УДК 616.12-008.46-036.12-037+616.124.2+575.113
DOI: http://doi.org/10.31928/1608-635X-2022.1-2.4049

Зв'язок алельних поліморфізмів T(–786)C та G894T гена ендотеліальної NO-синтази зі станом вазодилататорної функції ендотелію та довготерміновим клінічним прогнозом у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю і зниженою фракцією викиду лівого шлуночка

Л.Г. Воронков [1], І.Д. Мазур [1], Н.Г. Горовенко [2]

[1] ДУ «Національний науковий центр "Інститут кардіології імені акад. М.Д. Стражеска" НАМН України», Київ
[2] Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ

Мета роботи – дослідити зв'язок алельного поліморфізму T(–786)C та G894T гена ендотеліальної NO-синтази зі станом вазодилататорної функції ендотелію і довготерміновим клінічним прогнозом у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю (ХСН) та зниженою фракцією викиду лівого шлуночка (ФВЛШ).

Матеріали і методи. У дослідження залучено 116 пацієнтів зі стабільною ХСН (II–III функціонального класу за NYHA), зумовленою ішемічною хворобою серця, з ФВЛШ ≤ 45 %. Вазомоторну функцію ендотелію вивчали в стандартизованій манжетковій пробі з визначенням потокозалежної вазодилатації (ПЗВД). Для оцінювання довготермінового клінічного прогнозу пацієнтів спостерігали 2,5 року (медіана 20 [11,5; 22,5] міс).

Результати та обговорення. Розподіл за поліморфізмом промотора T(–786)C гена *eNOS* становив: TT – 40,5 % (n=47), TC – 43,1 % (n=50), CC – 16,4 % (n=19); за поліморфізмом сьомого екзона G894T був таким: GG – 56,0 % (n=65), GT – 33,6 % (n=39), TT – 10,4 % (n=12). ПЗВД у пацієнтів з генотипом TT поліморфізму T(–786)C гена *eNOS* становила 7,2 [4,7; 8,3] %, у гетерозигот TC – 6,6 [4,4; 9,1] %, тоді як у гомозигот CC – 4,7 [2,8; 6,0] %; p=0,034 для TT проти CC; p=0,046 для TC проти CC. У пацієнтів з генотипом GG поліморфізму G894T ПЗВД становила 7,1 [4,3; 9,4] %, у гетерозигот GT – 6,2 [5,1; 8,1] %, у носіїв генотипу TT – 4,2 [2,5; 5,3] %; p=0,030 для GG проти TT. У пацієнтів з генотипом CC поліморфізму промотора T(–786)C був вищий рівень госпіталізацій, зумовлених декомпенсацією ХСН (log-rank 5,304; p=0,021) та більша частота серцево-судинної смерті (log-rank 4,011; p=0,045) порівняно з носіями генотипу TT. ФВЛШ, рівень ПЗВД та генотип CC були предикторами серцево-судинної смерті при уніваріантному аналізі Кокса; при мультиваріантному аналізі такими предикторами залишилися лише величина ФВЛШ та рівень ПЗВД. При дослідженні довготермінового клінічного прогнозу серед носіїв різних генотипів поліморфізму сьомого екзона G894T статистично значущої різниці не виявлено.

Висновки. У пацієнтів з ХСН генотип CC поліморфізму промотора T(–786)C *eNOS* асоціюється з більш вираженою ендотеліальною дисфункцією та гіршим довготерміновим клінічним прогнозом порівняно з носіями генотипу TT. У пацієнтів з генотипом TT поліморфізму сьомого екзона G894T виявили гіршу ендотеліальну функцію порівняно з носіями генотипу GG.

Ключові слова: серцева недостатність, ендотеліальна синтаза оксиду азоту, поліморфізм T(–786)C, поліморфізм G894T, довготерміновий клінічний прогноз.

Мазур Ірина Дмитрівна, к. мед. н.,
наук. співр. відділу серцевої недостатності
E-mail: zx20006ster@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 19 квітня 2022 р.

© Л.Г. Воронков, І.Д. Мазур, Н.Г. Горовенко, 2022

Патофізіологічна роль ендотеліальної дисфункції в прогресуванні хронічної серцевої недостатності (ХСН) є доведеною [7]. Показано, що вираженість порушення вазодилататорної функції ендотелію асоціюється з гіршим клінічним прогнозом у пацієнтів із систолічною ХСН [10, 16]. Ендотеліальна дисфункція характеризується зниженням біодоступності оксиду азоту (NO), що зокрема можна пояснити мутаціями в гені ендотеліальної синтази оксиду азоту *(eNOS)* [31], локалізованому в сьомій хромосомі (7q35-36); мутації зазначеного гена характеризуються заміною одного нуклеотиду іншим або наявністю різних алелів. Найбільш вивчені серед них – поліморфізм промотора (T(–786)C), поліморфізм сьомого екзона (G894T) та поліморфізм четвертого інтрона (4 a/b). Роль цих поліморфізмів вивчали у хворих з ішемічною хворобою серця (ІХС) [8, 14, 17], інфарктом міокарда (ІМ) [3, 5, 40], артеріальною гіпертензією [4, 30, 37], тоді як при ХСН кількість таких досліджень обмежена [33, 35, 39].

Мета роботи – дослідити зв’язок алельного поліморфізму T(–786)C та G894T гена ендотеліальної NO-синтази зі станом вазодилататорної функції ендотелію і довготерміновим клінічним прогнозом у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю та зниженою фракцією викиду лівого шлуночка.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідження залучено 116 пацієнтів (чоловіки – 87, жінки – 29) віком від 40 до 72 років із ХСН, зумовленою ІХС. Пацієнти мали клінічні ознаки ХСН на рівні II–III функціонального класу (ФК) за критеріями NYHA (Нью-Йоркської асоціації серця) та фракцію викиду лівого шлуночка (ФВЛШ) ≤ 45 % (медіана 35,4 [28,3; 41,8]). Усі хворі отримували оптимізовану, згідно з чинними рекомендаціями, терапію ХСН [29]. Критеріями незалучення в дослідження були IV ФК за NYHA, гострий коронарний синдром давністю менше 3 міс, інсульт в анамнезі, некоронарогенні захворювання міокарда, анемія, онкологічна патологія, гострі та хронічні інфекційні захворювання, статус курця та вік понад 75 років. У дослідження також не залучали пацієнтів, які в структурі стандартної терапії приймали β-адреноблокатор карведилол або небіволол, оскільки останні можуть у різний спосіб збільшувати біодоступність NO [19, 36].

