

УДК 616.379-008.64-06:575

[https://doi.org/10.24026/1818-1384.4\(64\).2018.150000](https://doi.org/10.24026/1818-1384.4(64).2018.150000)

## ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМУ RS1799983 ГЕНА NOS3 З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ ТА РОЗВИТКОМ ЙОГО УСКЛАДНЕНЬ



**С.В. Зябліцев<sup>1</sup>, О.П. Чернобривцев<sup>1</sup>, Д.С. Зябліцев<sup>2</sup>,  
С.О. Тарасенко<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

<sup>2</sup>Київський медичний університет, Київ, Україна

<sup>3</sup>Український науково-практичний центр ендокринної хірургії трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України

### ВСТУП

Судинні ускладнення цукрового діабету (ЦД) переважно визначають тяжкість цього патологічного стану, ранню інвалідизацію і передчасну смертність населення [1, 2]. У цьому плані ключовим є поняття ролі судинного ендотелію, який є динамічною регулюючою системою як у фізіологічних, так і при патологічних процесах [3, 4]. Ендотеліальна дисфункція (ЕДФ) формується при запаленні судин, атеросклерозі, гіпертонії, кардіоміопатії, ретинопатії, нейропатії [5-7]. Гіперліпідемія, гіперглікемія та інші метаболічні чинники спричиняють розвиток ЕДФ і судинних ускладнень при ЦД 2 типу [7]. До розвитку ЕДФ при ЦД 2 типу призводять інтенсифікація окисного стресу, системне запалення з пошкодженням глікокаліксу і порушенням міжклітинних контактів ендотеліоцитів та гемато-тканинного бар'єру та інші патогенетичні фактори [8]. З іншого боку, сам пошкоджений ендотелій включається в патогенез ЦД і обумовлює розвиток подальших порушень [3].

Останніми дослідженнями показана важлива роль генетичних факторів, що відіграють важливу етіологічну роль у виникненні метаболічних захворювань і, в тому числі, ЦД 2 типу [9-12]. У цьому плані привернув увагу поліморфізм rs1799983 (G894T, Glu298Asp) гена NOS3, мінорна алель Т якого асоційована зі зниженням активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [9]. Так, у бразильському дослідженні (200 хворих та 100 учасників контрольної групи) встановлена його асоціація з атеросклерозом ( $p=0,0378$ ) [10]. У роботі турецьких вчених показана роль поліморфізму rs1799983 гена NOS3 у виникненні гестаційного

діабету (68 хворих проти 73 учасників контрольної групи), який пов'язують з погіршенням функції рено-васкулярної системи [11]. У дослідженні іранських вчених показана роль цього поліморфізму у виникненні діабетичної виразки на стопі [12]. Численні літературні дані, а також аналіз власних досліджень (вісім досліджень з поліморфізмом rs1799983 гена NOS3 і чотири мета-аналізи; загалом 4795 випадків патології та 3805 контрольних) дозволили О. Tabatabaei-Malazy та співав. (2017) довести позитивний зв'язок цього поліморфізму з ЦД 2 типу [13].

Роботою, що підсумувала різні дані останніх років, можна вважати розробку J. Rani та співав. (2017) генетичного атласу ЦД 2 типу, який був складений шляхом інтегративного аналізу генів, пов'язаних з цим захворюванням та його ускладненнями з використанням бази Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [9]. Проаналізовано дані про 650 генів і 34 мікроРНК, які пов'язані з ЦД 2 типу та розвитком його ускладнень. Доведено, що сім генів – AGER, TNFRSF11B, CRK, PON1, ADIPOQ, CRP і NOS3 мають зв'язок з розвитком серцево-судинних ускладнень, атеросклерозу, ретино- та нефропатіями у хворих на ЦД 2 типу.

Виходячи з викладеного, можна вважати, що поліморфізм rs1799983 гена NOS3 (G894T), який призведе до заміни амінокислотної послідовності у молекулі ферменту (Glu298Asp), має відношення до розвитку діабетичних судинних ускладнень, що продиктувало необхідність окремого дослідження ролі цього поліморфізму у формуванні судинних ускладнень та ЕДФ при ЦД 2 типу у хворих з української популяції.

Зябліцев Сергій Володимирович, д. мед. н., професор кафедри патофізіології; E-mail: zsv1965@gmail.com.  
Чернобривцев Олександр Петрович, асистент кафедри патофізіології; Зябліцев Денис Сергійович, к. мед. н., асистент кафедри внутрішніх хвороб. Тарасенко Сергій Олександрович, науковий співробітник відділу патології.

**Мета:** проведення аналізу результатів визначення асоціації поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з ЦД 2 типу, розвитком ускладнень, клініко-лабораторними показниками, що характеризують тяжкість перебігу захворювання та розвиток ЕДФ.

### МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

До дослідження залучено дані 152 хворих з ЦД 2 типу. Вік пацієнтів становив від 34 до 80 років, у середньому  $53,9 \pm 8,4$  року. Жінок було 95 (62,5%), чоловіків – 57 (37,5%). Згідно клінічних рекомендацій [1, 14, 15] за результатами клініко-лабораторних обстежень визначали наявність діабетичних ретинопатії, нефропатії за рівнями альбумінурії та швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), сенсорної полінейропатії, макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії. Згідно клінічної класифікації [15], 1 ступінь тяжкості не була виявлена у жодного пацієнта, 2 ступінь – у 120 (78,9%) та 3 ступінь – у 32 (21,1%) хворих. Отже, у цьому дослідженні хворих було розподілено на три групи. Для цього хворих із 2 ступенем тяжкості було розподілено на дві групи: першу склали 57 (37,5%) хворих, другу – 63 (41,4%) хворих. Критерієм для їх розподілу було обрано ступінь компенсації ЦД 2 типу за рівнем глікованого гемоглобіну (HbA1C): до 1-ї групи були залучені хворі в стані компенсації або задовільної компенсації рівня гіперглікемії (HbA1C на рівні 7-9%); до 2-ї – з низькою якістю глікемічного контролю у стані декомпенсації (HbA1C більше 9%). Хворі з 3 ступенем тяжкості склали 3-ю групу. До контрольної групи було залучено 95 практично здорових осіб відповідного вікового та гендерного розподілу, які не мали порушень вуглеводного обміну і клінічної маніфестації симптомів, схожих з мікро- і макросудинними ускладненнями ЦД.

У крові біохімічними методами визначали вміст креатиніну, сечовини, глюкози, глікованого гемоглобіну (HbA1C), оксиду азоту (NO) і дієнових кон'югатів (ДК), у сечі – рівні глюкози та мікроальбуміну (спектрофотометр Spacord, Німеччина); імуноферментним методом у крові визначали вміст чинників ЕДФ: ендотеліну 1 (ET1; Biomedica Immunoassays, Австрія), eNOS (BCM Diagnostics, США) і фактору некрозу пухлин (TNF $\alpha$ ; Bender Medsystems, Австрія). Інтенсивність забарвлення продукту ферментативної реакції кількісно вимірювали на фотометрі Multiscan EX, Thermo Electron Corp. (Фінляндія).

Аналіз поліморфізму rs1799983 гена NOS3 (генна

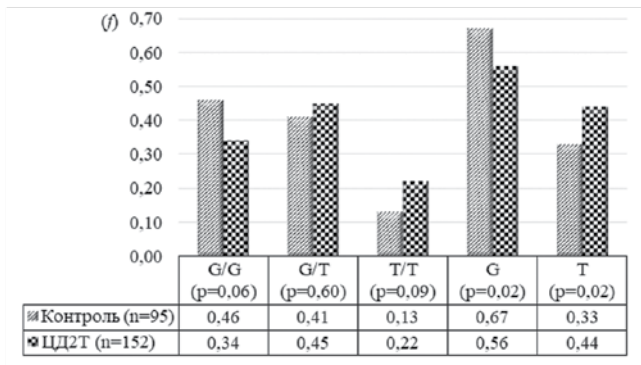
локалізація 7q36.1; 7:150999023) проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі (контекстна послідовність CCCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA [G/T] CCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC) в автоматичному ампліфікаторі Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). На першому етапі дослідження проводили виділення геномної ДНК з цільної венозної крові з використанням стандартних реактивів PureLink<sup>®</sup> Genomic DNA Kit For Purification of Genomic DNA; виробник INVITROGEN (США). Аналіз поліморфізму здійснено з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США).

Для статистичної обробки отриманих даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Після проведення тестів Колмогорова-Смірнова, Андерсона-Дарлінга і  $\chi^2$ -квдрат був встановлений відмінний від нормального характер розподілу варіаційних рядів ( $p < 0,05$ ). У зв'язку з цим для описової статистики кількісних даних використовували медіану (Me) та перший і третій квартилі (Q1; Q3) варіаційних рядів. Незалежні вибірки порівнювали із застосуванням критеріїв Kruskal-Wallis (H) і Mann-Whitney (U). Для порівняння категоріальних змінних використовували таблиці спряженості і непараметричний критерій  $\chi^2$  Pearson у модифікації Yates. У всіх випадках статистичного оцінювання значущість відмінностей враховували при значенні  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні аналізу було порівняно дані, отримані в контрольній групі, з даними хворих. На початку була проаналізована загальна тенденція частот генотипів і алелів, потім – частотні різниці, які вказували на вплив генотипів та алелів на розвиток захворювання. Для значущих відмінностей розглянуто відношення шансів (ВШ) та 95% вірогідний інтервал (95% ВІ), тобто – асоціацію з ЦД 2 типу (генетичний ризик).

Розподіл генотипів у контрольній групі, згідно наших даних (рис. 1), було порівняно з результатами Програми 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>). У Програмі для визначення частот генотипів rs1799983 гена NOS3 було залучено 2504 людини. Предковий генотип G/G був визначений з частотою 0,694 (у наших дослідженнях – 0,46), гетерозигота G/T – 0,260 (у наших дослідженнях – 0,41), мінорна гомозигота T/T –



**Рис. 1.** Розподіл частот генотипів і алелів rs1799983 гена NOS3 між контрольною групою пацієнтів і групою хворих на ЦД 2 типу;  $p$  – статистична значущість розбіжностей частот показників між групами за двостороннім точним критерієм Фішера. За вертикальною віссю – частоти ( $f$ ); за горизонтальною – генотипи і алелі.

