

Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы и генетическая предрасположенность к нефропатии при инсулинзависимом сахарном диабете

О.Е. Воронько, Д.А. Чистяков, М. В. Шестакова, Л. А. Чугунова, М. Ш. Шамхалова, В. В. Носиков, В. Г. Дебабов, И. И. Дедов

*Государственный научный центр РФ "ГосНИИ генетика" (дир. - член-корр. РАН В.Г. Дебабов),
Эндокринологический научный центр (дир.-акад. РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва*

Диабетическая нефропатия (ДН) при инсулинзависимом сахарном диабете (ИЗСД) является объектом интенсивных генетических исследований. Это объясняется как наличием четких диагностических критериев и возможностью их количественной оценки, так и широким кругом наследственных факторов, прямым или косвенным образом формирующих генетическую предрасположенность к данной патологии.

К числу последних относится ген эндотелиальной NO-синтазы (NOS₃). Этот фермент катализирует реакцию образования окиси азота (NO) из L-аргинина. NO, ранее описанная как эндотелиальный фактор релаксации [9], играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов (вазодилатация), работы гладкомышечной мускулатуры сосудистой стенки и процессе тромбообразования. Биологическая активность эндотелиальной NO-синтазы регулируется Ca-кальмодулином, а экспрессия в клетках эндотелия происходит непрерывно, в отличие от NO-синтазы макрофагов.

Ген NOS₃ расположен на хромосоме 7q36 [5] и состоит из 26 экзонов. В экзонах и интронах обнаружено несколько полиморфных участков, среди которых в настоящем исследовании изучены два, а именно минисателлитный повтор в интроне 4 (ecNOS4b/4a) [7] и мутация в положении 298 белковой последовательности, ведущая к замене остатка глутаминовой кислоты на аспарагиновую (Glu298Asp) [17].

Минисателлит ecNOS4b/4a в 4-м интроне насчитывает 2 аллеля, состоящих из 4 или 5 tandemных повторов размером 27 пар нуклеотидов (п.н.). Аллель ecNOS4a включает 4 повтора и короче другого аллеля (ecNOS4b) на 27 п.н. [15]. В популяции аллель ecNOS4b встречается значительно чаще, чем аллель с 4 повторами. У австралийских европеоидов и японцев, гомозиготных по редкому аллелю, уровень нитратов и нитритов в крови, напрямую связанный со скоростью выработки NO эндотелием сосудов, достоверно выше, чем у индивидов с генотипом 4b/4b, что свидетельствует о потенциальной генетической роли генотипа 4a/4a как фактора риска развития атеросклероза и заболеваний, приводящих к нарушению нормальной выработки окиси азота [12, 14].

Показаны достоверно более высокое содержание аллеля 4a и частота генотипа 4a/4a у пациентов

со стенокардией в Австралии [15], среди японцев гипертонией и перенесших инфаркт миокарда [13], что указывает на очевидное участие гена NOS₃ в генезе сердечно-сосудистых нарушений. Четко прослеживается связь между уровнем продукции NO в организме и выраженностью окислительного стресса при сосудистой патологии: ингибирование синтеза и резкое снижение содержания NO в кровяном русле при накоплении свободных радикалов кислорода и перекисей. Последний факт подтверждается наблюдениями, выявившими достоверно более низкое содержание внеклеточной супероксиддисмутазы (одного из ферментов антиоксидантной защиты) у гомозиготных носителей аллеля 4 гена NOS₃ по сравнению с другими вариантами генотипов [2].

Мутация в 298-м положении связана с инфарктом миокарда [8, 10], артериальной гипертензией [3, 4, 16], ишемической цереброваскулярной болезнью [6]; обнаружена более высокая частота встречаемости молекулярного варианта NO-синтазы с остатком аспарагиновой кислоты 298-й позиции. Регрессионный анализ позволял рассматривать аллель 298Asp в качестве независимого фактора риска развития инфаркта миокарда в японской популяции наряду с такими факторами, как сахарный диабет, гипертония, курение, ожирение, повышенное содержание холестерина и др. [10].

