

© Коллектив авторов, 2015
УДК 616.147.3/.39-008.9

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА СИНТАЗЫ АЗОТА И ЭНДОТЕЛИНА-1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

*Р.Е. Калинин¹, С.В. Грязнов^{1,2}, А.А. Никифоров¹,
А.А. Камаев¹, А.П. Швальб³, А.А. Слепнев¹*

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань (1)

ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер», г. Рязань (2)

Рязанское бюро судебно-медицинской экспертизы, г. Рязань (3)

Целью исследования было изучить частоту встречаемости генотипов полиморфного маркера гена эндотелина-1 (EDN1 Lys198Asn) и синтазы окиси азота (NOS3 C786T) у пациентов с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей и установить возможную связь со степенью хронической венозной недостаточности. В работу включено 240 пациентов с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей. Основная группа – 160 человек с трофической язвой, контрольная – 80 человек – без трофических изменений. Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови. Для исследования выбрана точка мутации эндотелина-1 (EDN1) в позиции 198 (Lys>Asn) и эндотелиальной синтазы окиси азота (NOS3) в позиции 786 (C>T). Определение полиморфизма генов молекул, характеризующих дисфункцию эндотелия, при хронической венозной недостаточности нижних конечностей дает возможность осуществлять как индивидуальный прогноз, так и расширить перечень хорошо известных предикторов тяжести её течения.

Ключевые слова: хроническая венозная недостаточность нижних конечностей, трофическая язва, функциональное состояние эндотелия при хронической венозной недостаточности, полиморфизм генов молекул, характеризующих дисфункцию эндотелия.

Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей занимает одно из важнейших мест в структуре социально значимых заболеваний как в России, так и во всем мире [2, 5, 12, 14]. Лечение хронической венозной недостаточности нижних конечностей является актуальным вопросом современной сосудистой хирургии в связи с достаточно высокой заболеваемостью и инвалидизацией населения. Тяжелые формы ХВН, сопровождающиеся появлением трофических расстройств, встречаются у 2% трудоспособного населения индустриально развитых стран [4, 9]. У лиц пожилого возраста

частота трофических язв достигает 4-5% [1, 8, 10, 11]. Можно с уверенностью говорить о том, что лечение трофических язв является важнейшей медико-социальной проблемой современного общества. Трофическими язвами нижних конечностей на почве варикозной болезни и посттромбофлебитического синдрома страдает около 1,5 млн. россиян [5, 6, 7]. Риск венозных язв нижних конечностей зависит от тяжести варикозного расширения вен и хронической венозной недостаточности нижних конечностей.

В настоящее время отсутствуют четкие данные о связи степени хронической

венозной недостаточности с функциональным состоянием эндотелия. Одними из самых изученных маркеров, характеризующих дисфункцию эндотелия, является оксид азота (NO) и эндотелин-1 [3, 4, 15].

Регуляторное действие оксида азота в организме обеспечивается его генерацией из L-аргинина, катализируемой изоформами NO-синтаз (NOS) [16]. Показано, что физиологические концентрации NO играют важную роль в регуляции функций иммунной системы, эндотелия сосудов, нейротрансмиссии, поддержании гемостаза. В тоже время, недостаток, как и избыток NO могут вызывать ряд патологических состояний [13]. Представляется вероятным, что активность определенных изоформ NOS, являющихся продуктами экспрессии соответствующих генов (NOS1-3), может обеспечивать различную концентрацию NO в организме, и таким образом, определять его функцию как физиологического регулятора, либо как токсического агента. А изменение концентрации эндотелина у пациентов с мутациями в соответствующем гене, может стать значимым в развитии и усугублении дисфункции эндотелия.

Поэтому поиск генетических критериев, характеризующих дисфункцию эндотелия при хронической венозной не-

достаточности нижних конечностей для возможного прогнозирования ее степени, представляется чрезвычайно актуальным.

Цель исследования – изучить частоту встречаемости генотипов полиморфного маркера гена эндотелина-1 (EDN1 Lys198 Asn) и синтазы окиси азота (NOS3 C786T) у пациентов с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей.