0,046 (у наших дослідженнях – 0,13); у європейській популяції ( $n=503$ ) показники склали, відповідно, 0,443; 0,425 та 0,131. Отже, наші результати збіглися з результатами для європейської популяції.

Порівняння розподілу алелів у контрольній групі (див. рис. 1) з даними Програми 1000 Genomes Project Phase 3 показало наступне. Для всіх спостережень ( $n=5008$ ) предкова алель G була визначена з частотою 0,824 (у наших дослідженнях – 0,67), мутантна алель T – 0,176 (у наших дослідженнях – 0,33); для європейської популяції ( $n=1006$ ) показники склали, відповідно, 0,654 та 0,344. Таким чином, результати контрольної групи як по розподілу генотипів, так і

алелів відповідали даним Програми 1000 Genomes Project Phase 3 для європейської популяції.

У порівнянні з контролем (див. рис. 1), у хворих було відзначено зменшення частоти предкового гомозиготного генотипу G/G ( $p=0,06$ ) та збільшення частоти мінорного генотипу T/T ( $p=0,09$ ), а також – зменшення частоти предкової алелі G (у 1,2 рази;  $p=0,02$ ) та збільшення частоти мінорної алелі T (у 1,3 рази;  $p=0,02$ ). Отже, можна було стверджувати, що розподіл поліморфних генотипів і алелів rs1799983 гена NOS3 мав зв'язок з розвитком ЦД 2 типу у хворих з української популяції.

Для перевірки цього припущення було проведено розрахунок впливу розподілу частот генотипів та алелів rs1799983 гена NOS3 на розвиток ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації з захворюванням (табл. 1).

Тест Харді-Вайнберга для контролів та випадків відповідав випадковому характеру успадкування генотипів (відповідно,  $\chi^2=0,52$ ;  $df=1$ ;  $p=0,471$  та  $\chi^2=1,30$ ;  $df=1$ ;  $p=0,254$ ). Аналіз результатів по впливу генотипів, що наведений у таблиці спряженості (3×3), показав, що зв'язку з захворюванням не виявлено ( $\chi^2=5,30$ ;  $p=0,071$ ). Порівняння частот алелів, яке наведено у таблиці спряженості (2×2), показало, що  $\chi^2=5,82$ ;  $p=0,016$ . Отже, алельний поліморфізм rs1799983 мав зв'язок із розвитком ЦД 2 типу. Мінорний алель T збільшував в 1,6 рази шанси розвитку ЦД 2 типу (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32), тоді як предковий алель G такі шанси зменшував в 1,6 рази (ВШ=0,63; 95% ВІ 0,43-0,92).

Отже, оскільки мінорний алель T збільшував

Таблиця 1

**Вплив розподілу частот генотипів і алелів поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на розвиток ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації з захворюванням**

| Генотипи, алелі | ЦД 2 типу, $n$ ( $f$ ) | Контроль, $n$ ( $f$ ) | $\chi^2$ | $p$   | ВШ   | 95% ВІ    |
|-----------------|------------------------|-----------------------|----------|-------|------|-----------|
| G/G             | 51 (0,34)              | 44 (0,46)             | 5,30     | 0,071 | 0,59 | 0,35–0,99 |
| G/T             | 68 (0,45)              | 39 (0,41)             |          |       | 1,16 | 0,69–1,95 |
| T/T             | 33 (0,22)              | 12 (0,13)             |          |       | 1,92 | 0,94–3,93 |
| G               | 170 (0,34)             | 127 (0,67)            | 5,82     | 0,016 | 0,63 | 0,43–0,92 |
| T               | 134 (0,45)             | 63 (0,33)             |          |       | 1,59 | 1,09–2,32 |

**Примітки:**  $n$  – кількість;  $f$  – частота;  $\chi^2$  – критерій Pearson у модифікації Yates;  $p$  – статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ – відношення шансів; 95% ВІ – 95% вірогідний інтервал для ВШ.

**Домінантна та рецесивна моделі успадкування впливу поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на розвиток ЦД 2 типу**

| Генотипи |         | ЦД 2 типу (n=152), n (f) | Контроль (n=95), n (f) | $\chi^2$ | p     | ВШ   | 95% ВІ    |
|----------|---------|--------------------------|------------------------|----------|-------|------|-----------|
| Дом.     | G/G     | 51 (0,34)                | 44 (0,46)              | 4,02     | 0,045 | 0,59 | 0,35–0,99 |
|          | G/T+T/T | 101 (0,66)               | 51 (0,54)              |          |       | 1,71 | 1,01–2,89 |
| Рец.     | G/G+G/T | 119 (0,78)               | 83 (0,87)              | 3,23     | 0,072 | 0,52 | 0,25–1,07 |
|          | T/T     | 33 (0,22)                | 12 (0,13)              |          |       | 1,92 | 0,94–3,93 |

**Примітки:** Дом. – домінантна модель; Рец. – рецесивна модель, n – кількість; f – частота;  $\chi^2$  – критерій  $\chi$ -квадрат за Pearson у модифікації Yates; p – значущість відмінностей; ВШ – відношення шансів; 95% ВІ – 95% вірогідний інтервал для величини ВШ.

шанси розвитку ЦД 2 типу, то її наявність можна було розглядати як фактор ризику розвитку захворювання: шанси розвитку ЦД 2 типу у хворих з української популяції носіїв алелі Т збільшені в 1,6 рази (p=0,016), тоді як за наявності предкового алелю G (генотип G/G) такі шанси було знижено, що вказувало на можливу протекторну дію предкового алелю.