Пока нет данных о результатах генетических исследований роли эндотелиальной NO-синтазы в патогенезе ДН при ИЗСД. Предпринятая нами попытка оценить вклад этого гена в развитие ДН в московской популяции представляет интерес как с точки зрения углубления медико-генетических знаний о данной патологии, так и инициирования новых исследований генетики СД и его сосудистых осложнений.

Материалы и методы

Генотипирование по двум описанным полиморфным маркерам гена NOS₃ проводили на геномной ДНК, выделенной из цельной крови 76 больных ИЗСД с наличием (n=29) и отсутствием (n=47) ДН. Группы пациентов формировали по принципу неперекрывающихся ("полярных") фенотипов. В группу "ДН+" вошли больные с длительностью диабета не более 15 лет и протеинурией (альбуминурия свыше 300 мг/сут). Группу "ДН-" составили пациенты с альбуминурией менее 200 мг/сут, болеющие ИЗСД на протяжении 20 лет и более. Полиморфные участки гена NOS₃ амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Аллели полиморфного участка есNOS4b/4a идентифицировали, разделяя продукты ПЦР в агарозном геле. В случае мутации Glu298Asp аллели определяли после расщепления амплифицированных фрагментов ДНК рестриктазой MboI и электрофоретического разделения в агарозном геле. Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена NOS₃ в группах "ДН+" и "ДН-" сравнивали с помощью критерия Фишера, считая достоверными различия при p<0,05. Относительный риск (RR) рассчитывали, рассматривая значения RR>1 как фактор риска развития данной патологии, а RR<1 как предохраняющий фактор [1].

Результаты и их обсуждение

Анализ полиморфизма варибельного участка Glu298Asp гена NOS₃ у больных ИЗСД группы "ДН-" выявил существенное преобладание аллеля Glu298, частота встречаемости которого почти в 4 раза превышала таковую Asp298 (табл. 1). Как следствие в этой группе наиболее широко представлен гомозиготный генотип Glu/Glu (61,7%). Гомозиготы Asp/Asp встречались крайне редко: данный генотип обнаружен лишь у 1 пациента из 47. Распределение аллелей и генотипов при ДН носило тот же характер, что и в группе "ДН-", с той разницей, что у пациентов с ДН не найден генотип Asp/Asp. Ввиду очевидной близости характера распределения аллелей и генотипов гена NOS₃ в обеих группах сравнительный анализ по Фишеру не выявил каких-либо различий в частотах встречаемости как аллелей, так и генотипов. Таким образом, в московской популяции полиморфный участок Glu298Asp гена NOS₃ не связан с ДН при ИЗСД.

В обеих группах больных обнаружено два аллеля минисателлита есNOS4b/4a; содержание аллеля 4b значительно превышало долю аллеля 4a (табл. 2). У больных с ДН наиболее распространены гетерозиготы 4a/4b, у пациентов без ДН, напротив, преобладал гомозиготный вариант 4b/4b. Генотип 4a/4a не выявлен в обеих группах.

По сравнению с контрольной группой у пациентов с ДН более чем в 1,5 раза повышено содержание аллеля 4a на фоне соответствующего уменьшения доли аллеля 4b (различия недостоверны). В группе "ДН+" частота встречаемости генотипа 4b/4b в 1,7 раза меньше, чем в группе "ДН-". Содержание гетерозигот 4a/4b, напротив, увеличено в 1,5 раза (различия достоверны).

Следовательно, полиморфный маркер есNOS4b/4a гена эндотелиальной синтазы NO ассоциирован с ДН при ИЗСД в московской популяции. Наличие генотипа 4a/4b увеличивает риск развития данной патологии (RR=2,49), тогда как гомозиготное носительство аллеля 4b ослабляет (RR=0,40). Данный вывод носит предварительный характер и для уточнения полученных результатов необходимо увеличение численности обследованных.

