

УДК 591.151.3:616.12:616.379-008.6-053.2/6

[https://doi.org/10.24026/1818-1384.2\(62\).2018.135451](https://doi.org/10.24026/1818-1384.2(62).2018.135451)

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕГУЛЯЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА, И КАРДИОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ РИСКИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА



О.Н. Сулаева¹, С.В. Гончаров², А.С. Ларин¹

¹Украинский научно-практический центр эндокринной хирургии, трансплантации эндокринных органов и тканей МОЗ Украины

²Институт физиологии им. А.А. Богомольца



ВВЕДЕНИЕ

Ожирение и сахарный диабет (СД) 2 типа ассоциированы с глубокими нарушениями метаболизма и развитием кардиоваскулярных осложнений [4]. Одним из патогенетических механизмов кардиометаболических осложнений считается эндотелиальная дисфункция, сопровождающаяся повышением уровня эндотелинов, мишенями которых являются клетки практически всех тканей и органов [1, 6, 8]. Система эндотелина (EDN) включает три изоформы эндотелина (EDN1, EDN2 и EDN3), представляющие собой 21-аминокислотные пептиды [11]. Эффекты данных молекул на клетки-мишени реализуются через активацию двух видов рецепторов (EDNRA и EDNRB), связь которых с лигандом сопровождается активацией нескольких сигнальных путей [8]. EDNRA обладает высокой аффинностью к EDN1 и EDN2, но слабо связывается с EDN3, тогда как EDNRB демонстрирует схожую аффинность ко всем лигандам [4]. Активация EDNRA и EDNRB опосредует многие важные эффекты эндотелинов, включая вазоконстрикцию, ремоделирование сосудов, прооксидантный и провоспалительный эффекты, пролиферацию и дифференцировку клеток [5]. Кроме того, эндотелины стимулируют секреторную активность клеток фибробластического ряда, повышают продукцию и накопление коллагена, регулируют продукцию адипокинов и липолиз в белых адипоцитах, модулируют чувствительность клеток к инсулину [8]. При этом EDNRA экспрессируются преимущественно

на гладких миоцитах сосудов, и их стимуляция сопровождается выраженной вазоконстрикцией [6, 13]. Не удивительно, что данному типу рецепторов отводится важная роль в патогенезе таких заболеваний и состояний, как артериальная гипертензия, атеросклероз, и постинфарктное ремоделирование миокарда [2, 6, 9]. В отличие от этого, активация EDNRB, экспрессируемых преимущественно на клетках сосудистого эндотелия, имеет противоположный эффект [8]. Это связано со стимуляцией эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3) и повышением уровня NO, обеспечивающего поддержание эндотелиального гомеостаза [1]. В литературе приведено немало фактов, демонстрирующих роль дефицита экспрессии NOS3 и эндотелинов в развитии сердечно-сосудистой патологии и сахарного диабета [2, 12]. Однако до сих пор мало данных о роли генетического полиморфизма рецепторов к эндотелину и eNOS в развитии кардиоваскулярных осложнений СД 2 типа.

Цель работы – оценить роль полиморфизма генов рецепторов к эндотелину и eNOS в развитии кардиоваскулярных осложнений СД 2 типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы Украинского научно-практического центра эндокринной хирургии, трансплантации эндокринных органов и тканей МОЗ Украины «Патогенез молекулярно-генетичних порушень жирового та вуглеводного

Сулаева О.Н., д. мед. н., проф., ведущий научный сотрудник отдела патологии; E-mail: oksana.sulaeva@gmail.com; ORCID: orcid.org/0000-0002-9614-4652. Гончаров С.В., научный сотрудник отдела общей и молекулярной патофизиологии; ORCID: orcid.org/0000-0001-7800-0121. Ларин Александр Сергеевич, д. мед. н., проф., директор УПНЦЭХ,ТЭОиТ МОЗ Украины; 01021 г. Киев, Кловский спуск, 13-А; ORCID: orcid.org/0000-0002-5090-5110.