Усім пацієнтам були проведені клінічне обстеження, рутинні лабораторні аналізи, 12-канальна ЕКГ та стандартна ехокардіографія. Для оцінювання ендотеліальної функції всім хворим виконували стандартну манжеткову пробу з вимірюванням потокозалежної дилатації плечової артерії (ПА) [2]. У контрольну групу було залучено 30 осіб зіставного віку, без серцево-судинної та іншої документованої клінічно значущої внутрішньої патології.

Після залучення пацієнтів у дослідження їх спостерігали з метою оцінювання клінічного прогнозу протягом 2,5 року; медіана спостереження становила 20 [11,5; 22,5] міс. Дані про серцево-судинну смерть (ССС) та госпіталізацію, зумовлену погіршанням перебігу ХСН, були отримані щодо 94 пацієнтів. ССС визначали в таких випадках: 1) раптова серцева смерть відповідно до її чинного визначення [9]; 2) смерть унаслідок прогресування ХСН; 3) смерть унаслідок ІМ або інсульту. Госпіталізацію внаслідок ХСН визначали як таку, що не була запланована і відбулася внаслідок прогресування клінічних симптомів ХСН.

Проведення дослідження було схвалено етичною комісією ДУ «ННЦ “Інститут кардіології імені акад. М.Д. Стражеска” НАМН України» та не суперечило принципам Гельсінської декларації.

Оцінювання ендотеліальної функції. Для оцінювання вазодилататорної функції ендотелію вимірювали потокозалежну вазодилатацію (ПЗВД) у пробі з реактивною гіперемією (стандартизована манжеткова проба). Цей метод, шляхом механічної стимуляції ендотелію периферичних артерій підвищеним кровоплином, після артеріальної оклюзії, дає уявлення про стан ПЗВД [2]. У ході дослідження у всіх 116 пацієнтів та 30 здорових осіб вимірювали діаметр ПА у стані спокою, потім навколо плеча накладали манжету сфігмоманометра дистальніше досліджуваної ділянки і накачували її до 200 мм рт. ст. Тривалість фази оклюзії становила 5 хв. Через 90 с після зняття манжети (декомпресії) вимірювали діаметр ПА вдруге. Вимірювання проводили лінійним методом, який полягає у визначенні діаметра артерії з використанням двох крапок, встановлених ультразвуковим курсором: одна – на межі «адвентиція – медія» передньої стінки судини, друга – на межі «медія – адвентиція» задньої стінки. За діаметр ПА брали середню величину, обчислену в трьох серцевих циклах у фазу діастоли. Розраховували ПЗВД як відношення зміни діаметра ПА протягом реактивної гіперемії до діаметра артерії в стані спокою, вираженому у відсотках до вихідного діаметра.

Визначення поліморфізмів промотора T(–786)C та сьомого екзона G894T гена *eNOS*. Для вивчення поліморфних варіантів застосовували полімеразну ланцюгову реакцію з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів [32, 38]. Для цього ампліфікували ділянку промотора гена *eNOS*

за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) – 5’-CACCAGCATTCTGGGAACTGTA-3’ і зворотний (antisense) – 5’-GCCGCAGTAGCAGAGAGAC-3’. Для сьомого екзона праймерами були: прямий (sense) – 5’-GGCTGGACCCCAGGAAAC-3’ і зворотний (antisense) – 5’-CCACCCAGTCAATCCCTTTG-3’. Надалі 6 мкл продукту ампліфікації фрагментів досліджуваних генів інкубували при 37 °С протягом 18 год з 5 од. рестриктази PdiI (Ферментас, Латвія) у відповідному буфері. Ампліфікати фрагментів після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі. Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 40 хв) проводили за допомогою транслюмінатора (Біоком, Росія).

Статистичні методи. Кількісні змінні представлені у вигляді медіани [нижній квартиль; верхній квартиль] (якщо розподіл був неправильний) або у вигляді середнього значення зі стандартним відхиленням (якщо розподіл був правильним); категоріальні змінні наведено у вигляді кількості випадків і частки у відсотках. Для перевірки гіпотез про розходження в групах кількісних показників використовували однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим порівнянням груп за допомогою апостеріорного критерію Тьюкі; розбіжності вважали статистично значущими при $p<0,05$.

Для попарного порівняння груп за категоріальними змінними було застосовано критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йейтса; у разі невиконання передумов зазначеного критерію застосовували точний критерій Фішера.

Для дослідження прогнозу та побудови кривих виживання використовували метод Каплана – Мейєра. Порівняння виживання в групах проводили за критерієм Кокса та лог-ранговим критерієм. Для визначення предикторів виживання застосовували уні- та мультиваріантний регресійний аналіз Кокса.

Статистичний аналіз здійснено за допомогою програми SPSSInc (США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Серед 116 хворих із систолічною ХСН розподіл за поліморфізмом промотора T(–786)C гена *eNOS* був таким: 40,5 % (n=47) пацієнтів належали до гомозигот ТТ; 43,1 % (n=50) – до гетерозигот ТС; 16,4 % (n=19) були гомозиготами СС. Для поліморфізму сьомого екзона G894T співвідношення було таким: гомозиготи GG становили 56,0 % (n=65) осіб, гетерозигот GT було 33,6 % (n=39), так званий рідкісний генотип ТТ мали 10,4 % (n=12).

Між трьома групами пацієнтів, сформованими залежно від поліморфізму промотора T(–786)C гена *eNOS* (носії генотипу ТТ, гетерозиготи ТС та носії рідкісного генотипу СС), не було різниці за віком, співвідношенням статей, рівнем артеріального тиску та частотою серцевих скорочень (ЧСС) *(табл. 1)*.

