Гены синтаз оксида азота (NOS1, NOS3) в развитии предрасположенности к сахарному диабету 1 типа

Е.И. Кондратьева[1], В.П. Пузырев[1,2], Н.В. Тарасенко[1], Т.В. Косянкова[2], Т.А. Милованова[1], Н.Г. Гулиева[1], Т.К. Гудкова[1]

[1]ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет (ректор – акад. РАМН В.В. Новицкий), МЗ РФ
[2]ГУ НИИ медицинской генетики (дир. – акад. РАМН В.П. Пузырев), ТНЦ СО РАМН, Томск

Достижения современной генетики, использование ДНК-технологий и компьютеризации позволили начать активное изучение генетических основ сахарного диабета [1, 2, 6, 7, 16]. Роль генетических факторов в развитии сахарного диабета 1 типа (СД1) общепризнана. СД1 относится к многочисленной группе мультифакториальных заболеваний, имеющих полигенную природу наследования, в появлении которых повинны как генетические, так и экзогенные факторы [8, 9, 16].

Одной из наиболее продуктивных современных технологий геномных исследований СД1 является анализ ассоциаций полиморфных генетических маркеров, связанных с локусами генов, вносящих вклад в развитие болезни (кандидатных генов) [8, 9]. Список возможных кандидатных генов СД1 довольно обширен и включает гены многих метаболических и физиологических систем: гены ренин-ангиотензиновой системы, оксида азота, цитокинов и т. д. Эти гены активно исследуют в настоящее время, чтобы оценить силу их влияния на те или иные клинические проявления болезни, выявить их сочетания («генетические ансамбли»), которые либо предрасполагают, либо препятствуют развитию сахарного диабета и его сосудистых осложнений [4, 6, 7, 12–14].

Оксид азота (NO) является участником практически всех метаболических и физиологических процессов, играя роль универсального регулятора. NO образуется в эндотелии сосудов, гранулоцитах, макрофагах, тромбоцитах, гепатоцитах, гладкомышечных клетках, мезанглиальных и нейронах. Он регулирует тонус кровеносных сосудов, тормозит агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках сосудов, вызывает расслабление гладких мышц. NO функционирует в центральной и вегетативной нервной системе [5, 10]. Наряду с регуляторными функциями, NO обладает цитостатической/цитотоксической активностью, выступая в качестве одного из основных эффекторов системы клеточного иммунитета: гиперпродукция NO активированными макрофагами и нейтрофилами коррелирует с их цитотоксическим эффектом при аутоиммунных процессах. Особый интерес представляет способность NO и его производных влиять на синтез ряда важнейших белков и ферментов как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции [10].

Синтез NO осуществляется семейством цитохром Р-450-подобных гемопротеинов – NO синтаз (NOS). Различают 3 формы NOS: нейрональную (nNOS), индуцибельную (iNOS) и эндотелиальную (eNOS), которые кодируют соответствующие гены: NOS1, NOS2 и NOS3 [16–18]. Данные гены идентифицированы, установлена их экспрессия в различных клетках и тканях, а также их взаимосвязь с различной патологией человека (табл. 1). Ген NOS1 картирован на длинном плече 12-й хромосомы (12q24.2-q24.3). Размер гена составляет более 200 kb и включает в себя 29 экзонов и 28 интронов [16–18]. Описано более 100 полиморфных маркеров гена NOS1. Показана роль nNOS в патогенезе диабетической нейропатии в эксперименте (в спинном нервном ганглии крыс с диабетом). Одним из ранних сосудистых осложнений СД является диабетическая ретинопатия; в сетчатке животных с экспериментальным диабетом увеличено количество NO. Ген NOS3 картирован на длинном плече 7-й хромосомы (7q36), состоит из 26 экзонов и 25 интронов, размером около 20 kb [16–18]. Известно более 100 полиморфных маркеров гена NOS3, наиболее изученными являются следующие полиморфные маркеры: VNTR, 894G/T, -691C/T, -788C/T, 774C/T, 1998C/G.