Если ген NOS₃ вовлечен в развитие ДН при ИЗСД, то его роль в патогенезе, по всей видимости, не столь выражена, как у гена ангиотензинпревращающего фермента, осуществляющего синтез ангиотензина II — регуляторного пептида, который по действию на тонус сосудов является антагонистом NO. На наш взгляд, для гена NOS₃ более характерно участие в развитии макрососудистых нарушений; кроме сосудорасширяющей функции NO важно учитывать и ее влияние на процесс агрегации тромбоцитов.

Таблица 1

Распределение аллелей (%) и генотипов (%) полиморфного участка Glu298Asp гена NOS₃ в группах больных ИЗСД с "ДН+" и "ДН-"

Генетический маркер	"ДН+"	"ДН-"	p	RR
Аллель Asp	17,2	20,2	0,40919	0,84
Аллель Glu	82,8	79,8	0,40919	1,19
Генотип Asp/Asp	0	2,1	0,61843	0,53
Генотип Glu/Asp	34,5	36,2	0,54099	0,94
Генотип Glu/Glu	65,5	61,7	0,46221	1,18

Таблица 2

Распределение аллелей (%) и генотипов (%) минисателлита есNOS4b/4a гена NOS₃ в группах больных ИЗСД с "ДН+" и "ДН-"

Генетический маркер	"ДН+"	"ДН-"	p	RR
Аллель 4a	32,8	21,3	0,96067	1,79
Аллель 4b	67,2	78,7	0,96067	0,56
Генотип 4a/4a	0	0	1,0	1,61
Генотип 4a/4b	65,5	42,6	0,04319	2,49
Генотип 4b/4b	34,5	57,4	0,04319	0,40

Литература

1. Чистяков Д.А., Туракулов Р.И., Демуров Л.М. и др. // Молекул. биол. - 1997. - Т. 31. - No 5. - С. 778 - 783.
2. Adachi T., Wang X.L. // FEBS Lett. - 1998. - Vol. 14. - P. 166 - 168.
3. Hibi K., Ishigami T., Tamura K. et al. // Hypertension. - 1998. - Vol. 32. - P. 521 - 526.
4. Lacolley P., Gautier S., Poirier O. et al. // J. Hypertens. - 1998. - Vol. 16. - P. 31 - 35.
5. Mardsen P.A., Schappert K.T., Chen H.S. et al. // FEBS Lett. - 1992. - Vol. 307. - P. 287 - 293.
6. Markus H.S., Ruigrok Y., Ali N., Powell J.F. // Stroke. 1998. Vol. 29. P. 1908 - 1911.
7. Miyahara K., Kawamoto T., Sase K. et al. // Eur. J. Biochem. - 1994. - Vol. 223. - P. 719 - 726.
8. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N. et al. // Hypertension. - 1998. - Vol. 32. - P. 3 - 8.
9. Rapoport R.M., Murad F. // Circ. Res. - 1983. - Vol. 52. - P. 352 - 357.
10. Shimasaki Y., Yasue H., Yoshimura H. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. - 1998. - Vol. 32. - P. 1506 - 1510.
11. Tchiara S., Yamada Y., Fujimura T. // Am. J. Cardiol. - 1998. - Vol. 81. - P. 83-86.
12. Tsukada T., Yokoyama K., Arai T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1998. - Vol. 245. - P. 190 - 193.
13. Uwabo J., Soma M., Nakayama T. // Am. J. Hypertens. - 1998. - Vol. 11. - P. 125. - 128.
14. Wang X.L., Mahaney M.C., Sim A.S. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 1997. - Vol. 17. - P. 3147 - 3153.
15. Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F. et al. // Nat. Med. - 1996. - Vol. 2. - P. 41 - 45.
16. Yasujima M., Tsutaya S., Shoji M. // Rincho Byori. - 1998. - Vol. 46. - P. 1199 - 1204.
17. Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. // Hum. Genet. - 1998. - Vol. 103. - P. 65 - 69.