Материалы и методы

В исследование включено 240 пациентов с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей. При этом основные группы I и II (160 человек) составили пациенты с трофическими язвами (ТЯ) на фоне варикозной болезни (ВРВ) и посттромбофлебитического синдрома (ПТФС) соответственно (ХВН III степени, С6 класс). В качестве контрольной группы для оценки распределения генотипов исследуемых полиморфизмов в популяции обследовано 80 пациентов без трофической язвы (ХВН I-II степени, С2-С4 классы). Основные и контрольные группы были сопоставимы по вовлечению в патологический процесс поверхностной и глубокой венозных систем, по полу и возрасту.

Распределение исследуемых по группам, полу и возрасту представлены в таблице 1.

Таблица 1

Распределение больных по группам, полу и возрасту

Группы	n	Возраст, лет	Пол (абс. ч./%)	
			Мужчины	Женщины
I. ВРВ + ТЯ	80	56,1±7,2	32 (40%)	48 (60%)
II. ПТФС + ТЯ	80	62,2±8,3	36 (45%)	44 (55%)
III. ВРВ	40	58,7±9,4	14 (35%)	26 (65%)
IV. ПТФС	40	60,1±8,2	13 (32,5%)	27 (62,5%)

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000 – поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации", утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови. Для исследования выбрана точка мутации эндотелина-1 (EDN1) в позиции 198 (Lys>Asn) и эндотелиальной синтазы окиси азота (NOS3) в позиции 786 (C>T).

В работе использовались стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех»-«SNP» (Моск-

ва). Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия, проходящем в ультрафиолетовом свете.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью программы «*BIOSTAT*». При сравнении частот и групп по качественному бинарному признаку пользовались критерием χ^2 . Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для определения частот аллельных вариантов генов применялся закон Харди-Вайнберга.

Результаты и их обсуждение

Распределение распространенности генотипов полиморфного локуса C786T гена NOS3 и Lys198Asn гена EDN1 в группе больных и контрольной группе соответствовало ожидаемому равновесию Харди-Вайнберга.

По данным распределения распространенности генотипов гена EDN1 Lys198Asn у больных с хронической венозной недостаточностью III степени (С6) получены достоверные различия ($p < 0,05$) с контрольной группой (табл. 2).

Таблица 2

Распределение генотипов EDN1 (Lys198Asn)

Генотип	Группа I (n=80)	Группа II (n=80)	Группа III (n=40)	Группа IV (n=40)
Lys/Lys	48(60%)	32(40%)	29(72,5%)	21(52,5%)
Lys/Asn	24(30%)	36(45%)	9(22,5%)	16(40%)
Asn/Asn	8(10%)	12(15%)	2(5%)	3(7,5%)

При этом у пациентов с трофическими язвами (группы I и II) генотип Asn/Asn обнаруживался чаще в 2 раза по сравнению с контрольными группами (III и IV), как по нозологии (ВРВ/ПТФС), так и в целом (С6/С2-4).

Оценивая частоту аллельных вариантов гена EDN1 Lys198Asn выявлено,

что хроническая венозная недостаточность, осложненная трофическими язвами, сопровождается более редким обнаружением аллели Lys (при ПТФС – 0,63, при варикозной болезни – 0,75) (табл. 3).

Распределение генотипов NOS3 (C786T) представлены в таблице 4.

Таблица 3

Частота аллельных вариантов в гене EDN1 полиморфизма Lys198Asn

Аллель	Группа I (n=80)	Группа II (n=80)	Группа III (n=40)	Группа IV (n=40)
Lys	0,75	0,63	0,84	0,73
Asn	0,25	0,37	0,16	0,27

Таблица 4

Распределение генотипов NOS3 (C786T)

Генотип	Группа I (n=80)	Группа II (n=80)	Группа III (n=40)	Группа IV (n=40)
С/С	12(15%)	8(10%)	12(30%)	12(30%)
С/Т	32(40%)	40(50%)	20(50%)	24(60%)
Т/Т	36(45%)	32(40%)	8(20%)	4(10%)

Согласно полученным данным, частота генотипов Т/Т в группах I и II была выше, чем в группах III и IV в 2,25 и 4 раза соответственно. Тяжёлые трофические нарушения характеризовались дос-

товерно частым обнаружением генотипа Т/Т в сравнении не только с группой контроля по нозологии, но и при сравнении групп III и IV ($p < 0,05$).

