

Ю.А. Сорокина *, Л.В. Ловцова

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»,
кафедра общей и клинической фармакологии, г. Нижний Новгород

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА (литературный обзор)

Резюме

Данный обзор литературы посвящён проблеме интерпретации научных изысканий в области полиморфизма различных генов, в частности гена эндотелиальной синтазы азота. Трудность заключается в правильной оценке ассоциаций аллелей и различных состояний, которые имеют клиническое значение. Особенно важно точное определение ассоциаций полиморфизма генов при СД, поскольку данное заболевание чаще всего приводит к микро- и макроангиопатиям. Информация о подобных ассоциациях и связях предоставляет возможности для поиска новых тактик и мишеней для воздействия, что развивает персонализированный подход к терапии пациентов с СД.

Ключевые слова: эндотелиальная синтаза оксида азота, ассоциации, полиморфизм гена, сахарный диабет.

Abstract

This review is devoted to a problem of interpretations of scientific data in the field of genes polymorphism researches, especially endothelial nitric oxide synthase. It is difficult to evaluate gene associations with variety of clinically significant conditions. To define associations is essential in patients with diabetes mellitus because of its cardiovascular complications. The data about associations gives us abilities to develop new targets and tactics, providing personal approach to a disease management.

Key words: endothelial nitric oxide synthase, associations, gene polymorphism, diabetes mellitus.

ДН — диабетическая нефропатия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, МС — метаболический синдром, ОШ — отношение шансов, СД — сахарный диабет.

Оксид азота играет важную роль в регуляции функционального состояния эндотелия и сосудистого тонуса, в том числе и у больных СД [17]. Образование оксида азота катализирует группа ферментов — синтазы оксида азота (NO-синтазы). NO-синтазы были впервые описаны в 1989 г., три основные формы ферментов выделены в период с 1991 по 1994 г. Эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) — одна из синтаз человека, кодируемая геном NOS3 на 7-й хромосоме. Фермент eNOS и ген eNOS3 были описаны в 1992–1993 гг. [14]. Затем полиморфизм гена был описан более детально (табл. 1).

С момента открытия полиморфизма гена эндотелиальной синтазы азота проводится активный поиск ассоциаций различных комбинаций аллелей генов и различных заболеваний, в первую очередь речь идёт о СД 2 типа. Доказано, что модификация полиморфизма гена eNOS3 связана с оксидативным стрессом [8]. Изучалась возможность полиморфизма генов, в частности, eNOS3(Glu298 Asp) и конечных продуктов гликозилирования в дифференцированном ответе клеток на гипергликемию. Показано, что наличие данного генотипа способствует развитию эндотелий-зависимых сосудистых осложнений [7].

Таблица 1. Синтазы оксида азота

Фермент	Локализация	Лocus	Полиморфизм	Риск заболеваний	Пост-трансляционная модификация	Авторы
eNOS	Экстрацеллюлярно	7q36	-786CC Clu298Asp(rs1799983) 27bpVNTR (intron4)	ИБС, артериальная гипертензия	Не репортировано	Thameem и соавт. (2008)
iNOS	Интрацеллюлярно	17p13.1	Ser608Leu(rs2297518)	Нет риска заболеваний	Нет ассоциаций	Макус и Petrovic (2012)

Примечание: eNOS — эндотелиальная синтаза оксида азота; iNOS — индуцибельная синтаза оксида азота.

* Контакты. E-mail: lzwx@inbox.ru. Телефон: (831) 421-53-67

Исследовались ассоциации между интроном 4 VNTR эндотелиальной синтазы азота и развитием хронических осложнений у больных СД 2 типа (Иран, М. Mehrab-Mohseni, 2011). Показано, что ассоциации выше у пациентов без осложнений диабета. Это свидетельствует о различном эффекте полиморфизма гена eNOS на развитие микроангиопатий у больных СД 2 типа [16].

В 2009 г. опубликованы результаты метаанализа полиморфизма в гене eNOS (G894T (Glu289Asp), 4b/a, T-786C) у 7401 больного СД и ДН по сравнению с 8046 пациентами контрольной группы. Метаанализ показал, что G894 T значимо ассоциирован с выраженной ДН у лиц с СД 2 типа в Восточной Азии [29].