Таблица 1

Характеристика изоформ синтаз оксида азота

Ген/характеристика	nNOS (нейрональная синтаза оксида азота)	eNOS (эндотелиальная синтаза оксида азота)
Хромосомная локализация	12q24.2-q24.3	7q35-q36
Локализация в клетке	Цитоплазма	Связаны с мембраной
Типы клеток	Нейроны, миоциты скелетной мускулатуры	Эндотелий, тромбоциты, миокард
Активация	Кальцийзависимая	Кальцийзависимая
Ответ на стимуляцию	Конститутивный фермент	Конститутивный фермент

Таблица 2

Распределение генотипов генов NOS1, NOS3 у больных сахарным диабетом 1 типа и здоровых лиц

Группа	n	Ген	Генотип	NO	χ^2 d.f. = 1	H.o.±s.e. H.e.±s.e.
Больные СД1	142	NOS1 (C/T)	CC CT TT	70 66 6	3,9386 p<0,05	H.o. = 0,4648±0,0419 H.e. = 0,3984±0,0239
Контроль	237		CC CT TT	94 115 28	0,6421 p>0,05	H.o. = 0,4852±0,0325 H.e. = 0,4612±0,0123
Больные СД1	124	NOS3 (VNTR)	AA AB BB	5 24 95	4,1059 p<0,05	H.o. = 0,1935±0,0355 H.e. = 0,2366±0,0316
Контроль	122		AA AB BB	5 29 88	1,6120 p>0,05	H.o. = 0,2377±0,0385 H.e. = 0,2686±0,0318
Больные СД1	148	NOS3 (C691T)	CC CT TT	117 30 1	0,3870 p>0,05	H.o. = 0,2027±0,0330 H.e. = 0,1928±0,0282
Контроль	235		CC CT TT	158 73 4	1,8571 p>0,05	H.o. = 0,3106±0,0302 H.e. = 0,2853±0,0228
Больные СД1	147	NOS3 (G894T)	GG GT TT	66 68 13	0,5910 p>0,05	H.o. = 0,4626±0,0411 H.e. = 0,4350±0,0197
Контроль	240		GG GT TT	88 106 46	1,8908 p>0,05	H.o. = 0,4417±0,0321 H.e. = 0,4847±0,0080
Больные СД1	143	NOS3 (C774T)	CC CT TT	103 38 2	0,5234 p>0,05	H.o. = 0,2657±0,0369 H.e. = 0,2506±0,0295
Контроль	118		CC CT TT	80 31 7	2,6130 p>0,05	H.o. = 0,2627±0,0405 H.e. = 0,3086±0,0316

Примечание: n – количество обследованных; NO – наблюдаемая численность генотипов; χ^2 – критерий использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому исходя из равновесия Харди–Вайнберга; d.f. – число степеней свободы; H.o. и H.e. – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность с ошибкой; p – значимость различий по сравнению с контролем.

В клетках эндотелия сосудов находится зависимая от Ca^{2+} и кальмодулина eNOS, вырабатываемый ею NO является самым мощным из известных эндогенных вазодилататоров. Общей же причиной всех диабетических микроангиопатий является изменение работы клеток эндотелия сосудов – эндотелиальная дисфункция [10]. Данные о роли NO в патогенезе диабетических ангиопатий (ДА) противоречивы. В ряде исследований обнаружено снижение продукции NO тромбоцитами при СД: предполагают, что дефицит NO имеет значение в развитии гиперагрегации тромбоцитов. В других исследованиях выявлено повышение активности тромбоцитарной NO-синтазы у больных СД1 с нефропатией. Вместе с тем содержание метаболитов NO в плазме при СД может быть как повышенным, так и сниженным [10].

Цель исследования заключалась в изучении полиморфных маркеров генов нейрональной и эндотелиальной синтаз оксида азота (NOS1 и NOS3), а также иммунологических показателей (клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, структурно-метаболический статус и функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов) у больных СД1 на популяционном и семейном уровне.