Також не виявлено різниці між групами за такими показниками, як середнє значення ФК за NYHA, кількість перенесених ІМ в анамнезі та частка хворих з фібриляцією передсердь. Однак першу маніфестацію симптомів ХСН у хворих з генотипом СС виявляли статистично значуще раніше, ніж у носіїв генотипу ТТ ($p<0,05$). За такими показниками ехокардіографії, як ФВЛШ, кінцеводіастолічний розмір ЛШ, передньозадній розмір ЛП та рівень розрахункового систолічного тиску в ЛА, пацієнти трьох груп не відрізнялися.

При порівнянні всіх вищезазначених клініко-інструментальних показників серед трьох груп поліморфізму сьомого екзона G894T гена *eNOS* – гомозиготи GG, гетерозиготи GT та гомозиготи ТТ – статистично значущих відмінностей не виявлено ($p>0,05$ для усіх значень; *табл. 2*).

ПЗВД у контрольній групі становила 11,2 [10,3; 12,3] %, що є статистично значуще більшим порівняно з хворими на ХСН – носіями як генотипів ТТ, ТС, так і генотипу СС поліморфізму промотора T(–786)C гена *eNOS* ($p<0,05$). ПЗВД у хворих з генотипом ТТ становила 7,2 [4,7; 8,3] %, у гетерозигот ТС – 6,6 [4,4; 9,1] %, тоді як в осіб з генотипом СС – 4,7 [2,8; 6,0] %, що є статистично значуще меншим порівняно як з носіями генотипу ТТ ($p=0,034$), так і носіями генотипу ТС ($p=0,046$).

Серед носіїв трьох генотипів поліморфізму сьомого екзона G894T гена *eNOS* спостерігали подібну до вищезазначеного ситуацію – гомозиготи GG, гетерозиготи GT та гомозиготи ТТ мали гірші показники ПЗВД порівняно з контрольною групою ($p<0,05$). ПЗВД у хворих з генотипом GG становила 7,1 [4,3; 9,4] %, у гетерозигот GT – 6,2 [5,1; 8,1] %, у носіїв ТТ – 4,2 [2,5; 5,3] %, що статистично значуще менше при порівнянні з носіями генотипу GG ($p=0,030$), а при порівнянні з гетерозиготами GT статистичної значущості не виявлено ($p=0,097$).

Беручи до уваги дані деяких досліджень [10, 16] про те, що ендотеліальна дисфункція може бути асоційована з гіршим виживанням у хворих із систолічною ХСН, ми оцінили вплив поліморфізму T(–786)C та G894T гена *eNOS* на клінічний прогноз. Аналіз даних щодо госпіталізацій, зумовлених декомпенсацією ХСН, серед носіїв різних варіантів поліморфізму T(–786)C гена *eNOS* показав, що половина гомозигот ТТ таку госпіталізацію мали впродовж перших 12 місяців з моменту спо-

Таблиця 1

Клінічна характеристика хворих з генотипами ТТ, ТС і СС поліморфізму промотора T(–786)C гена *eNOS*

Показник	Усі пацієнти (n=116)	Генотип ТТ (n=47)	Генотип ТС (n=50)	Генотип СС (n=19)	р, ТТ vs CC
Вік, роки	64,5 [55,8; 71,0]	67,0 [56,0; 71,0]	62,5 [55,0; 70,3]	70,5 [56,8; 72,3]	нд
Чоловіки	87 (75,0 %)	35 (74,5 %)	36 (72,0 %)	16 (88,9 %)	нд
САТ, мм рт. ст.	120,0 [111,5; 135,0]	125,0 [110,0; 140,5]	120,0 [115,0; 130,5]	120,0 [115,5; 132,5]	нд
ДАТ, мм рт. ст.	80,0 [70,0; 85,0]	80,0 [70,5; 90,0]	80,5 [70,0; 89,5]	77,5 [69,0; 90,0]	нд
ЧСС	80,0 [71,5; 94,3]	85,0 [79,5; 100,0]	80,0 [70,0; 89,3]	83,0 [69,0; 102,5]	нд
Артеріальна гіпертензія	98 (84,5 %)	40 (87,0 %)	42 (84,0 %)	16 (84,2 %)	нд
ІМ	39 (33,6 %)	16 (34,1 %)	16 (32,0 %)	7 (36,8 %)	нд
Фібриляція передсердь	74 (63,8 %)	29 (61,7 %)	32 (64,0 %)	13 (68,4 %)	нд
Тривалість СН, роки	2,0 [1,0; 3,6]	2,0 [1,1; 5,0]	2,0 [1,0; 4,0]	1,25 [0,5; 2,6]*	0,02
ФК за NYHA	2,6±0,5	2,6±0,5	2,6±0,5	2,7±0,5	нд
ФВЛШ, %	33,0 [27,8; 40,0]	33,0 [25,0; 37,0]	35,0 [28,0; 42,5]	34,5 [27,0; 44,0]	нд
ІКДО ЛШ, мл/м^2	94,3 [76,2,0; 112,9]	95,3 [79,2; 119,3]	90,5 [68,4; 113,7]	96,0 [76,5; 121,3]	нд
Поперечний розмір ЛП, мм	50,4 [48,3; 53,3]	49,1 [45,7; 54,4]	50,2 [39,6; 50,1]	51,3 [38,9; 55,2]	нд
Систолічний тиск у ЛА, мм рт. ст.	60,0 [47,3; 65,0]	60,0 [50,0; 70,5]	55,0 [45,0; 65,0]	65,0 [55,0; 68,8]	нд
ШКФ (EPI), мл/(хв·1,73 м^2)	64,7 [42,4; 73,6]	68,1 [44,9; 75,1]	62,0 [40,1; 74,2]	63,5 [41,6; 72,0]	нд
Лікування					
Бета-адреноблокатори	101 (87,1 %)	41 (87,2 %)	43 (86,0 %)	17 (89,5 %)	нд
ІАПФ/БРА	85 (73,3 %)	34 (72,3 %)	37 (74,0 %)	14 (73,7 %)	нд
АМР	57 (49,1 %)	25 (53,2 %)	23 (46,0 %)	9 (47,4 %)	нд
Петльовий діуретик	112 (96,6 %)	45 (95,7 %)	49 (98,0 %)	18 (94,7 %)	нд