Характеристики груп пацієнтів, включених в дослідження

Характеристики пацієнтів	Основна група	Група порівняння	p
Кількість пацієнтів	120	60	
Жінки/чоловіки	59/61 (49,2/51,8%)	31/29 (51,7/49,3%)	p=0,868
Вік, років	57,07±0,56	54,0±1,70	p=0,200
Избыточный вес (количество пациентов с ИМТ 25 и выше)	104 (86,6%)	24 (40%)	p<0,0001
Ожирение (количество пациентов с ИМТ 30 и выше)	42 (35%)	6 (10%)	p<0,0001
ИМТ	29,84±0,50	24,6±1,18	p<0,0001
Гипертензия	101 (84,2%)	16 (26,7%)	p<0,0001
ИБС	73 (60,8%)	8 (13,3%)	p<0,0001
Сердечная недостаточность	53 (44,2%)	9 (15,03%)	p=0,0006
Атеросклеротическое поражение церебральных артерий	76 (63,3%)	13 (21,7%)	p<0,0001
Атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей	64 (53,3%)	1 (1,77%)	p=0,0001
Систолическое АД, мм рт. ст.	132,12±3,71	140,9±1,71	p=0,025
Диастолическое АД, мм рт. ст.	78,80±1,64	84,5±0,96	p=0,003

обміну за цукрового діабету 2 типу та оптимізація цукрознижувальної терапії» (№ державної реєстрації 0116U003041). Основну групу склали 120 пацієнтів з СД 2 типу. Групу порівняння склали 60 пацієнтів аналогічного віку. З дослідження були виключені пацієнти, що отримують інсулінотерапію, пацієнти в віці молодше 35 років і старше 70 років, пацієнти, що страждають СД 1 типу або злоякісними новоутвореннями. При аналізі взаємозв'язку кардіометаболічних ризиків з генетичними факторами враховували наступні клінічні параметри: вік, стать, індекс маси тіла (ІМТ), наявність артеріальної гіпертензії,

діабетическої ретинопатії, атеросклеротического ураження судин (аорти, церебральних судин, судин нижніх кінцівок, коронарних судин), значимі зміни геометрії серця (наявність гіпертрофії і/або дилатації камер), діастолічеська дисфункція, підтвержені інструментальними методами, оцінювали їх взаємозв'язок з тривалістю захворювання і показателями лабораторних досліджень. При аналізі лабораторних даних враховували рівень глюкози натощак, концентрацію глікозилюваного гемоглобіна, показники ліпидограми.

Для оцінки генетических поліморфізмів

Влияние различных факторов на развитие атеросклеротического поражения сосудов у пациентов с гипертензией и сахарным диабетом

Показатели	ОШ (95% ДИ)	p
rs5351	1,43 (1,03-2,0)	p=0,035
rs1799983	1,19 (0,83-1,69)	p=0,328
Пол (мужской)	1,40 (1,00-1,92)	p=0,056
Длительность диабета	0,96 (0,94-0,98)	p<0,001
Базальный уровень HbA1c	1,88 (1,65-2,16)	p<0,001

периферическую кровь собирали в пробирки с EDTA. Экстракцию геномной ДНК проводили с использованием набора «QIAamp DNA Blood Mini Kit» (QIAGEN, США) в соответствии с инструкцией производителя. Генотипирование EDRA, EDRB NOS3 для полиморфных сайтов было выполнено с использованием коммерчески доступных флюорогенных тестов для аллельного дискриминационного анализа (TaqMan) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. При анализе полиморфизмов генов, вовлеченных в регуляцию функционального состояния эндотелия и развития эндотелиальной дисфункции, оценивали: частоту генотипов изучаемых видов полиморфизмов отдельных нуклеотидов (SNPs) в основной группе и группе сравнения, частоту аллелей, их ассоциацию с разными вариантами кардиоваскулярных нарушений в обеих группах [7]. В работе проведена оценка генотипов следующих SNPs: NOS3 (rs1799983), EDNRA (rs6842241) и EDNRB (rs5351). Различия между основной группой и группой сравнения анализировали с использованием t-теста и U-теста Манна-Уитни. При анализе возможных ассоциаций между генотипами и кардиоваскулярными рисками использовали χ^2 -тест. Для анализа связи между генотипами и кардиоваскулярными рисками использовали логистическую регрессию [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристики пациентов основной группы и группы сравнения представлены в таблице 1. Пациенты обеих групп были сопоставимы

по возрасту и полу. При сравнении групп были выявлены статистически значимые различия показателя ИМТ: среди больных с СД 2 типа встречаемость избыточного веса и ожирения были значительно выше, чем в группе сравнения, что отражает хорошо известный факт об ассоциации между избыточным весом и СД 2 типа. Закономерно, что наличие СД 2 типа было ассоциировано с более высокой частотой артериальной гипертензии, атеросклеротического поражения сосудов разных бассейнов, ИБС и сердечной недостаточности ($p < 0,001$).

