.

9. **Bogatyreva K.**, Azova M., Aghajanyan A., Tskhovrebova L., Aissa A.A., Gigani O.B., Gigani O.O. Role of the IL-10 C819T gene polymorphism in development of coronary artery restenosis // *FEBS Open Bio*. 2019. V.9 (S. 1). P. 107.

10. Валиуллина С.Д., **Богатырева К.Б.** Ассоциация полиморфизма гена ренина rs41317140 с рестенозом внутри стента после коронарного стентирования // *Клинические и теоретические аспекты современной медицины: материалы IV Всероссийской конференции*. Москва, РУДН, 9 ноября 2019 г. – Москва: РУДН, 2019. С. 69.

11. Валиуллина С.Д., **Богатырева К.Б.** Полиморфизм rs429358 гена аполипопротеина Е как предиктор неоатеросклероза и раннего рестеноза у пациентов после чрескожных коронарных вмешательств // *Сборник тезисов*

XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. М., 2020. С. 133.

12. **Богатырева К.Б.**, Азова М.М., Шугушев З.Х., Аит А.А., Агаджанян А.В., Цховребова Л.В. Генетические предикторы раннего рестеноза стентов коронарных артерий // Медицинская генетика. 2020. Т.19 (5). С.54-55.

13. **Bogatyreva K.**, Azova M., Shugushev Z., Blagonravov M., Aghajanyan A., Tskhovrebova L., Aissa A.A., Gigani O.B. Significance of rs2368564 and rs41317140 renin gene polymorphisms for coronary artery in-stent restenosis development // FEBS Open Bio. 2021. V.11 (S.1). P. 247.

14. **Тимижева К.Б.**, Рябенко Ю.Н., Агаджанян А.В., Цховребова Л.В. Полиморфный локус гена метилентетрагидрофолатредуктазы rs1801131 у пациентов с рестенозом коронарных артерий // Кардиологический вестник. 2021. Т.16 (2-2). С. 42-43.

РЕЗЮМЕ

**кандидатской диссертации Тимижевой Калимы Бадинокловны
«Генетические основы развития ин-стент рестеноза коронарных артерий
у больных ишемической болезнью сердца»**

Представленная работа направлена на выявление полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием рестеноза внутри стентов с лекарственным покрытием у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца русской этнической принадлежности. Установлены как общие генетические маркеры предрасположенности к рестенозу в целом (*DNMT3B rs1569686*, *DNMT3B rs2424913*, *REN rs2368564*, *AGT rs699*), так и ряд специфических маркеров, выявленных после стратификации пациентов по срокам развития рестеноза (до 12 месяцев после ЧКВ и позже) и возрасту (младше и старше 65 лет). Обнаружено, что сахарный диабет 2 типа, мультифокальный атеросклероз и многососудистое поражение коронарного русла также ассоциированы с РВС. Для оценки вклада сразу нескольких предикторов была построена многофакторная модель регрессии Кокса. В результате значимыми факторами риска рестеноза показали себя сахарный диабет, мультифокальный атеросклероз и гомозиготный генотип *TT* по полиморфизму *rs1569686* гена *DNMT3B*. На основе полученных данных предложены индивидуальная модель прогнозирования риска рестеноза и дополненный алгоритм лечения пациентов с рестенозом внутри стентов.

SUMMARY
of the dissertation «Genetic bases of the coronary in-stent restenosis in patients with coronary artery disease» by Timizheva Kalima Badinokovna

The research was aimed at identifying gene polymorphisms associated with coronary in-stent restenosis (ISR) in Russian patients with stable coronary artery disease. It was found that *DNMT3B rs1569686*, *DNMT3B rs2424913*, *REN rs2368564*, and *AGT rs699* gene polymorphisms were associated with the restenosis in general. Further stratification of patients by age (under 65 years, over 65 years) and term of ISR development (before 12 months, after 12 months) revealed the presence of some specific genetic predictors. Type 2 diabetes mellitus, multifocal atherosclerosis, and multivessel coronary artery disease were also associated with the in-stent restenosis. To assess the contribution of several predictors, a multivariate Cox regression model was used. As a result, diabetes mellitus, multifocal atherosclerosis, and homozygous *TT* genotype for *DNMT3B rs1569686* were shown as significant risk factors. The obtained results allowed us to create the individual in-stent restenosis risk prediction model and the updated treatment algorithm for patients with ISR.