Объект и методы исследования

Для исследования было выбрано два дизайна. Первый дизайн: случай (163 ребенка больных СД1) – контроль (243 индивида русской национальности, проживающих в Томске и не имеющих по данным клинического, инструментального обследования СД1 и признаков сердечно-сосудистых нарушений). Второй дизайн: случай (80 детей и подростков больных СД1) – контроль (родственники первой степени родства – 220 человек). В исследование вошли 80 полных и 30 неполных

Таблица 3

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизмов генов NOS1, NOS3 среди больных сахарным диабетом типа 1 и здоровых лиц

Группа	n	Ген	Частоты генотипов,%	χ^2	p	Частоты аллелей, %	χ^{2}*	p	OR	p
Больные СД1	142	NOS1 (C/T)	CC 49 CT 46 TT 5	7,683	0,021	C 72 T 28	5,586	0,018	1,491	0,016
Контроль	237		CC 40 CT 48 TT 12			C 64 T 36				
Больные СД1	148	NOS3 (C691T)	CC 79 CT 20 TT 1	6,434	0,040	C 89 T 11	5,459	0,019	1,718	0,019
Контроль	235		CC 67 CT 31 TT 2			C 83 T 17				
Больные СД1	143	NOS3 (C774T)	CC 107 CT 30 TT 2	4,786	0,050	C 85 T 15	4,650	0,031	1,750	0,031
Контроль	118		CC 80 CT 31 TT 7			C 80 T 20				
Больные СД1	147	NOS3 (G894T)	GG 45 GT 46 TT 9	8,013	0,018	G 68 T 32	6,290	0,012	1,490	0,012
Контроль	240		GG 37 GT 44 TT 19			G 59 T 41				
Больные СД1	124	NOS3 (VNTR)	AA 4 AB 19 BB 77	5,023	0,643	A 14 B 86	0,320	0,573	1,220	0,573
Контроль	122		AA 4 AB 24 BB 72			A 16 B 86				

Примечание: n – число обследованных; χ^2 – критерий использован для сравнения частот генотипов у больных СД1 и здоровых лиц; χ^{2}* – критерий использован для сравнения частот аллелей у больных СД1 и здоровых лиц; OR – относительный риск; p – значимость различий по сравнению с контролем.

семей пробандов с СД1. Анализ родословных включал данные о 4500 родственниках пробандов с СД1.

Диагноз СД1 устанавливали после детального клинико-инструментального обследования в условиях специализированного стационара на основании критериев Комитета экспертов ВОЗ (1999) и Федеральной целевой программы «Сахарный диабет» (2002) [3].

Были изучены один полиморфный маркер гена NOS1 – C/T (в 18 экзоне) и четыре полиморфных маркера гена NOS3 (VNTR в интроне 4, -691C/T в области промотора и две нуклеотидные замены – 774C/T, 894G/T в 6-м и 7-м экзонах соответственно) (табл. 2).

Выделение тотальной ДНК проводили стандартным методом. Изучение полиморфных маркеров генов NOS1, NOS3 проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанные в геномной базе данных (GDB) и литературе [16, 17]. Генотипирование полиморфных маркеров осуществляли путем ПДРФ-анализа: продукты амплификации обрабатывали рестриктазами с последующим разделением в 3% агарозном геле. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе «UV-VIS Imager-II» (США).

Иммунологический блок состоял из методов определения клеточного и гуморального иммунитета, факторов неспецифической защиты и углубленного исследования структурно-метаболического статуса и функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) циркулирующего пула. Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов проводили цитотоксическим методом. Определение иммуноглобулинов классов A, M, G в сыворотке проводили по методу G. Manchini (1965). Концентрацию циркули-

Таблица 4

Особенности иммунного статуса пробандов с сахарным диабетом 1 типа в зависимости от генотипов VNTR полиморфизма, полиморфизма C774T и варианта G894T гена NOS3 (X±m)

VNTR полиморфизм			
Показатель	Генотип BB	Генотип AB+AA	
CD4/CD8	1,04±0,15, p<0,05	2,45±1,12	
Полиморфизм C774T			
Показатель	Генотип CC	Генотип CT+TT	
ПСН, ед	10,95±6,04, p<0,05	18,25±10,51, p<0,05	
Полиморфизм G894T			
Показатель	Генотип GG	Генотип GT	Генотип TT
ПСН, ед	10,33±6,41, p<0,05	14,32±7,90, p<0,05	17,80±12,93, p<0,05

Примечание: p – достоверность различия показателей между группами, ПСН – поглотительная способность нейтрофилов.