Выбранные для анализа потенциальных механизмов, предрасполагающих к развитию кардиоваскулярных осложнений у пациентов с СД 2 типа, варианты полиморфизмов были напрямую связаны с регуляцией эндотелиального гомеостаза. Одним из наиболее показательных биомаркеров последнего считается NOS3 – фермент, обеспечивающий продукцию оксида азота (NO). NO реализует не только эндотелий зависимую вазодилатацию, но также цитопротекцию и антиагрегантный эффект, предотвращая тромбообразование и атеросклеротическое поражение сосудистой стенки [5]. Среди различных вариантов полиморфизмов гена NOS3, одним из наиболее клинически значимых и хорошо изученных является rs1799983, также известный как Glu298Asp, E298D, или G894T [1]. Этот вариант полиморфизма гена NOS3, по данным литературы, ассоциирован с риском развития гипертензии и других вариантов кардиоваскулярной патологии [4, 10]. Анализ rs1799983 среди пациентов, вовлеченных в данное

исследование, показал отсутствие ассоциации полиморфизма rs1799983 с развитием СД 2 типа. При анализе роли полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота в развитии кардиоваскулярных осложнений среди пациентов с диабетом мы также не выявили статистически значимой ассоциации между разными генотипами rs1799983 и наличием разных вариантов кардиоваскулярных нарушений. Однако в общей выборке обследованных пациентов обеих групп была верифицирована ассоциация между наличием Т аллеля NOS3 Glu298Asp SNP и развитием гипертензии ($p=0,028$).

Анализ полиморфизма rs5351 гена EDNRB, кодирующего тип В рецепторов к эндотелину, показал, что EDNRB-rs5351 SNP не был взаимосвязан с риском развития СД 2 типа, равно как и с развитием артериальной гипертензии и сердечной недостаточности. Однако при этом выявлена связь полиморфизма rs5351 с атеросклеротическим поражением коронарных сосудов (ИБС) ($p=0,0092$) и церебральных артерий ($p=0,01$) в общей выборке пациентов. Выявленные факты перекликаются с данными литературы о взаимосвязи EDNRB-rs5351 SNP с ожирением и атеросклерозом, хотя в пределах выборки данного исследования мы не обнаружили статистически значимой ассоциации полиморфизма гена EDNRB с наличием избыточного веса/ожирения и показателями липидограммы.

Анализ роли полиморфизма гена EDNRA неожиданно выявил наличие взаимосвязи rs6842241 с развитием СД 2 типа ($p=0,0278$). Если в группе сравнения частота генотипов СС и АС была практически эквивалентной (55 и 45% соответственно), то среди пациентов с СД выявлено альтернативное распределение частоты генотипов ($\chi^2=9,732$; $p=0,008$): наиболее распространенным был вариант СС (72,5%), доля гетерозигот АС составила 21,7%, в то же время у части пациентов был выявлен гомозиготный вариант минорного аллеля (5,8%). Выявленный факт может свидетельствовать о роли полиморфизма гена EDNRA в развитии СД 2 типа. Однако в рамках данной работы мы не выявили взаимосвязи между EDNRA-rs6842241 SNP и наличием гипертензии и атеросклеротического поражения сосудов, хотя при этом была зарегистрирована статистически значимая ассоциация данного SNP с риском развития диабетической ретинопатии ($p=0,02$).