Оценивая частоту аллельных вари-

антов гена NOS3 (C786T) выявлено, что хроническая венозная недостаточность, осложненная трофическими язвами, со-

провождается более частым обнаружением аллеля Т (и при ПТФС, и при варикозной болезни – 0,65) (табл. 5).

Таблица 5

Частота аллельных вариантов в гене NOS3 полиморфизма C786T

Аллель	Группа I (n=80)	Группа II (n=80)	Группа III (n=40)	Группа IV (n=40)
С	0,35	0,35	0,55	0,6
Т	0,65	0,65	0,45	0,4

Таким образом, определение полиморфизма генов молекул, характеризующих дисфункцию эндотелия, при хронической венозной недостаточности нижних конечностей дает возможность осуществлять как индивидуальный прогноз, так и расширить перечень хорошо известных предикторов тяжести её течения.

Выводы

1. У пациентов с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей, осложненной трофическими язвами генотип Asn/Asn полиморфного маркера гена EDN1 Lys198Asn обнаруживается чаще в 2 раза, чем у пациентов с меньшими степенями хронической венозной недостаточности, причем данная закономерность прослеживается как по каждой нозологии (варикозная болезнь, посттромбофлебитический синдром), так и в целом.

2. При посттромбофлебитическом синдроме генотип Asn/Asn встречался в 1,5 раза чаще, чем при варикозной болезни, как в основной, так и контрольной группах (p=0,0001).

3. Оценивая частоту аллельных вариантов гена EDN1 Lys198Asn выявлено, что хроническая венозная недостаточность, осложненная трофическими язвами, сопровождается более редким обнаружением аллели Lys (при посттромбофлебитическом синдроме – 0,63, при варикозной болезни – 0,75, p=0,0001).

4. Частота обнаружения генотипа Т/Т гена NOS3 (C786T) у пациентов с трофическими язвами при варикозной болезни в 2,25 раза выше, а при посттромбофлебитическом синдроме в 4 раза выше, чем выявляемость аналогичного генотипа у пациентов без трофических язв.

5. Тяжёлые трофические нарушения характеризуются достоверно частым обнаружением генотипа Т/Т в сравнении не только с группой контроля по нозологии, но и при сравнении их у пациентов с трофическими язвами и без них (p=0,0001).

6. Хроническая венозная недостаточность, осложненная трофическими язвами, сопровождается более частым обнаружением аллеля Т.

Литература

1. Анализ путей венозного оттока после операции дистанционной окклюзии задних большеберцовых вен / П.Г. Швальб [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2015. – №1. – С. 74-81.
2. Веденский А.Н. Пластические и реконструктивные операции на магистральных венах / А.Н. Веденский. – Л.: Медицина, 1979. – 219 с.
3. Калинин Р.Е. Компрессионная терапия с позиций лобулярно-гемодинамической концепции патогенеза венозных трофических язв нижних конечностей / Р.Е. Калинин, А.П. Швальб, С.В. Грязнов // Материалы XXX Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления в лечении сосудистых больных». – Сочи, 2015. – С. 257-258.
4. Небылицин Ю.С. Внутрисосудистый гомеостаз при экспериментальном венозном тромбозе / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков, В.И. Козловский // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014. – №4. – С. 102-114.
5. Общие принципы морфогенеза трофических язв (новая концепция) / П.Г. Швальб [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – №2. – С. 465-467.