Дані наведено у вигляді медіани [нижній квартиль; верхній квартиль], середнього значення ± стандартне відхилення або кількості випадків та частки у %. нд – недостовірно; САТ – систолічний артеріальний тиск; ДАТ – діастолічний артеріальний тиск; СН – серцева недостатність; ЛП – ліве передсердя; ЛА – легенева артерія; ІКДО ЛШ – індекс кінцеводіастолічного об'єму лівого шлуночка; ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації; ІАПФ – інгібітор ангіотензинперетворювального ферменту; БРА – блокатори рецепторів ангіотензину ІІ, АМР – антагоністи мінералокортикоїдних рецепторів. * – різниця показника статистично значуща порівняно з таким у хворих з генотипом ТТ (р=0,02).

стереження, в той час як половина носіїв ТС та СС – відповідно 9 та 6 місяців. Криві виживання значуще розрізнялися між групами пацієнтів – носіїв генотипу ТТ та генотипу СС (log-rank 5,304; р=0,021) *(рис. 1)*.

При порівнянні груп пацієнтів – носіїв генотипу ТС та генотипу ТТ – статистично значущих відмінностей не виявлено; такі ж дані отримали при порівнянні носіїв генотипів ТС і СС.

Для зіставної оцінки клінічного прогнозу в групах з різними генотипами поліморфізму сьомого екзона G894T гена *eNOS*, носіїв відповідного рідкісного генотипу ТТ, враховуючи їх малочисельність, об'єднали в одну групу з гетерозиготами GT (GT+TT) (n=45). У половини хворих з генотипом GG (n=42) перша госпіталізація була зумовлена погіршанням ХСН упродовж 13 місяців з моменту спостереження. Для носіїв алеля Т цей показник становив 11 місяців, але статистично значущої різниці при порівнянні не виявлено (log-rank 1,271; р=0,446).

У 37 (39,4 %) із 94 пацієнтів при тривалому спостереженні була зареєстрована ССС. У носіїв генотипу ТТ поліморфізму T(–786)C гена *eNOS* смертність становила 39,5 %, у гетерозигот ТС – 33,3 %, у носіїв СС – сягала 52,9 %. Криві виживан-

Таблиця 2

Клінічна характеристика хворих з генотипами GG, GT і TT поліморфізму G(894)T гена eNOS

Показник	Генотип GG (n=65)	Генотип GT (n=39)	Генотип TT (n=12)	p, GG vs TT
Вік, роки	65,0 [57,0; 71,0]	68,0 [54,0; 72,0]	57,0 [51,8; 65,3]	нд
Чоловіки	49 (75,4 %)	28 (73,7 %)	10 (83,3 %)	нд
САТ, мм рт. ст.	120,0 [110,0; 140,0]	120,0 [115,0; 130,0]	120,0 [112,8; 130,0]	нд
ДАТ, мм рт. ст.	80,0 [70,0; 90,0]	80,0 [70,0; 80,0]	75,0 [70,0; 88,8]	нд
ЧСС за 1 хв	85,0 [72,8; 100,0]	80,0 [70,0; 86,0]	79,0 [68,0; 93,5]	нд
Артеріальна гіпертензія	56 (86,2 %)	42 (81,0 %)	10 (83,3 %)	нд
ІМ	22 (33,8 %)	13 (33,3 %)	4 (33,3 %)	нд
Фібриляція передсердь	42 (64,4 %)	24 (61,5 %)	12 (66,6 %)	нд
Тривалість СН, роки	2,0 [1,0; 4,0]	2,0 [1,0; 4,0]	2,0 [0,7; 4,8]	нд
ФК за NYHA	2,7±1,0	2,6±1,1	2,7±1,0	нд
ФВЛШ, %	34,0 [25,0; 40,0]	35,0 [30,0; 43,0]	33,5 [27,8; 38,0]	нд
ІКДО ЛШ, мл/м^2	94,5 [78,9; 122,2]	87,1 [74,1; 112,2]	93,4 [82,1; 107,2]	нд
Поперечний розмір ЛП, мм	50,5 [46,3; 54,8]	49,3 [46,5; 52,2]	50,2 [45,2; 53,8]	нд
Систолічний тиск у ЛА, мм рт. ст.	55,0 [45,0; 65,0]	60,0 [45,0; 65,0]	55,0 [55,0; 65,0]	нд
ШКФ (EPI), мл/(хв · 1,73 м^2)	63,8 [40,2; 80,1]	68,6 [38,3; 76,9]	62,5 [41,4; 77,3]	нд
Лікування				
Бета-адреноблокатори	58 (89,2 %)	33 (84,6 %)	10 (83,3 %)	нд
ІАПФ/БРА	46 (78,3 %)	30 (76,9 %)	9 (75,0 %)	нд
АМР	32 (49,2 %)	20 (51,3 %)	5 (41,8 %)	нд
Петльовий діуретик	62 (95,4 %)	38 (97,4 %)	12 (100,0 %)	нд

Дані наведено у вигляді медіани [нижній квартиль; верхній квартиль], середнього значення ± стандартне відхилення або кількості випадків та частки у %.

ня статистично значуще відрізнялися між групами носіїв генотипу ТТ та генотипу СС (log-rank 4,011; p=0,045) *(рис. 2)*.

Уніваріантний регресійний аналіз за Коксом встановив, що предикторами ССС в обстежених пацієнтів є ФВЛШ, ПЗВД та генотип СС поліморфізму Т(–786)С гена *eNOS*. При мультиваріантному аналізі незалежними предикторами ССС були величина ФВЛШ та показник ПЗВД *(табл. 3)*.

При дослідженні ССС у хворих з генотипом GG та носіїв алеля Т поліморфізму сьомого екзона G894T гена *eNOS* статистично значущої різниці не виявлено (log-rank 1,425; p=0,631).