В 2010 г. опубликованы результаты метаанализа трёх полиморфизмов eNOS (G894T (Glu289Asp), 4b/a, T-786C) и их связи с риском развития ДН на основании 28 исследований, включавших 10364 пациента. Аллель 894T негативно ассоциировалась у лиц европейского происхождения, но позитивно — у лиц из Восточной Азии. Аллель T-786C была значима у всех обследованных пациентов [26].

Ассоциации трёх полиморфизмов гена эндотелиальной синтазы оксида азота (894G>T, 786T>C, 27-bp-VNTR) с риском развития ДН у больных СД 2 типа исследованы и другими авторами (Shoukry, 2012). В исследование было включено 400 пациентов, страдающих СД 2 типа, в том числе 200 — с нефропатией. Аллель C 786T>C и T аллель для 894G>T встречались гораздо чаще у пациентов с ДН ($p < 0,001$). Показано, что эти аллели генетически детерминируют развитие ДН у больных СД 2 типа [23]. В то же время другими авторами не замечена связь между 894G>T, 786T>C, 27-bp-VNTR полиморфизмом eNOS у больных СД 2 типа [22]. Результаты метаанализа, проведённого группой других исследователей (Гонконг, 2011), включавшего 3893 пациента с ДН и 3161 пациента контрольной группы (с СД, без нефропатии) также показали, что полиморфизм гена eNOS, а именно G894T и E786C, больше значим для азиатской популяции, чем для лиц европеоидной расы [13].

С другой стороны, некоторые авторы вообще не находят взаимосвязи между eNOS Glu298Asp (rs1799983), eNOS 4a/b and iNOS Ser608 Leu (rs2297518) и ДН у больных СД 2 типа [13].

В 2010 г. проведено изучение взаимосвязи eNOS и ДН у пациентов с СД 1 типа [15]. Обследовано 1105 пациентов с СД 1 типа, осложнённым нефропатией, и 862 пациента контрольной группы с нормальной экскрецией альбумина в моче. Показано, что A аллель гена 1800783 — значительный фактор риска развития нефропатии у пациентов с СД 1 типа.

Учитывая большую значимость нефрокардиального синдрома, особое внимание уделяется выявлению

взаимосвязи полиморфизма eNOS с выраженностью кардиоренальных нарушений. Так, наличие 894G>T eNOS3 изучалось у 311 пациентов с различной стадией нефропатии в течение 38 месяцев. При этом оценивали три конечные точки: прогрессирование ДН, большие кардиоваскулярные события и все случаи смерти за время наблюдения. Показано, что наличие генотипа 894G>T eNOS3 является существенным фактором риска не только прогрессирования ДН (ОШ = 1,843), но и больших кардиоваскулярных событий (ОШ = 2,515) [9].

Проводится также поиск маркёров прогрессирования и диабетической ретинопатии. Изучены ассоциации двух полиморфизмов гена эндотелиальной синтазы оксида азота (894G>T, 27-bp-VNTR) с развитием пролиферативной ретинопатии у 577 больных СД 2 типа. Показано, что наличие генотипа 4a/4a в 27-bp-VNTR указывает на 3–4-кратное увеличение риска развития диабетической пролиферативной ретинопатии у больных СД 2 типа [4]. По данным других авторов, полиморфизм -786C/T у больных СД 1 типа также может быть фактором предрасположенности к развитию ретинопатии у этой категории больных. Данные получены при обследовании 249 британцев европеоидной расы, больных СД 1 типа [2].

В 2012 г. опубликованы результаты метаанализа, включавшего 21 клиническое исследование (8111 пациентов). Оценивались ассоциации eNOS3 4b/a, T-786C и G894T и диабетической ретинопатии. Показано, что наличие 4a аллели и 4b/a eNOS3 обладает защитным эффектом против диабетической ретинопатии у больных СД 2 типа. Наличие C аллели T-786C может быть защитным фактором от пролиферативной диабетической ретинопатии. При этом не доказана значимость G894 T в развитии ретинопатии [28].