В заключительной части работы был проведен

комплексный анализ взаимосвязи SNPs NOS3-rs1799983, EDNRA-rs6842241, EDNRB-rs5351, анамнестических и лабораторных данных пациентов, страдающих СД 2 типа, с сочетанным вариантом поражения сердечно-сосудистой системы (наличием атеросклеротического поражения сосудов на фоне гипертензии), подтвержденным инструментально. Результаты анализа не выявили роли полиморфизма NOS3-rs1799983, однако подтвердили роль EDNRB-rs5351 SNP в развитии сочетанного поражения сердечно-сосудистой системы у пациентов с СД 2 типа (отношение шансов [ОШ] 1,43; 95% доверительный интервал [ДИ] от 1,03 до 2,0; $p=0,035$). Важно отметить, что развитие кардиоваскулярных осложнений у пациентов с СД 2 типа в большей мере зависело от таких показателей как длительность СД (ОШ 0,96; 95% ДИ 0,94-0,98; $p < 0,001$) и базальный уровень гликозилированного гемоглобина (ОШ 1,88; 95% ДИ 1,65-2,16; $p < 0,001$) (табл. 2), отражающий по сути степень декомпенсации СД 2 типа.

ВЫВОДЫ

Анализ роли полиморфизмов генов, вовлеченных в регуляцию эндотелиального гомеостаза, не выявил ассоциации между NOS3-rs1799983 и EDNRB-rs5351 SNPs и развитием СД, хотя при этом была зарегистрирована связь между АА генотипом полиморфного сайта rs6842241 с развитием СД 2 типа. Развитие кардиоваскулярных осложнений на фоне гипертензии у пациентов с СД 2 типа было ассоциировано с полиморфизмом EDNRB-rs5351 ($p=0,035$), но в большей степени зависело от длительности диабета и уровня гликозилированного гемоглобина.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Brownlee M.* Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414:813-820.
2. *Dedoussis GVZ, Kaliora AC.* Genes, Diet and Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. *Rev Diabet Stud.* 2007; 4(1):13-24.
3. *Diez DM, Barr CD, Cetinskaya-Rundel M.* OpenIntro Statistics (3d edition) [Internet]. 2015. Available from: https://www.openintro.org/stat/textbook.php?stat_book=os
4. *Garme Y, Saravani R, Galavi HR.* Association of nitric oxide synthase 3 gene polymorphism with the risk

- of type 2 diabetes. *Biomedical Reports*. 2017; 7:85-89.
5. *Guzik TJ, Cosentino F*. Epigenetics and Immunometabolism in Diabetes and Aging. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Oct 16. doi: 10.1089/ars.2017.7299. [Epub ahead of print].
 6. *Li J, Wei J, Xu P, et al*. Impact of diabetes-related gene polymorphisms on the clinical characteristics of type 2 diabetes Chinese Han population. *Oncotarget*. 2016; 7(51):85464-85471.
 7. *Manea SA, Robciuc A, Guja C, Heltianu C*. Identification of gene variants in NOS3, ET-1 and RAS that confer risk and protection against microangiopathy in type 2 diabetic obese subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 407(3):486-490.
 8. *Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE*. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2004 Apr 28; 291(16):1978-86.
 9. *Sansbury BE, Hill BG*. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2014; 1:383-399.
 10. *Schneider JG, Tilly N, Hierl T, Sommer U, Hamann A, Dugi K, et al*. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am J Hypertens*. 2002; 15:967-972.
 11. *Sing CF, Stengård JH, Kardina SL*. Genes, environment, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1190-1196.
 12. *Yasuda H, Kamide K, Takiuchi S, et al*. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. *J Human Hypertens*. 2007; 21:883-892.
 13. *Zanatta CM, Crispim D, Sortica DA*. Endothelin-1 gene polymorphisms and diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2015; 7:103.

Полиморфизм генов, вовлеченных в регуляцию эндотелиального гомеостаза, и кардиометаболические риски у пациентов с сахарным диабетом 2 типа

О.Н. Сулаева, С.В. Гончаров, А.С. Ларин

Ожирение и сахарный диабет (СД) 2 типа ассоциированы с глубокими нарушениями метаболизма и развитием сердечно-сосудистых осложнений. Однако до сих пор мало данных о роли генетического полиморфизма рецепторов к эндотелину и эндотелиальной синтазы оксида азота