ОБГОВОРЕННЯ

У результаті дослідження було встановлено, з одного боку, наявність у пацієнтів з ХСН – носіїв генотипу СС поліморфізму Т(–786)С або ТТ генотипу поліморфізму G894T гена *eNOS* – більш вираженого порушення вазодилататорної функції ендотелію, з другого – зв'язку наявності генотипу СС поліморфізму Т(–786)С з гіршим довготерміновим клінічним прогнозом.

Оксид азоту, що синтезується ферментом eNOS, є одним із найпотужніших факторів розслаблення гладенької мускулатури [24]. Зменшення його біодоступності лежить в основі

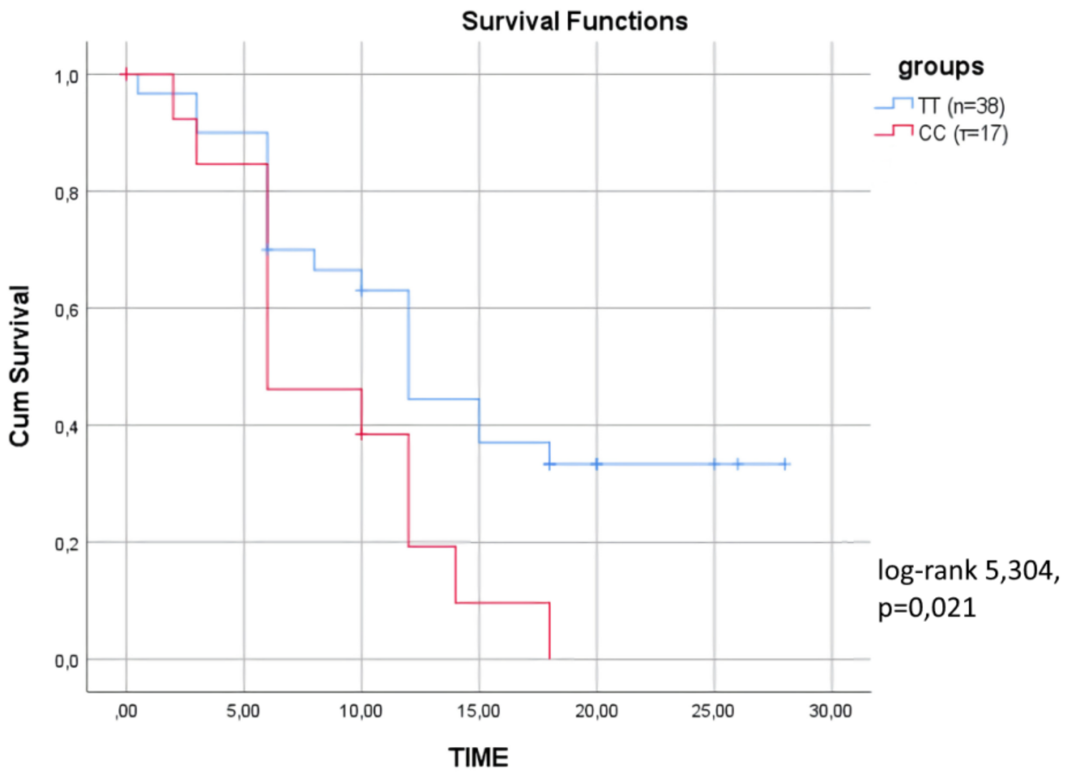

Рис. 1. **Кумулятивні криві настання події «Госпіталізація внаслідок декомпенсації СН» носіїв генотипів ТТ і СС поліморфізму Т(–786)С гена *eNOS*.**

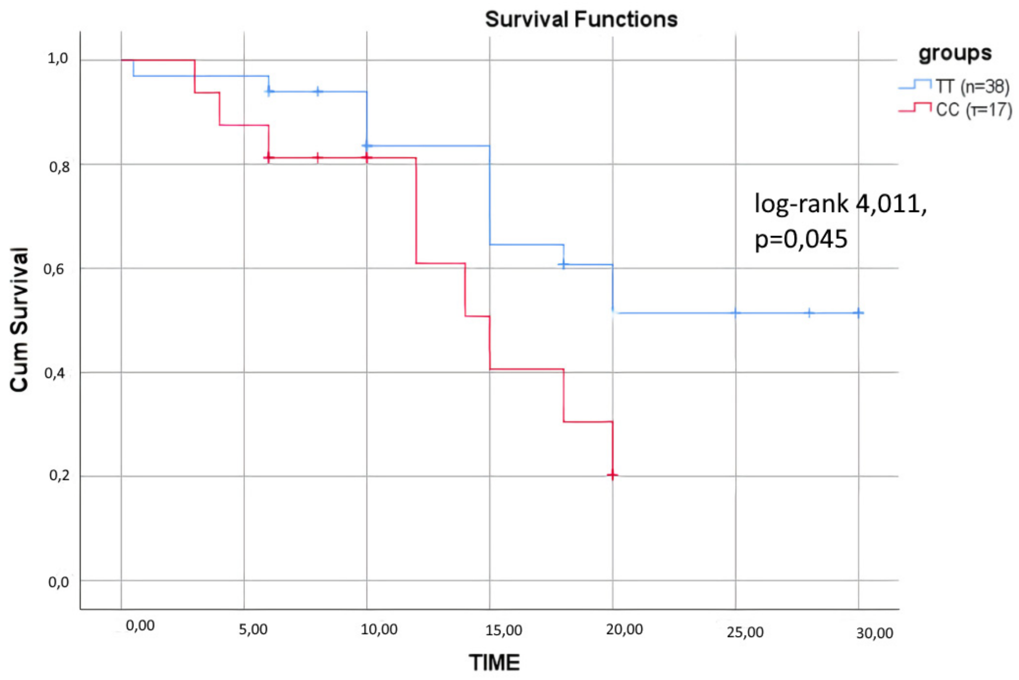

Рис. 2. **Кумулятивні криві настання події «Смерть від серцево-судинної причини» носіїв генотипів ТТ і СС поліморфізму Т(–786)С гена *eNOS*.**