рующих иммунных комплексов в крови больных определяли методом Ю.А. Гриневич, А.И. Алферова (1981), фагоцитарную активность нейтрофилов – по методу В.М. Берман и соавт. (1988) с модификациями Д.К. Новикова и В.И. Новиковой (1996).

Статистическая обработка результатов: сравнение частот аллелей между группами проводили точным тестом Фишера [11]. На основании частоты встречаемости аллелей в контрольной группе и группах больных был рассчитан относительный риск развития СД1 (OR). Значения OR>1 указывают на возможную положительную ассоциацию аллеля с заболеванием. Для поиска ассоциации патологии с полиморфными маркерами на семейном уровне был использован тест на неравновесие по сцеплению – Transmission / Diseqilibrium Test (TDT): $TDT=(b-c)^2/(b+c)$, где b и c – наследуемые аллели от гетерозиготных родителей [12]. Изучение ассоциаций признаков с полиморфными маркерами проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Для всех полиморфных маркеров, кроме G894T, объединяли редких гомозигот с гетерозиготами. Предварительно проводили проверку распределений в сравниваемых группах на гомоскедастичность (однородность дисперсии) по критерию Брауна–Форсайта. В случае незначимого отличия дисперсий для дисперсионного анализа использовали подход Фишера, при статистически значимом отличии дисперсий использовали тест Краскела–Уоллиса (непараметрический аналог дисперсионного анализа по Фишеру). При необходимости парных сравнений (при статистически значимом дисперсионном комплексе с градацией факторного признака более 2) использовали метод линейных контрастов Шеффе.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что наблюдаемое и ожидаемое распределение генотипов и частот аллелей изучаемых полиморфных маркеров генов у больных СД1 соответствовало равновесию Харди–Вайнберга для всех полиморфных маркеров, за исключением полиморфного маркера C/T гена NOS1 (χ^2=4,210; p<0,05) за счет избытка гетерозигот, а для полиморфного маркера VNTR (χ^2=3,106; p<0,05) гена NOS3 за счет недостатка гетерозигот (см. табл. 2).

Выявлено значимое различие в частотах аллелей и генотипов между больными СД1 и здоровыми лицами для следующих полиморфных маркеров: C/T (ген NOS1), C691T, C774T, G894N, VNTR (ген NOS3) (табл. 3). Анализ методом «случай-контроль» (больные сахарным диабетом – здоровые лица) показал наличие статистически значимой ассоциации полиморфного маркера C/T гена NOS1, при этом OR составил 1,491 (p=0,016). Для полиморфных маркеров гена NOS3 риск развития СД1 возрастал от 1,490 (p=0,012) для полиморфного маркера G894T до 1,718 (p=0,016) для полиморфного маркера C691T, и максимальные значения были получены для полиморфного маркера C774T – 1,750 (p=0,031) (см. табл. 3). Для полиморфного маркера VNTR гена NOS3 взаимосвязь с заболеванием не обнаружена (OR<1).

Для уточнения результатов, полученных методом случай-контроль, исследование было продолжено на семейном уровне с помощью TDT-теста. Поиск ассоциаций с помощью этого теста показал, что аллель B полиморфного маркера VNTR, аллель G полиморфного маркера G894T, аллель C полиморфного маркера C774T гена NOS3 ассоциируются с СД1, при этом показатель TDT-теста составил 2,70 (p=0,054), 3,30 (p=0,050), 4,20 (p=0,016) соответственно. Таким образом, для полиморфного маркера C774T гена NOS3 ассоциация с СД1 была подтверждена двумя методами на популяционном и семейном уровнях с максимальным значением изучаемого показателя, что значительно повышает достоверность полученных результатов. Для полиморфного маркера C691T гена NOS3 не выявлено статистически достоверной ассоциации с СД1 (p>0,05) с помощью TDT-теста.

Патогенетическая роль эндогенного NO при СД1 изучается с двух точек зрения: как фактора, участвующего в индукции самого заболевания, и как фактора, аномальная экспрессия которого играет заметную роль в формировании ангиопатий [10]. Полученные ассоциации косвенно свидетельствуют о вкладе изучаемых

полиморфных маркеров генов NOS1 и NOS3 как в само заболевание, так и в связанные с ним осложнения.