Численні повідомлення також вказували на важливу роль поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на розвиток ЦД 2 типу. Так, у єгипетському дослідженні D. El-Lebedy (2018) при обстеженні 272 осіб було встановлено, що наявність мутантної алелі Т в 3,07 рази збільшувала ризик розвитку ЦД 2 типу та в 3,08 рази ризик серцево-судинних захворювань у таких хворих [16]. У широкомасштабному китайському дослідженні з популяції Хан (1234 хворих на ЦД 2 типу та 1272 учасників контрольної групи) показана значуща різниця у розподілі мутантної алелі поліморфізму rs1799983 гена NOS3 (p=2,10·10<sup>-3</sup>), отже було встановлено зв'язок поліморфізму з ЦД 2 типу [17].

Для з'ясування ролі алелів у генотипі було проведено порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування. Результати розрахунку розподілу генотипів поліморфізму rs1799983 та генетичного ризику захворювання представлені у таблиці 2.

Розподіл генотипів rs1799983 за домінантною моделлю успадкування (G/G проти G/T+T/T) мав статистичну значущість за критерієм  $\chi^2$  ( $\chi^2=4,02$ ; p=0,045), тоді як розподіл генотипів за рецесивною

моделлю успадкування значущим не був ( $\chi^2=3,23$ ; p=0,072). Такий результат підтвердив наявність асоціації з ЦД 2 типу саме за умов наявності у генотипі мінорного алелю Т (G/T+T/T).

У цьому плані необхідно зазначити, що мета-аналіз 2015 року [18], до якого було залучено 19 повідомлень (8600 випадків), також виявив зв'язок алелю Т поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з ЦД 2 типу у домінантній моделі (ВШ=1,14; 95% ВІ 1,03–1,26): алелі Т проти алелю G (ВШ=1,18; 95% ВІ 1,09–1,27) і генотипу ТТ проти генотипу GG (ВШ=1,33; 95% ВІ 1,09–1,62), що цілком узгоджувалося з нашими даними.

Оскільки за наявності ускладнень згідно до існуючого положення [15], хворих було поділено на три групи, надалі було зроблено спробу з'ясування впливу розподілу генотипів та алелів поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на груповий розподіл хворих. Аналіз цих даних показав, що для розподілення хворих на групи розподіл і генотипів, і алелів поліморфізму rs1799983 гена NOS3 значення не мав (відповідно, p=0,614 і p=0,338). Отже це вказувало і на відсутність значущої різниці між їх розподілом у групах хворих.

Також було визначено, чи мають вивчені генотипи і алелі значення для ступеня компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем глікемії та HbA1C. Розподіл генотипів та алелів в залежності від рівня глікемії у хворих на ЦД 2 типу не відрізнявся (відповідно, p=0,447 і p=0,376). На відміну від цього, статистичну значущість мала його залежність від рівня HbA1C (відповідно, p=0,015 і p=0,040; табл. 3).

**Вплив генотипів та алелів на розподіл хворих за ступенями компенсації вуглеводного обміну в залежності від рівня HbA<sub>1c</sub>, n (f)**

| Генотипи | Ступінь компенсації |            |             | χ <sup>2</sup> | p     |
|----------|---------------------|------------|-------------|----------------|-------|
|          | 1, n=24             | 2, n=33    | 3, n=95     |                |       |
| G/G      | 8 (0,333)           | 9 (0,273)  | 34 (0,358)  | 12,25          | 0,015 |
| G/T      | 14 (0,584)          | 10 (0,303) | 44 (0,463)  |                |       |
| T/T      | 2 (0,083)           | 14 (0,424) | 17 (0,179)  |                |       |
| Алелі    | n=48                | n=66       | n=190       | 6,43           | 0,040 |
| G        | 30 (0,625)          | 28 (0,424) | 112 (0,589) |                |       |
| T        | 18 (0,375)          | 38 (0,576) | 78 (0,411)  |                |       |

**Примітки:** ступінь компенсації: 1 (компенсація) – HbA<sub>1c</sub> <7%, 2 (субкомпенсація) – HbA<sub>1c</sub> =7-9%, 3 (декомпенсація) – HbA<sub>1c</sub> >9%; n – кількість; f – частота; χ<sup>2</sup> – критерій χ-квадрат за Pearson у модифікації Yates; p – значущість відмінностей.

Звертала на себе увагу висока частота хворих з поганою компенсацією ЦД 2 типу (2 та 3 ступені компенсації) за умов наявності у них генотипу T/T та алелю T. Отже, можна було зробити висновок, що наявність алелю T сприяла поганій компенсації ЦД 2 типу за ступенем глікування білка (рівень HbA<sub>1c</sub> у крові).

Наступним етапом дослідження було з'ясування впливу поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на наявність діабетичних ускладнень (табл. 4).

Вірогідний вплив генотипи мали тільки на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації (χ<sup>2</sup>=10,15; p=0,006). На відміну від цього, алелі мали більш широкий діапазон впливів: на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації (χ<sup>2</sup>=8,00; p=0,005) і за рівнем мікроальбумінурії (χ<sup>2</sup>=4,81; p=0,028), а також – на наявність артеріальної гіпертензії (χ<sup>2</sup>=4,74; p=0,029).