Таблиця 3

Предиктори виживання за даними регресійного аналізу Кокса

Показник	Уніваріантний аналіз			Мультиваріантний аналіз		
	Відносний ризик	95 % ДІ	p	Відносний ризик	95 % ДІ	p
Вік	1,268	0,942–2,028	0,984	–	–	–
ФВЛШ	0,942	0,890–0,987	0,040	0,918	0,860–0,979	0,042
ПЗВД	0,810	0,678–0,969	0,021	0,81	0,669–0,980	0,031
СС проти ТТ генотипи	2,405	1,013–5,711	0,047	0,667	0,255–1,746	0,409

ендотеліальної дисфункції при серцево-судинній патології, зокрема і при ХСН [1, 7, 27]. Зменшення біодоступності NO може бути зумовлено, з одного боку, зниженням його синтезу, а з другого – збільшенням його інактивації, зокрема вільними радикалами кисню [20]. Фермент eNOS в ендотеліоцитах активується під дією пульсуючого кровоплину, який спричинює напругу зсуву; остання, своєю чергою, активує калієві канали мембран ендотеліальних клітин та призводить до збільшення потоку в них іонів кальцію [28]. Водночас іони кальцію стимулюють eNOS, наслідком чого є синтезування ендотеліального NO [28]. В умовах ХСН закономірно знижується пульсуючий кровоплин, і, відповідно, напруга зсуву, що призводить до зменшення активації ферменту eNOS [11, 15, 28]. Зниження синтезу NO може бути зумовлене також зміною активності та/або кількості ферменту eNOS унаслідок поліморфізму гена, що його кодує [6, 25]. Функціональне значення та зв'язок із серцево-судинними захворюваннями найбільш вивчений для трьох поліморфних варіантів гена *eNOS*: поліморфізм промотора T(–786)C, сьомого екзона G894T (Glu289Asp) та четвертого інтрона 4a/b [31].

Поліморфізм промотора T(–786)C гена *eNOS* полягає в заміні азотистої основи тимідину (T) на цитозин (C) у положенні –786 і, за експериментальними даними, асоціюється з меншою експресією eNOS [25]. A.A. Doshi та співавтори, досліджуючи зразки тканини міокарда хворих із ХСН, відзначили статистично значуще меншу кількість матриксної РНК ферменту eNOS у гомозигот CC поліморфізму промотора T(–786)C, порівняно з носіями алеля T (гомозиготи TT та гетерозиготи TC) [6]. Подібні дані були отримані й іншими дослідниками, що вивчали міокард хворих із ХСН, яким була проведена трансплантація серця [25]; в носіїв алеля C (TC та CC генотипи) кількість матриксної РНК гена *eNOS* була меншою та, відповідно, була меншою кількість ферменту eNOS у тканині міокарда [25]. Такі експериментальні дані підтверджуються клінічними дослідженнями, згаданими нижче.

Поліморфізм сьомого екзона G894T (Glu289Asp) характеризується заміною азотистої основи гуанін (G) на тимін (T) у положенні 894 сьомого екзона гена *eNOS*, що призводить до заміни глутамінової (Glu) амінокислоти на аспарагінову (Asp) у 289 позиції білка eNOS. Зазначена заміна амінокислот відбувається в оксигеназному домені ферменту eNOS, який не відповідає за його активність. Більшість експериментальних досліджень не підтверджують гіпотезу, що фермент eNOS із заміненою амінокислотою має нижчу активність [6, 12], проте його фізико-хімічні властивості в культурі клітин змінюються, що може призводити до його швидшого розпаду [34].

Вплив поліморфізму T(–786)C та G894T гена *eNOS* на ендотеліальну функцію. A. Imamura та співавтори оцінювали влив поліморфізму T(–786)C гена *eNOS* на ендотеліальну функцію серед здорових молодих чоловіків. Носії алеля C демонстрували меншу ПЗВД порівняно з гомозиготами TT [13]. Водночас в іншому дослідженні не виявлено зв'язку поліморфізму T(–786)C з ПЗВД серед здорових добровольців, тоді як гомозиготи TT поліморфізму G894T мали нижчі її значення порівняно з носіями алеля G [26]. I.F. Metzger та співавтори досліджували T(–786)C, 4a/b, та G894T поліморфізми гена *eNOS* серед 179 здорових афроамериканців. Жоден із поліморфізмів окремо не впливав на рівень нітритів у плазмі (опосередкований показник рівня NO в плазмі), тоді як носії гаплотипу C-4b-G мали статистично значуще нижчі їх рівні [23]. G. Rossi та співавтори

виявили гіршу ендотелійзалежну вазодилатацію, визначену методом венозної плетизмографії, в пацієнтів з гіпертонічною хворобою, які мали алель C поліморфізму T(–786)C [30], у той час як інші дослідники серед подібної когорти пацієнтів такого зв'язку не знайшли [4].

Такі ж суперечливі дані отримані і в пацієнтів з ІХС. S. Erbs та співавтори визначили гіршу ендотелійзалежну вазодилатацію грудної артерії в носіїв алеля C, яким виконували аортокоронарне шунтування, порівняно з носіями генотипу TT поліморфізму T(–786)C гена *eNOS* [8]. В іншому дослідженні було виявлено вплив поліморфізму T(–786)C на ступінь вираження атеросклерозу вінцевих артерій, який оцінювали за даними коронароангіографії; більше того, в носіїв алеля C були статистично значуще меншими рівень експресії гена *eNOS* та концентрація NO в плазмі [17]. Водночас E. Ingelsson та співавтори, вивчаючи 23 поліморфних варіанти гена *eNOS* серед осіб похилого віку, визначили, що лише поліморфізм G894T впливав на ПЗВД [14].

Ми не знайшли попередніх досліджень, в яких вивчався би вплив поліморфізму T(–786)C та G894T гена *eNOS* на ендотеліальну функцію у хворих з ХСН.