В 2009 г. показано, что между полиморфизмом eNOS (4a/b, -786T/C) и ИБС у больных СД с ожирением существует определённая взаимосвязь. Обследовано 1313 пациентов, из которых у 939 отмечался значимый стеноз одной и более коронарной артерии (больше 50%). Наличие 4a/b, -786T/C изучалось методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Между -786 T/C полиморфизмом и патологией коронарных артерий у больных СД и ожирением не было обнаружено значимой взаимосвязи. В то же время наличие генотипа 4a/b у данной категории больных встречалось в 3–4 раза чаще [24]. Одновременно с этим, полиморфизм eNOS3 (G894T) связан с риском ишемического инсульта у китайской популяции больных СД 2 типа [11].

В 2013 г. опубликованы данные об ассоциации eNOS3 4b/a, T-786C и G894T с МС [10]. В исследование включено 339 пациентов с МС и 783 пациента без МС, находящихся на лечении в Центральном тайваньском госпитале. T-786C TC+CC значимо

ассоциировались со снижением риска МС (ОШ = 0,63). Интрон 4b/a генотипа также ассоциирован со снижением риска МС (ОШ = 0,68).

Кроме того, авторами показано, что у лиц с ожирением наличие G894T генотипа играет значимую роль по сравнению с лицами контрольной группы (ОШ = 1,65) [10].

Анализу полиморфизма гена eNOS3 (G894T) и ожирения как детерминанты риска СД 2 типа у 14 374 участников из США в рамках объединённого исследования по изучению риска атеросклероза была посвящена статья J. Bressler, J.S. Pankow, J. Coresh, E. Boerwinkle, опубликованная в 2013 г. [3]. Среди участников было 728 пациентов с СД 2 типа (афроамериканцев) и 980 — европеоидной расы. В исследовании показано, что взаимосвязь между указанными параметрами отмечается только у лиц европеоидной расы [3].

В 2013 г. доказана ассоциация полиморфизма гена eNOS3 (4b/a и G894T) с СД 2 типа. Метаанализ включал 19 статей с вовлечением 8009 пациентов с 4b/4a VNTR и 19 статей с вовлечением 8600 пациентов с G894 генотипом. Установлено, что при наличии 4a ОШ риска СД 2 типа равен 1,32. Наличие 894T аллели ассоциировано с увеличенным риском СД 2 типа (ОШ = 1,14). Следовательно, данные метаанализа показали, что наличие eNOS3 гена 4b/a VNTR и G894T полиморфизма ассоциируется с риском СД 2 типа [6], хотя в другом исследовании однозначного ответа на этот вопрос не получено [24].

Группой учёных из Японии по результатам восьмилетнего проспективного исследования выявлено пять возможных генетических вариантов, связанных с оксидативным стрессом и приводящих к развитию сердечно-сосудистых осложнений у больных СД 2 типа [8]. В исследование включено 1977 больных СД 2 типа из Японии без отягощённого сердечно-сосудистого анамнеза в возрасте 60 лет. Определяли полиморфизм SODs (Val16Ala), eNOS3(G894T), NAD(P)Hoxidasep22phox(СУВА)С242Т, миелопероксидазы (G-463A). Установлено, что одиночная ассоциация не показала статистической значимости между каждым полиморфизмом. При этом при наличии у пациента более четырёх прооксидантных аллелей риск сердечно-сосудистых катастроф увеличивался в 2,92 раза [8]. Следовательно, целесообразно учитывать не одну, а несколько ассоциаций.

Следует отметить, что полиморфизм эндотелиальной синтазы оксида азота ассоциирован не только с СД. В последнее время доказано, что -786T>C полиморфизм eNOS3 ассоциируется с увеличенным риском рака (ОШ = 1,30) [27], в частности мочевого пузыря [20]. Имеется также информация об ассоциации полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота с хронической обструктивной болезнью лёгких [7].

Показано, что полиморфизм eNOS3-rs1799983 (Glu298Asp) ассоциируется с уровнем артериального давления у подростков [5]. Кроме того, метаанализ, включающий 17 независимых исследований (1792 больных и 2411 пациентов контрольной группы), показал, что полиморфизм eNOS3-rs1799983 (Glu298Asp) ассоциируется с риском рака предстательной железы [25].

Исследования полиморфизма гена синтазы оксида азота имеют большое практическое значение, поскольку не только предоставляют возможность прогнозирования осложнений и исходов СД, но и являются основой для коррекции экспрессии позитивных комбинаций.