6. Покровский А.В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей – современные проблемы диагностики, классификации, лечения / А.В. Покровский, С.В. Сапелкин // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2003. – №. – С. 53.
7. *Флебология: руководство для врачей* / В.С. Савельев [и др.]; под ред. В.С. Савельева. – М.: Медицина, 2001. – 664 с.
8. Швальб П.Г. Комплексное лечение венозных трофических язв и новая концепция их патогенеза / П.Г. Швальб, А.П. Швальб, С.В. Грязнов // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. – 2010. – № 1. – С. 136-142.
9. Швальб П.Г. Особенности патогенеза венозных трофических язв в выборе метода терапевтических воздействий / П.Г. Швальб, А.П. Швальб, С.В. Грязнов // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова*. – 2010. – № 3. – С. 105-110.
10. Швальб П.Г. Можно ли считать какие-либо гемодинамические нарушения оттока независимым предиктором возникновения трофических язв? / П.Г. Швальб, С.В. Грязнов, И.Н. Ша-
наев // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2014. – №2. – С. 374.
11. Швальб П.Г. Миниинвазивный метод коррекции клапанной недостаточности бедренной вены при различных причинах ее происхождения / П.Г. Швальб, С.В. Грязнов // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2015. – №2. – С. 84-89.
12. Bergan J.J. Advances in evaluation and treatment of chronic venous insufficiency / J.J. Bergan // *J. Angiol. Vasc. Surg.* – 1995. – №3. – P. 59-76.
13. Hancock J.T. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways / J.T. Hancock, R. Desikan, S.J. Neill // *Biochem. Soc. Trans.* – 2001. – Vol. 29, pt. 2. – P. 612-619.
14. Nicolaides A.N. Venous reflux / A.N. Nicolaides // *Int. Angiol.* – 1989. – Vol. 8, №4. – P. 5-6.
15. The role of nitric oxide in the pathogenesis of venous ulcers / S. Nikolovska [et al.] // *Acta Dermatovenerol Croat.* – 2005. – Vol. 13, №4. – P. 242-246.
16. Sobrier F. Nitric oxide synthase genes among many others / F. Sobrier // *Hypertension*. – 1999. – Vol. 33. – P. 924-926.

**NITRIC OXIDE SYNTHASE AND ENDOTHELIN-1 GENE POLYMORPHISM
IN LOWER LIMB CHRONIC VENOUS INSUFFICIENCY**

*R.E. Kalinin, S.V. Gryaznov, A.A. Nikiforov,
A.A. Kamaev, A.P. Shvalb, A.A. Slepnev*

Objective of this study was to evaluate the prevalence of endothelin-1 (EDN1 Lys198Asn) and nitric oxide synthase (NOS3 C786T) gene polymorphism in patients with lower limb chronic venous insufficiency; a possible correlation between gene polymorphism and degree of chronic venous insufficiency was also considered. The study included 240 patients with lower limb chronic venous insufficiency. The main group included 160 patients with venous ulcers; control group included 80 patients without ulceration. Peripheral venous blood samples were taken for DNA evaluation. EDN1 Lys198Asn mutation for endothelin-1 and NOS3 C786T mutation for nitric oxide synthase were studied. Detection of polymorphism in genes, which determine the development of endothelial dysfunction in lower limb chronic venous insufficiency, represents a useful tool to predict the severity of the disease and its outcomes.

Keywords: lower limb chronic venous insufficiency, venous ulcer, functional state of endothelium in lower limb chronic venous insufficiency, polymorphism in genes determining endothelial dysfunction.

Калинин Р.Е. – д.м.н., проф., зав. кафедрой ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: rzgmu@rzgmu.ru

Грязнов С.В. – к.м.н., ассист. кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, зав. отд. сосудистой хирургии ГБУ РО ОККД.
E-mail: urta3@yandex.ru

Никифоров А.А. – к.м.н., доц. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: alnik03@yandex.ru

Камаев А.А. – аспирант кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: kamaev.rgmu@gmail.com

Швальб А.П. – к.м.н., зав. патогистологическим отделением Рязанского бюро судебно-медицинской экспертизы.
E-mail: shvalbalik@yandex.ru

Слепнев А.А. – к.б.н., доц. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: rzgmu@rzgmu.ru