Поліморфізми T(–786)C та G894T гена *eNOS* і клінічний прогноз у пацієнтів з ХСН. N.C. Martinelli та співавтори показали, що в афроамериканців із систолічною ХСН носії гаплотипу C(–786)/4b/Asp298 мали кращу виживаність порівняно з іншими хворими [21], тоді як кожен із трьох поліморфізмів окремо серед цього клінічного контингенту не впливав на прогноз. Серед представників білої раси впливу поліморфізмів гена *eNOS* на клінічний прогноз не виявлено [21]. Водночас D.M. McNamara та співавтори визначили зв'язок алеля Asp298 з гіршою виживаністю в пацієнтів білої раси із систолічною ХСН, особливо неішемічного генезу [22]. Подібні ж дані отримали K.M. Kim та співавтори: носії генотипу Asp298Asp поліморфізму гена *eNOS* мали вищу частоту госпіталізацій, зумовлених погіршанням перебігу ХСН [18].

Цілком імовірно, що наведені вище суперечливі дані про вплив поліморфізмів гена *eNOS* на клінічний прогноз ХСН пов'язані з відмінностями етнічних характеристик у зазначених дослідженнях.

S. Tersi та співавтори вивчали вплив поліморфізму T(–786)C гена *eNOS* на довгостроковий прогноз у хворих із систолічною ХСН. Були отримані дані подібні до наших, а саме: носії генотипу CC мали статистично значуще вищий рівень смертності від серцево-судинних причин порівняно з носіями генотипу TT [33].

Обмеження дослідження. Виконане дослідження має певні обмеження. По-перше, отримані дані базуються на когорті пацієнтів, які спостерігалися лише в одному клінічному центрі. По-друге, зміни доз рекомендованої стандартної фармакотерапії під час спостереження були доступні лише частково, і тому не могли бути враховані в остаточному аналізі.

ВИСНОВКИ

1. У пацієнтів із систолічною хронічною серцевою недостатністю генотип CC T(–786)C поліморфізму гена *eNOS* асоціюється з більш ранньою маніфестацією клінічних проявів цього синдрому, більш вираженою ендотеліальною дисфункцією та гіршим довготерміновим клінічним прогнозом порівняно з носіями генотипу TT.

2. Носії генотипу TT поліморфізму G894T мають більш виражену ендотеліальну дисфункцію порівняно з гомозиготами GG, однак малочисельність групи не дає змоги провести відокремлений статистичний аналіз щодо її впливу на клінічний прогноз хронічної серцевої недостатності.

3. Отримані докази зв'язку гомозиготного стану CC T(–786)C поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази з клінічним перебігом хронічної серцевої недостатності обґрунтовують доцільність скринінгової оцінки зазначеного вище генотипу з метою формування груп активного клінічного спостереження.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція роботи – Л.В., Н.Г.; збір матеріалу – І.М., Н.Г.; статистичне опрацювання даних, написання статті – І.М.; редагування статті – Л.В.

Література

1. Barton M, Haudenschild CC. Endothelium and patherogenesis: endothelial therapyrevisited. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:23–5. https://doi.org/10.1097/00005344-200111002-00007.
2. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adultsat risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340:1111–5. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)93147-f .
3. Çiftçi Ç, Melil S, Çebi Y, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids Health Dis.* 2008;7:5. https://doi.org/10.1186/1476-511x-7-5.
4. Dell'Omo G, Penno G, Pucci L, et al. Lack of association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, microalbuminuria and endothelial dysfunction in hypertensive men. *J Hypertens.* 2007;25(7):1389–95. https://doi.org/10.1097/hjh.0b013e3281268548.
5. Dosenko V, Zagoriy V, Lutay Y, et al. Allelic polymorphism in the promoter (T–786→C), but not in exon 7 (G894→T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population. *Exp Clin Cardiol.* 2006;11(1):11–3.
6. Doshi AA, Ziolo MT, Wang H, et al. A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium. *J Card Fail.* 2010;16(4):314–9. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.12.013 .
7. Drexler H, Hayoz D, Munzel T, et al. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1992;69:1596–1601. https://doi.org/10.1016/0002-9149(92)90710-g.
8. Erbs S, Möbius-Winkler S, Linke A, et al. Both T-786C and G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affect in-vitro endothelium-dependent relaxation of internal mammary artery rings from patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006;13(5):826–31. https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000230100.70900.37.
9. Fellmann F, van El CG, Charron Ph, et al. European recommendations integrating genetic testing into multidisciplinary management of sudden cardiac death. *Eur J Hum Genet.* 2019;27(12):1763–73. https://doi.org/10.1038/s41431-019-0445-y.
10. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation or death. *Eur Heart J.* 2005;26(1):65–9. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi001.
11. Giannitsi S, Bougiakli M, Bechlioulis A, et al. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2019;8:1–7. doi: 10.1177/2048004019843047.
12. Golser R, Gorren AC, Mayer B, et al. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide.* 2003;8:7–14.
13. Imamura A, Takahashi R, Murakami R, et al. The effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on endothelial function and metabolic risk factors in healthy subjects: the significance of plasma adiponectin levels. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(2):189–95. https://doi.org/10.1530/eje-07-0632.
14. Ingelsson E, Syvänen AC, Lind L. Endothelium-dependent vasodilation in conduit and resistance vessels in relation to the endothelial nitric oxide synthase gene. *J Hum Hypertens.* 2008;22(8):569–78. https://doi.org/10.1038/jhh.2008.37.
15. Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, et al. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10(1):4–18. https://doi.org/10.2174/157016112798829760.
16. Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, et al. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2005;111(3):310–4. https://doi.org/10.1161/01.cir.0000153349.77489.cf.
17. Khalil M, Soltanpour MS, Kamali K. Assessment of the role of plasma nitric oxide levels, T-786C genetic polymorphism, and gene expression levels of endothelial nitric oxide synthase in the development of coronary artery disease. *J Res Med Sci.* 2017;22:34. https://doi.org/10.4103/1735-1995.202144.
18. Kim KM, Murray MD, Tu W, et al. Pharmacogenetics and health care out comes in patients with chronic heart failure. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68(11):1483-91. DOI: 10.1007/s00228-012-1280-z.
19. Lombardi WL, Gilbert EM. Carvedilol in the failing heart. *Clin Cardiol.* 2001;24(12):757–66. https://doi.org/10.1002/clc.4960241202.
20. Lopez FA, Casado S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001;38:1400–5. https://doi.org/10.1161/hy1201.099612.
21. Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis. *Nitric Oxide.* 2012;26(3):141–7. https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.01.003.
22. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Effect of the Asp^{298} variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2003;107(12):1598–602. https://doi.org/10.1161/01.cir.0000060540.93836.aa.
23. Metzger IF, Ishizawa MH, Rios-Santos F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(6):393–9. https://doi.org/10.1038/tpj.2010.52.
24. Mudau M, Genis A, Lochner A, et al. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr.* 2012;23:222–231. https://doi.org/10.5830/cvja-2011-068.
25. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, et al. T^{-786}→C mutation in the 5′-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999;99:2864–70. https://doi.org/10.1161/01.cir.99.22.2864.
26. Paradossi U, Ciofini E, Clerico A, et al. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu298→Asp and T-786→C polymorphisms. *Stroke.* 2004;35(6):1305→9. https://doi.org/10.1161/01.str.0000126482.86708.37.
27. Park KH, Park WJ. Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *J Korean Med Sci.* 2015;30(9):1213–25. https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.9.1213 .