В дальнейшем были изучены показатели иммунитета у детей с СД1 в зависимости от генотипов изучаемых полиморфных маркеров генов NOS1 и NOS3. С помощью однофакторного дисперсионного анализа были установлены следующие иммунологические особенности больных СД1 с различными генотипами указанных генов.

Дети с генотипом BB полиморфного маркера VNTR гена NOS3 имели достоверно меньшее отношение CD4/CD8, чем дети с генотипами AA и AB, что обусловлено снижением количества CD4 у детей с генотипом BB. Соотношение CD4/CD8 у больных СД1 с генотипами AA и AB не отличалось от показателей здоровых детей (2,26±0,19) Томска. Нарушение соотношения CD4/CD8 у больных с генотипом BB косвенно подтверждают описанную ассоциацию аллеля B с СД1 по данным TDT-теста (табл. 4).

Полиморфные маркеры C774T и G894T гена NOS3 были взаимосвязаны со значениями поглотительной способности нейтрофилов (ПСН), которая была повышена у детей с СД1 с генотипами CT и TT полиморфного маркера C774T, а также TT полиморфного маркера G894T гена NOS3. Для СД1 характерна активация НГ циркулирующего пула, детерминируемая хронической гипергликемией на фоне нарушения фагоцитарной активности [5]. Приведенные данные указывают на генетический вклад в активацию НГ у ряда больных СД1 (см. табл. 4) и свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований в данной области.

Выводы

1. Больные сахарным диабетом 1 типа русского населения Томской области достоверно чаще являются носителями аллеля C полиморфного маркера C/T гена нейрональной синтазы NO, аллеля B полиморфного маркера VNTR, аллеля C полиморфного маркера C691T, аллеля C полиморфного маркера C774T и аллеля G полиморфного маркера G894T гена эндотелиальной синтазы NO.

2. Получены следующие ассоциации иммунологических показателей с полиморфными маркерами: CD4/CD8 – VNTR, поглотительная способность нейтрофилов – C774T, поглотительная способность нейтрофилов – G894T гена эндотелиальной синтазы NO.

Литература

1. Александровский Я.А.//Биохимия. – 1998. – Т.63. – В.11. – С.1470-1479.
2. Дедов И.И., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Щербачева Л.Н. Сахарный диабет у детей и подростков. - М., 2002.
3. Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет» (методические рекомендации). - М. Медиа Сфера, 2002.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия М.: Универсум Паблишинг, 2000.
5. Кондратьева Е.И. Клинико-генеалогические и иммуно-метаболические механизмы формирования сахарного диабета 1 типа и его осложнений у детей и подростков и их значение в выборе стратегии реабилитации: Дис. ...д-ра мед. наук - Томск, 2001. (для автореферата).
6. Косянкова Т.В., Кондратьева Е.И., Тарасенко Н.В., Пузырев В.П.//Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Под ред. А.Б. Масленникова. Вып.4. Новосибирск: Альфа Виста. - 2003. С. 107-115.
7. Носиков В.В.//Молекулярная биология. - 2004. Т. 38. № 1. С. 150-164.
8. Пузырев В.П.//Медицинская генетика. 2003. Т. 2. № 12. С. 498-508.
9. Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. -STT, Томск, 1997.
10. Ярек-Мартынова И.Р., Шестакова М.В.//Сахарный диабет. – 2004 - №2. – С. 48 – 52.
11. Allison D.B. // Am. J. Hum. Genet. 1997. V. 60. P. 676-690.
12. Diabetes mellitus. General information. Diabetes Statistics//NIH Publication. 1998. P. 96-3926.
13. Fischmann T.O., Hruza A., Niu X.D., et al.//Nat. Struct. Biol. 1999. V. 6. P. 233—242.
14. Fostermann U., Boissel J.-P., Kleinert H.//The FASEB Journal. 1998. V. № 12. P. 773-790.
15. Kelly C.J., Gold D.P.//Semin Nephrol. 1999. № 19. P. 288-295.
16. McKusick V.A.//Genomics. 1997. V. 45. P. 244-249.
17. http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=NOS1,NOS3.
18. http://bioinfo.weizmann.