Так, изучено влияние «тощаковой» глюкозы на фоне интенсифицированной инсулинотерапии и влияние полиморфизма гена eNOS на развитие рестеноза/ампутации/смерти в течение 6 месяцев после периферической ангиопластики у пациентов с СД 2 типа. 46 пациентов были рандомизированы в 2 параллельные группы. В 1-й группе больные получали гларгин + глюлизин, во 2-й группе — гларгин + пероральные сахароснижающие препараты. Определяли методом полимеразной цепной реакции полиморфизм eNOS (rs 753482-A>C) и циркуляцию клеток-предшественников CD34(+) и CD34(+)KDR(+). Хотя в 1-й группе с интенсифицированной инсулинотерапией HbA_{1c} (гликированный гемоглобин) был значительно меньше ($6,9 \pm 1,3\%$ vs $7,6 \pm 1,2\%$, $p < 0,05$), в этой группе отмечено небольшое количество конечных точек (рестеноз/ампутация, смерть) (52 и 65% соответственно, $p = 0,59$). При наличии rs753482-AC+CC по сравнению с rs753482-AA статистически значимо увеличилось количество изучаемых конечных точек (79% по сравнению с 42%, ОШ = 5,3 доверительный интервал 95%, $p < 0,02$). Базальный уровень CD34(+) и CD34(+)KDR(+) был выше в группе rs753482-AA (166,2 по сравнению с 63,1, $p < 0,01$). В конце исследования уровень CD34(+)KDR(+) был выше в группе интенсифицированной инсулинотерапии и с полиморфизмом rs753482-AA по сравнению с терапией во 2-й группе и с полиморфизмом rs753482-AC+CC. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что выявлены новые предикторы рестеноза, такие как полиморфизм eNOS (rs 753482-A>C SNP) и циркуляция клеток-предшественников [19].

В эксперименте также показано, что лечение низкими дозами аторвастатина, лозартана и их комбинацией увеличивает экспрессию вазоактивно-связанных генов у крыс. Так, после 6 недель приёма указанных препаратов экспрессия eNOS3 увеличивалась в 1,4 раза, что сопровождалось увеличением уровня NO и позитивно коррелировала с релаксацией аорты. Эти данные свидетельствуют об эффекте «низкодозового фармакологического подхода» [12].

Patel и соавт. провели уникальное в своём роде исследование по изучению полиморфизмов генов, окислительного стресса и индуцированной гипергликемией эндотелиальной дисфункции у больных СД [18]. Авторы выдвинули гипотезу о формировании эпигенетически регулируемой сосудистой метаболической памяти.

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что идентифицированные геномные фенотипы и соответствующие функциональные изменения эндотелия могут дать информацию о возможности приоритетного и оптимального терапевтического воздействия в каждом конкретном случае, что и является целью наших дальнейших исследований.