У дослідженні [13] був доведений зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з розвитком діабетичної нефропатії. При цьому поліморфізм rs1799983 не впливав на активність NO у судинах нирки при діабетичній нефропатії, але алель T був пов'язаний з підвищенням окисного стресу у таких випадках [19]. На значущий зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з розвитком діабетичної

нефропатії вказувало також дослідження, що було проведене у Північному Китаї (431 хворий на ЦД 2 типу з діабетичною нефропатією проти 420 хворих на ЦД 2 типу без неї) [20]. Принципова можливість патогенетичного впливу мінорних алелів поліморфних локусів ДНК була показана і у наших попередніх дослідженнях: поліморфізми rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1 мали зв'язок з розвитком діабетичної ретинопатії у хворих на ЦД 2 типу [21].

Отже, можна було заключити, що поліморфізм rs1799983 гена NOS3 мав зв'язок з розвитком діабетичної нефропатії, що могло бути пов'язане з інтенсифікацією окисного стресу та, як на наш погляд, – і зі зниженням функції нирок, а також – рівня NO, що продукується eNOS.

Для підтвердження такого припущення був проаналізований вплив генотипів поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на клініко-лабораторні показники, що асоціюються з функцією нирок (табл. 5) та чинники ЕДФ (табл. 6).

Перевірка за критерієм Kruskal-Wallis показала наявність впливу генотипів на рівень у крові креатиніну (H=8,74; p=0,013), швидкість клубочкової фільтрації (H=8,28; p=0,016) і рівень мікроальбумінурії (H=8,32; p=0,016). Такі самі результати (критерій Mann-Whitney) були отримані

Вплив генотипів поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на наявність діабетичних ускладнень, n (f)

| Показник            | Значення | Генотипи   |            |            | $\chi^2$ | p     |
|---------------------|----------|------------|------------|------------|----------|-------|
|                     |          | G/G, n=51  | G/T, n=68  | T/T, n=33  |          |       |
| Наявність ДР        | ні       | 10 (0,196) | 16 (0,235) | 7 (0,212)  | 0,27     | 0,874 |
|                     | так      | 41 (0,804) | 52 (0,765) | 26 (0,788) |          |       |
| Наявність ДСПН      | ні       | 7 (0,137)  | 11 (0,162) | 0 (0,00)   | 5,83     | 0,054 |
|                     | так      | 44 (0,863) | 57 (0,838) | 33 (1,000) |          |       |
| Наявність ДН за ШКФ | ні       | 29 (0,569) | 37 (0,544) | 8 (0,242)  | 10,15    | 0,006 |
|                     | так      | 22 (0,431) | 31 (0,456) | 25 (0,758) |          |       |
| Наявність ДН за МАУ | ні       | 11 (0,216) | 13 (0,191) | 1 (0,030)  | 5,64     | 0,059 |
|                     | так      | 40 (0,784) | 55 (0,809) | 32 (0,970) |          |       |
| Наявність АГ        | ні       | 32 (0,628) | 36 (0,529) | 13 (0,394) | 4,39     | 0,111 |
|                     | так      | 19 (0,372) | 32 (0,471) | 20 (0,606) |          |       |
| Наявність ДМАНК     | ні       | 40 (0,784) | 54 (0,794) | 26 (0,788) | 0,02     | 0,991 |
|                     | так      | 11 (0,216) | 14 (0,206) | 7 (0,212)  |          |       |

**Примітки:** ДР – діабетична ретинопатія; ДСПН – діабетична сенсорна полінейропатія; ДН – діабетична нефропатія; ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації; МАУ – мікроальбумінурія; АГ – артеріальна гіпертензія; ДМАНК – діабетична макроангіопатія нижніх кінцівок; n – кількість; f – частота пацієнтів з відповідними генотипами; p – статистична значущість розбіжностей між групами за критерієм  $\chi^2$  Pearson у модифікації Yates

і для алелів: для креатиніну (U=9546; p=0,015), швидкості клубочкової фільтрації (U=9252; p=0,005) і рівня мікроальбумінурії (U=9533; p=0,015). При цьому рівні креатиніну і мікроальбумінурії були вищими за наявності генотипу ризику Т/Т і мінорного алелю Т проти предкового генотипу G/G і протективного алелю G, а рівень швидкості клубочкової фільтрації – суттєво нижчим. Це вказувало на патогенетичну роль мінорного алелю Т для показників функції нирок при ЦД 2 типу.

Вплив поліморфізму rs1799983 гена NOS3 на чинники ЕДФ подано у таблиці 6.