(NOS3) в развитии сердечно-сосудистых осложнений СД 2 типа. Цель работы – оценить роль полиморфизма генов рецепторов к эндотелину и NOS3 в развитии сердечно-сосудистых осложнений СД 2 типа. В работе проведена оценка генотипов пациентов с СД 2 типа и здоровых лиц группы сравнения по следующим однонуклеотидным полиморфизмам (SNPs): NOS3 (rs1799983), EDNRA (rs6842241) и EDNRB (rs5351), а также анализ их взаимосвязи с развитием СД 2 типа и сердечно-сосудистых осложнений. Анализ роли полиморфизмов генов, вовлеченных в регуляцию эндотелиального гомеостаза, не выявил ассоциации между NOS3-rs1799983 и EDNRB-rs5351 SNPs и развитием СД, хотя при этом была зарегистрирована связь между AA генотипом полиморфного сайта rs6842241 и развитием СД 2 типа. Развитие сердечно-сосудистых осложнений на фоне гипертензии у пациентов с СД 2 типа было ассоциировано с полиморфизмом EDNRB-rs5351 ($p=0,035$), но в большей степени зависело от длительности СД и уровня гликозилированного гемоглобина.

Ключевые слова: сахарный диабет, полиморфизм генов, оксид азота, эндотелины, рецепторы эндотелинов.

Поліморфізм генів, залучених у регуляцію ендотеліального гомеостазу, і кардіометаболічні ризики у хворих на цукровий діабет 2 типу

О.М. Сулаєва, С.В. Гончаров, О.С. Ларін

Ожиріння та цукровий діабет (ЦД) 2 типу асоційовані з глибокими порушеннями метаболізму та розвитком кардіоваскулярних ускладнень. Однак на сьогодні у літературі недостатньо даних щодо ролі генетичного поліморфізму рецепторів до ендотеліну та ендотеліальної синтази оксиду азоту (NOS3) у розвитку кардіометаболічних ускладнень ЦД 2 типу. Мета роботи – оцінити роль поліморфізму генів рецепторів до ендотеліну та NOS3 у розвитку кардіоваскулярних ускладнень ЦД 2 типу. В роботі проведено оцінку генотипів пацієнтів із ЦД 2 типу та здорових осіб групи порівняння за наступними однонуклеотидними поліморфізмами (SNPs): NOS3 (rs1799983), EDNRA (rs6842241) і EDNRB (rs5351), а також аналіз їх взаємозв'язку з розвитком ЦД 2 типу і кардіоваскулярних ускладнень. Аналіз ролі поліморфізмів генів, залучених у регуляцію ендотеліального гомеостазу, не виявив асоціації між

NOS3-rs1799983 і EDNRB-rs5351 SNPs та розвитком ЦД 2 типу, хоча при цьому було зареєстровано зв'язок між AA генотипом поліморфного сайту rs6842241 та розвитком ЦД 2 типу. Розвиток кардіоваскулярних ускладнень на тлі гіпертензії у пацієнтів з ЦД 2 типу був асоційований з поліморфізмом EDNRB-rs5351 ($p=0,035$), проте більшою мірою залежав від тривалості ЦД та рівня глікозильованого гемоглобіну.

Ключові слова: цукровий діабет, поліморфізм генів, оксид азоту, ендотеліни, рецептори ендотелінів.

Endothelial homeostasis associated genes polymorphism and cardiometabolic risks in patients with type 2 diabetes mellitus

Sulayeva ON, Goncharov SV, Larin AS.

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2D) are associated with alterations of metabolism and cardiometabolic risks. However, by now the role of endothelial homeostasis associated genes

polymorphism is not clear. In this study we assessed the role of gene polymorphisms of endothelin receptors type A and B, as well as NOS3 in development of cardiometabolic complications of T2D. We performed the assessment of genotypes for the following polymorphisms: NOS3 (rs1799983), EDNRA (rs6842241) and EDNRB (rs5351) in diabetic patients and healthy volunteers. In addition, we evaluated their association with T2D and cardiometabolic risks. We did not find association between NOS3-rs1799983 and EDNRB-rs5351 SNPs with T2D development, however the relationship between AA genotype of rs6842241 and T2D was found. Atherosclerotic lesion of blood vessels in combination with hypertension in patients with T2D was associated with EDNRB-rs5351 polymorphism ($p=0,035$), however this combine cardiovascular complication was more associated with T2D duration and HbA1c concentration ($p < 0,001$).

Key words: diabetes mellitus, gene polymorphism, nitric oxide, endothelin, endothelin receptors.

Дата надходження до редакції 26.05.2018 р.