A

Список литературы

1. *Aminuddin F.* Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression and lung function in chronic obstructive pulmonary disease // *BMC Pulm Med.* 2013. Vol. 13. P. 64.
2. *Bazzaz J.T.* eNOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes // *Ophthalmic Genet.* 2010. Vol. 31, № 3. P. 103–107.
3. *Bressler J.* Interaction between the NOS3 gene and obesity as a determinant of risk of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 11. P. 3–12.
4. *Cilenšek I.* The 4a/4a genotype of the VNTR polymorphism for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene predicts risk for proliferative diabetic retinopathy in Slovenian patients (Caucasians) with type 2 diabetes mellitus // *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39, № 6. P. 7061–7067.
5. *Grøntved A.* et al. NOS3 variants, physical activity, and blood pressure in the European Youth Heart Study // *Am. J. Hypertens.* 2011. Vol. 24, № 4. P. 444–450.
6. *Jia Z.* et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis // *Endocr. J.* 2013. Vol. 60, № 7. P. 893–901.
7. *Joshi M.S.* Effects of human endothelial gene polymorphisms on cellular responses to hyperglycaemia: role of NOS3 (Glu298Asp) and ACE (I/D) polymorphisms // *Diab. Vasc. Res.* 2011. Vol. 8, № 4. P. 276–283.
8. *Katakami N.* et al. Accumulation of oxidative stress-related gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes - An 8-year prospective study // *Atherosclerosis.* 2014. Vol. 235, № 2. P. 408–414.
9. *Kuricova K.* et al. NOS3 894 G>T polymorphism is associated with progression of kidney disease and cardiovascular morbidity in type 2 diabetic patients: NOS3 as modifier gene for diabetic nephropathy? // *Kidney Blood Press Res.* 2013. Vol. 38, № 1. P. 92–98.
10. *Liu C.S.* et al. Association between endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and risk of metabolic syndrome // *Dis. Markers.* 2013. Vol. 34, № 3. P. 187–197.
11. *Luk A.O.* et al. Predictive role of polymorphisms in interleukin-5 receptor alpha-subunit, lipoprotein lipase, integrin A2 and nitric oxide synthase genes on ischemic stroke in type 2 diabetes, an 8-year prospective cohort analysis of 1327 Chinese patients // *Atherosclerosis.* 2011. Vol. 215, № 1. P. 130–135.
12. *Lunder M.* et al. Treatment with low-dose atorvastatin, losartan, and their combination increases expression of vasoactive-related genes in rat aortas // *Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2013. Vol. 18, № 2. P. 177–183.
13. *Makuc J., Petrovic D.* No association between NOS2 and NOS3 polymorphisms and diabetic nephropathy in type 2 diabetics // *Cent. Eur. J. Biol.* 2012. Vol. 7. P. 404–410.
14. *Marsden P.A.* et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 17478–17488.
15. *McKnight A.J.* et al. Genetic polymorphisms in nitric oxide synthase 3 gene and implications for kidney disease: a meta-analysis // *Am. J. Nephrol.* 2010. Vol. 32, № 5. P. 476–481.
16. *Mehrab-Mohseni M.* et al. Endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism association with type 2 diabetes and its chronic complications // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011. Vol. 91, № 3. P. 348–352.
17. *Monisha B., Vats P.* Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus // *Indian Journal of Human Genetics.* 2014. Vol. 20, № 1. P. 10–19.
18. *Patel H.* et al. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC // *Cardiovasc. Diabetol.* 2013. Vol. 12. P. 14.
19. *Piatti P.M.* et al. Effect of normalization of fasting glucose by intensified insulin therapy and influence of eNOS polymorphisms on the incidence of restenosis after peripheral angioplasty in patients with type 2 diabetes: a randomized, open-label clinical trial // *Acta. Diabetol.* 2013. Vol. 50, № 3. P. 373–382.
20. *Ryk C.* et al. Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer // *Nitric Oxide.* 2011. Vol. 25, № 3. P. 338–343.
21. *Saini V., Bhatnagar M.K.* Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp (G894T) gene polymorphism in coronary artery disease patients with type 2 diabetes mellitus // *Diab. Metab. Syndr.* 2012. Vol. 6, № 2. P. 106–109.
22. *Santos K.G.* et al. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes // *Diab. Res. Clin. Pract.* 2011. Vol. 91, № 3. P. 353–362.
23. *Shoukry A.* et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus // *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2012. Vol. 16, № 6. P. 574–579.
24. *Vasku A.* et al. Association of the eNOS 4a/b and -786T/C polymorphisms with coronary artery disease, obesity and diabetes mellitus // *Folia Biol. (Praha).* 2009. Vol. 55, № 5. P. 187–191.
25. *Wu J.H.* et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene rs1799983 polymorphism with susceptibility to prostate cancer: a meta-analysis // *Tumour Biol.* 2014. Vol. 35, № 7. P. 7057–7062.
26. *Zeng Z.* et al. A meta-analysis of three polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and their effect on the risk of diabetic nephropathy // *Hum. Genet.* 2010. Vol. 127, № 4. P. 373–381.
27. *Zhang Y.* et al. The -786T > C polymorphism in the NOS3 gene is associated with increased cancer risk // *Tumour Biol.* 2014. Vol. 35, № 4. P. 3535–3540.
28. *Zhao S.* et al. Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis // *Ophthalmic Genet.* 2012. Vol. 33, № 4. P. 200–207.
29. *Zintzaras E., Papathanasiou A.A., Stefanidis I.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy: a HuGE review and meta-analysis // *Genet. Med.* 2009. Vol. 11, № 10. P. 695–706.