Як і можна було очікувати, серед всіх чинників ЕДФ, вплив генотипів поліморфізму rs1799983 гена NOS3 виявився у відношенні вмісту у крові NO (H=13,79; p=0,001) та, більшою мірою, – eNOS (H=71,77; p < 0,001). З рештою чинників (ET1, TNF $\alpha$  та ДК) впливу виявлено не було. При цьому, рівень у крові NO був вищим за наявності протективного генотипу G/G проти генотипу ризику Т/Т. Аналогічні результати демонстрував і вплив алелів (за критерієм Mann-Whitney для NO: U=8630; p=2,9·10<sup>-4</sup> і для eNOS: U=4732; p=2,2·10<sup>-18</sup>). Рівень у крові eNOS також був вищим за наявності протективного генотипу

## Вплив генотипів поліморфізму rs179983 гена NOS3 на клініко-лабораторні показники, що асоціюються з функцією нирок, Me (Q1;Q3)

| Показники           | Генотипи                 |                          |                          | Н    | р     |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------|-------|
|                     | G/G, n=51                | G/T, n=68                | T/T, n=33                |      |       |
| Діурез, л на добу   | 2,00<br>(1,80; 2,00)     | 2,00<br>(1,75; 2,15)     | 2,00<br>(1,70; 2,00)     | 2,53 | 0,282 |
| ШКФ, мл/хв          | 91,70<br>(77,99; 107,81) | 91,69<br>(71,81; 105,08) | 74,96<br>(58,87; 88,74)  | 8,28 | 0,016 |
| Сечовина, ммоль/л   | 6,40<br>(5,40; 7,50)     | 6,30<br>(5,15; 7,50)     | 7,00<br>(6,00; 8,90)     | 5,18 | 0,075 |
| Креатинін, мкмоль/л | 84,00<br>(73,00; 93,00)  | 80,00<br>(71,00; 92,00)  | 89,00<br>(80,00; 118,00) | 8,74 | 0,013 |
| Глюкозурія, г/л     | 6,30<br>(0,00; 18,00)    | 10,30<br>(0,40; 26,60)   | 5,10<br>(0,00; 18,45)    | 2,18 | 0,336 |
| МАУ, мг на добу     | 65,41<br>(40,72; 100,30) | 68,48<br>(35,02; 101,35) | 90,00<br>(76,17; 119,20) | 8,32 | 0,016 |

**Примітки:** ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації; МАУ – мікроальбумінурія; Н – критерій Kruskal-Wallis; р – статистична значущість розбіжностей

## Вплив генотипу rs179983 гена NOS3 на вміст чинників ЕДФ, Me (Q1; Q3)

| Показники            | Генотипи                   |                            |                            | Н     | р      |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|--------|
|                      | G/G, n=51                  | G/T, n=68                  | T/T, n=33                  |       |        |
| ET1, фмоль/мл        | 2,13<br>(1,94; 2,63)       | 2,29<br>(1,93; 2,57)       | 2,40<br>(2,13; 2,56)       | 2,28  | 0,319  |
| NO, мкмоль/л         | 6,47<br>(5,97; 7,04)       | 6,36<br>(6,36; 5,78)       | 6,04<br>(5,65; 6,31)       | 13,79 | 0,001  |
| eNOS, пг/мл          | 269,78<br>(250,31; 364,79) | 210,19<br>(191,85; 253,71) | 159,22<br>(151,91; 220,13) | 71,77 | <0,001 |
| TNF $\alpha$ , пг/мл | 103,23<br>(91,74; 124,34)  | 107,63<br>(81,43; 125,88)  | 93,36<br>(72,87; 114,74)   | 3,46  | 0,178  |
| ДК, Е/мл             | 5,41<br>(4,74; 5,65)       | 5,30<br>(4,39; 5,56)       | 5,19<br>(4,55; 5,65)       | 1,45  | 0,485  |

**Примітки:** ET1 – ендотелін 1; NO – оксид азоту; eNOS – ендотеліальна NO-синтаза; TNF $\alpha$  – фактор некрозу пухлин альфа; ДК – дієнові кон'югати; Н – критерій Kruskal-Wallis; р – статистична значущість розбіжностей між групами.

G/G проти генотипу ризику T/T та алелі G проти алелі T. Отже, генотип ризику T/T та мінорна алель T сприяли зменшенню рівнів у крові і NO, і eNOS, що у наших дослідженнях відповідало накопиченню у крові креатиніну, мікроальбумінурії і зменшенню

швидкості клубочкової фільтрації, що в свою чергу, обґрунтовувало зв'язок поліморфізму rs179983 гена NOS3 з розвитком саме діабетичної нефропатії.

## ВИСНОВКИ

1. Доведено, що у хворих на ЦД 2 типу з української популяції розподіл алелів rs1799983 був пов'язаний з розвитком захворювання ( $\chi^2=5,82$ ;  $p=0,016$ ). Наявність у генотипі мінорного алелю Т збільшувала у 1,6 рази (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32) шанси розвитку ЦД 2 типу. Зв'язок із захворюванням за домінантною моделлю успадкування (G/G проти G/T+T/T) показав, що патогенна дія rs1799983 проявлялася за умов наявності у генотипі мінорного алелю Т (ВШ=1,92; 95% ВІ 0,94-3,93;  $p=0,045$ ).

2. Наявність алелю Т сприяла декомпенсації ЦД 2 типу за ступенем глікування білка (більший рівень НbA1C), погіршенню функції нирок (збільшенню рівня в крові креатиніну, мікроальбумінурії та зменшенню клубочкової фільтрації), що могло бути пов'язаним з меншим рівнем у крові NO та eNOS. Саме це обумовлювало вплив алелю Т на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ( $\chi^2=8,00$ ;  $p=0,005$ ) і за рівнем мікроальбумінурії ( $\chi^2=4,81$ ;  $p=0,028$ ) та обґрунтовувало його вплив на наявність артеріальної гіпертензії ( $\chi^2=4,74$ ;  $p=0,029$ ).

*Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів при написанні статті.*

## ЛІТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pankiv VI. [Diabetes mellitus: diagnostic criteria, etiology and pathogenesis]. International Endocrinology Journal. 2013;8(56):53-64. [In Ukrainian].
2. Type 2 Diabetes Complications. Web-resource: [www.endocrineweb.com/conditions/type-2-diabetes](http://www.endocrineweb.com/conditions/type-2-diabetes).
3. Pi X, Xie L, Patterson C. Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis. Circ Res. 2018 Aug 3;123(4):477-494. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313237.
4. Sinyachenko OV, Ziablitsev SV, Chernobryvtsev PA. [Endothelial dysfunction in glomerulonephritis]. Donetsk: New World; 2006. 152 p. [In Russian].
5. Carrizzo A, Izzo C, Oliveti M, et al. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. Int J Mol Sci. 2018 Sep 28;19(10):2968. pii: E2968. doi: 10.3390/ijms19102968.
6. Babik B, Peták F, Agócs S, Blaskovics I, Alács E, Bodó K, Südy R. [Diabetes mellitus: endothelial dysfunction and changes in hemostasis]. Orv Hetil. 2018 Aug;159(33):1335-1345. doi: 10.1556/650.2018.31130. [In Hungarian].
7. Polovina MM, Potpara TS. Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. Postgrad Med. 2014 Mar; 126(2):38-53. doi: 10.3810/pgm.2014.03.2739.
8. Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, López-Mestanza C, Duque P, Almansa R. Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). J Clin Med. 2018 Oct 30;7(11). pii: E400. doi: 10.3390/jcm7110400.
9. Rani J, Mittal I, Pramanik A, et al. T2DiACoD: a gene atlas of type 2 diabetes mellitus associated complex disorders. Sci Rep. 2017 Jul 31; 7(1):6892. doi: 10.1038/s41598-017-07238-0
10. Campedelli FL, E Silva KSF, Rodrigues DA, Martins JVM, Costa IR, Lagares MH, Barbosa AM, de Moraes MP, Moura KKVO. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis. Genet Mol Res. 2017 May 4; 16(2). doi: 10.4238/gmr16029550
11. Atay AE, Akbas H, Tumer C, Sakar MN, Esen B, Incebiyik A, Simsek S, Sit D. The association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and serum nitric oxide concentration with microalbuminuria in patients with gestational diabetes. Clin Nephrol. 2014 Feb; 81(2):105-111.
12. Sadati SM, Radfar M, Hamidi AK, Abdollahi M, Qorbani M, Esfahani EN, Amoli MM. Association between the polymorphism of Glu298Asp in Exon 7 of the eNOS gene with foot ulcer and oxidative stress in adult patients with type 2 diabetes. Can J Diabetes. 2018 Feb; 42(1):18-22. doi: 10.1016/j.cjcd.2017.03.001
13. Tabatabaei-Malazy O, Khodaeian M, Bitarafan F, Larijani B, Amoli MM. Polymorphisms of Antioxidant Genes as a Target for Diabetes Management. Int J Mol Cell Med. 2017 Summer; 6(3):135-147. doi: [10.22088/acadpub.BUMS.6.3.135]
14. IDF Diabetes Atlas Eighth Edition, 2017: 149. <http://www.diabetesatlas.org/>
15. Order of the Ministry of Health of Ukraine; dated December 21, 2012, No. 1118 "On Approval and Implementation of Medical-Technological Documents for the Standardization of Medical Aid in Type 2 Diabetes". Unified clinical protocol for primary and secondary (specialized) medical aid "Diabetes type 2". 2012. Kyiv.
16. El-Lebedy D. Interaction between endothelial nitric oxide synthase rs1799983, cholesteryl ester-transfer protein rs708272 and angiopoietin-like protein 8



- rs2278426 gene variants highly elevates the risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2018 Jul 4; 17(1):97. doi: 10.1186/s12933-018-0742-8
17. Li JY, Tao F, Wu XX, Tan YZ, He L, Lu H. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes contribute to the development of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Genet Mol Res.* 2015 Oct 21; 14(4):12993-3002. doi: 10.4238/2015.October.21.20.
18. Jia Z, Zhang X, Kang S, Wu Y. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Endocr J.* 2013; 60(7):893-901. Epub 2013 Apr 7.
19. Toda N, Imamura T, Okamura T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther.* 2010 Sep; 127(3):189-209.
20. Huo P, Zhang D, Guan X, Mei Y, Zheng H, Feng X. Association between genetic polymorphisms of ACE & eNOS and diabetic nephropathy. *Mol Biol Rep.* 2015 Jan; 42(1):27-33. doi: 10.1007/s11033-014-3736-y
21. Mogilevskyy Slu, Bushuieva OV, Ziablitsev SV, Natrus LV. Relationship of the AKR1B1 rs759853 and rs9640883 with the development of diabetic retinopathy. *Journal of Ophthalmology (Ukraine).* 2017; 2:3-7. <https://doi.org/10.31288/ofthalmolzh2017237>

## РЕЗЮМЕ

**Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень**

**С.В. Зябліцев, О.П. Чернобривцев, Д.С. Зябліцев, С.О.Тарасенко**

Судинні ускладнення цукрового діабету (ЦД) можуть визначатися розвитком ендотеліальної дисфункції (ЕДФ), розвиток якої, в свою чергу, може залежати від поліморфізму генів, що регулюють стан ендотелію.