28. Petroff MG, Kim SH, Pepe S, et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca^{2+} release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol.* 2001;3:867–73. https://doi.org/10.1038/ncb1001-867.
29. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2016;37:2129–200. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128.
30. Rossi G, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, et al. The $T^{-786}C$ and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(6):938–45. https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)03011-5.
31. Senthil D, Raveendran M, Shen Y, et al. Genotype-dependent expression of Endothelial nitric oxide syntase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cell. *DNA Cell Biol.* 2005;24:218–24. https://doi.org/10.1089/dna.2005.24.218.
32. Shampa Nasreen, Toru Nabika, Hiroshi Shibata. T–786C Polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:605–10. https://doi.org/10.1161/01.atv.0000013286.60021.fe.
33. Terzi S, Emre A, Yesilcimen K, et al. The endothelial nitric oxide synthase (NOS3–786T>C) genetic polymorphism in chronic heart failure: effects of mutant -786C allele on long-term mortality. *Acta Cardiol Sin.* 2017;33(4):420–8. doi: 10.6515/ACS20161215B.
34. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:832–2835. https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2832.
35. Vecoli C, Andreassi MG, Liga R, et al. T−786→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with insulin resistance in patients with ischemic or non ischemic cardiomyopathy. *BMC Med Genet.* 2012;13:92. https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-92.
36. Veverka A, Salinas JL. Nebivolol in the treatment of chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):647–54.
37. Wenquan Niu, Yue Qi An. Updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS One.* 2011;6(9):e24266. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024266.
38. Yoshihiro Miyamoto, Yoshihiko Saito, Noboru Kajiyama, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998;32:3–8. https://doi.org/10.1161/01.hyp.32.1.3.
39. Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dubé MP, et al. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(5):742–51. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03091.x.
40. Zigra A, Rallidis LS, Anastasiou G, et al. eNOS gene variants and the risk of premature myocardial infarction. *Dis Markers.* 2013;34(6):431-6. https://doi.org/10.1155/2013/235056.

The link of T(−786)C and G894T polymorphisms of the endothelial NO-synthase gene with endothelial vasodilatory function and long-term clinical prognosis in patients with chronic heart failure and reduced left ventricular ejection fraction

L.G. Voronkov [1], I.D. Mazur [1], N.G. Gorovenko [2]

[1] National Scientific Center «M.D. Strazhesko Institute of Cardiology» of NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2] Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The aim – chronic heart failure (CHF) is associated with endothelial dysfunction. The pivotal role of nitric oxide in the maintenance of endothelial function (EF) is well-known. But it is unknown whether endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) gene polymorphismis associated with both EF and clinical outcomes in systolic CHF.

Materials and methods. 116 stable (NYHA II–III) ischemic CHF patients with left ventricular ejection fraction (LVEF) ≤ 45 % were examined. Flow-mediated vasodilation (FMVD) of *a. brachialis* was carried out by standard cuff test. Patients were followed-up for a median of twenty months to determine long-term outcomes. The frequency of T(−786)C genotypes was: TT – 40.5 % (n=47), TC – 43.1 % (n=50), CC – 16.4 % (n=19); the frequency of G894T genotypes was: GG 56.0 % (n=65), GT 33.6 % (n=39), TT 10.4 % (n=12).

Results and discussion. FMVD in patients with TT genotype of T(−786)C polymorphisms was 7.2 [4.7; 8.3] %, in patients with TC – 6.6 [4.4; 9.1] %, where as FMVD in patients with genotype CC was 4.7 [2.8; 6.0] %, p=0.034 for TT vs. CC; p=0.046 for TC vs. CC. FMVD in patients with GG genotype of G894T polymorphisms was 7.1 [4.3; 9.4] %, in patients with GT – 6.2 [5.1; 8.1] %, in patients with genotype TT was 4.2 [2.5; 5.3] %. The difference between FMVD was significant only TT vs. CC – p=0.030. The patients with CC genotype demonstrated a significantly higher heart failure hospitalization rate (log-rank 5.304, p=0.021) and higher cardiovascular (CV) mortality rate (log-rank 4.011, p=0.045) as compared with the TT homozygote group. LVEF, FMVD, and CC genotype were the predictors of CV mortality in univariate Cox regression analysis, and only LVEF and FMVD in multivariate Cox model. Long-term outcomes were similar in patients with GG, GT and TT genotypes of G894T polymorphisms.

Conclusion. In stable ischemic systolic CHF CC T(−786)C eNOS genotype is associated with worse FMVD response and worse long-term outcome versus TT T(−786)C eNOS genotype. TT G(984)T eNOS genotype is associated with worse FMVD response only, but not with long-term outcomes versus GG G(894)T eNOS genotype.

Key words: heart failure, endothelial nitricoxide synthase, T(−786)C gene polymorphism, G(984)T gene polymorphism, long-term outcome.