**Мета:** проведення аналізу результатів визначення асоціації поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з ЦД 2 типу, розвитком ускладнень, клініко-лабораторними показниками, що характеризують тяжкість перебігу захворювання та розвиток ЕДФ.

**Матеріал та методи.** До дослідження залучено дані 152 хворих з ЦД 2 типу, віком від 34 до 80 років (53,9±8,4 року). До контрольної групи було залучено 95 практично здорових осіб. За результатами клініко-лабораторних обстежень визначали

наявність ретинопатії, нефропатії за рівнями мікроальбумінурії та швидкості клубочкової фільтрації, сенсорної полінейропатії, ангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії. Поліморфізм rs1799983 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ампліфікатор Gene Amp® PCR System 7500 Applied Biosystems, США) за допомогою тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Для статистичної обробки отриманих даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., США).

**Результати та їх обговорення.** У хворих на ЦД 2 типу з української популяції розподіл алелів rs1799983 був пов'язаний з розвитком захворювання ( $\chi^2=5,82$ ;  $p=0,016$ ). Алель Т збільшував у 1,6 рази (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32) шанси розвитку ЦД 2 типу; вірогідною була домінантна модель успадкування (G/G проти G/T+T/T): ВШ=1,92; 95% ВІ 0,94-3,93 ( $p=0,045$ ). Алель Т сприяв більшому рівню HbA1C, збільшенню рівня в крові креатиніну, мікроальбумінурії та зменшенню клубочкової фільтрації, що могло бути пов'язаним з меншим рівнем у крові оксиду азоту (NO) та eNOS. Це, на наш погляд, обумовлювало вплив алелю Т на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ( $\chi^2=8,00$ ;  $p=0,005$ ) і за рівнем мікроальбумінурії ( $\chi^2=4,81$ ;  $p=0,028$ ) та обґрунтовувало його вплив на наявність артеріальної гіпертензії ( $\chi^2=4,74$ ;  $p=0,029$ ).

**Висновок.** Поліморфізм rs1799983 гена NOS3, який призводить до зниження активності eNOS, має відношення до розвитку нефропатії та артеріальної гіпертензії у хворих на ЦД 2 типу з української популяції.

**Ключові слова:** цукровий діабет 2 типу, нефропатія, артеріальна гіпертензія, поліморфізм rs1799983 гена NOS3

## SUMMARY

**The relationship of the polymorphism rs1799983 NOS3 gene with type 2 diabetes mellitus and the development of its complications**

**Ziablitsev SV, Chernobryvtsev OP, Ziablitsev DS, Tarasenko SO**

The vascular complications of diabetes mellitus (DM) may be determined by the development of endothelial dysfunction (EDF), the development of which, in turn, may depend on the polymorphism of the genes regulating the state of the endothelium.

**Aim:** to analyze the results of the determination of

association of polymorphism rs1799983 of the NOS3 gene with DM 2 type, development of complications, clinical and laboratory parameters characterizing the severity of the course of the disease and the development of EDF.

**Material and methods.** The study involved 152 patients with DM 2 type, aged 34-80 years ( $53.9 \pm 8.4$  years). The control group involved 95 healthy persons. The results of clinical and laboratory tests determined the presence of retinopathy, nephropathy by levels of microalbuminuria and glomerular filtration rate, sensory polyneuropathy, angiopathy of the lower extremities, and arterial hypertension. Polymorphism rs1799983 was determined by real-time polymerase chain reaction (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 7500 Applied Biosystems, USA) using TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (USA) test systems. Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) was used to statistically process the data obtained.

**Results and discussion.** In patients with DM 2 type in the Ukrainian population, the distribution of alleles T rs1799983 was associated with the development of the

disease ( $\chi^2=5.82$ ;  $p=0.016$ ). Allele T increased by 1.6 times (OR=1.59; 95% CI 1.09-2.32) chances of development of DM 2 type; the dominant model of inheritance (G/G versus G/T+T/T) was probable: OR=1.92; 95% CI 0.94-3.93 ( $p=0.045$ ). Allele T contributed to a higher level of HbA1C, increased levels of creatinine, microalbuminuria, and reduced glomerular filtration, which could be associated with lower levels of nitric oxide (NO) and eNOS. This, in our opinion, determined the effect of allele T on the presence of nephropathy at the rate of glomerular filtration ( $\chi^2=8.00$ ;  $p=0.005$ ) and the level of microalbuminuria ( $\chi^2=4.81$ ;  $p=0.028$ ) and justified its effect on the presence of arterial hypertension ( $\chi^2=4.74$ ;  $p=0.029$ ).

**Conclusion.** Polymorphism rs1799983 of the NOS3 gene, which leads to a decrease in the eNOS activity, is relevant to the development of nephropathy and arterial hypertension in patients with DM 2 type in the Ukrainian population.

**Key words:** Diabetes mellitus 2 type, nephropathy, arterial hypertension, polymorphism rs1799983 of the NOS3 gene.

*Дата надходження до редакції 19.10.2018 р.*