

Аналіз асоціації між 11 однонуклеотидними поліморфізмами та рівнем ендотеліозалежної вазодилатації у дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу

Н.Б. Пранік¹, С.В. Гончаров², В.Л. Гур'янова², В.Г. Майданник¹, М.В. Хайтович¹,
О.О. Мойбенко², В.Є. Досенко²

¹Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця МОЗ України, кафедра педіатрії №4, м. Київ;

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: natapranik@gmail.com

Досліджено асоціацію між 11 однонуклеотидними поліморфізмами 10 генів із рівнем ендотеліозалежної вазодилатації (ЕЗВД) у 45 дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу. Вивчали такі поліморфізми: G⁸⁹⁴→T екзону 7 та T⁷⁸⁶→C промотору eNOS, A¹²⁶⁶→G 16 екзону Eln, T³⁸¹→C промотору NPPB, I/D ACE, Arg₆₀→His LMP2, Met²³⁵→Thr AGT, A¹¹⁶⁶→C ATR1, C¹⁵⁶²→T MMP9, C¹³⁰⁶→T MMP2, C⁸→G гена PSMA6. Встановлено, що у дітей із генотипами G/T eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C NPPB (T³⁸¹→C), I/D ACE ЕЗВД нижча (P<0,05) порівняно із іншими алейними варіантами цих генів, та не залежить від тривалості захворювання, рівня глікозильованого гемоглобіну та вихідного діаметра плечової артерії. Посаднання згаданих генотипів більшою мірою впливало на зниження ЕЗВД (r=0,61; P<0,01), ніж кожен з них окремо. Отже, посаднений вплив генотипів G/T eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C NPPB (T³⁸¹→C), I/D ACE на ендотеліальну функцію у дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу, більш значимий, ніж тривалість захворювання та вміст глікозильованого гемоглобіну.

Ключові слова: однонуклеотидні поліморфізми; ендотеліозалежна вазодилатація; цукровий діабет 1-го типу.

ВСТУП

Судинні ускладнення цукрового діабету (ЦД) 1-го типу у вигляді мікро- та макроангіопатій є найбільш значимими в структурі інвалідизації та смертності хворих із цією патологією [1, 2]. Ендотеліальна дисфункція – одна з найбільш показових ознак порушення функціонального стану артеріальних судин, що характеризується неадекватною реакцією на вплив фізіологічних і фармакологічних регуляторів тону судин [3, 4]. Незадовільний глікемічний контроль та тривалість ЦД 1-го типу вважаються основними факторами розвитку ендотеліальної дисфункції, що зумовлює формування пізніх ускладнень ЦД у вигляді діабетичної нефропатії, ретинопатії тощо [5]. Проте ступінь їх прогресування значно відрізняється у різних пацієнтів,

що в літературі пов'язується із генетичною схильністю, а саме із певним набором алейних варіантів – поліморфізмом поодиноких нуклеотидів (SNPs) [6, 7]. Про можливе значення генетичних факторів у розвитку пізніх ускладнень ЦД 1-го типу свідчать наступні факти [8, 9]: 1) значна індивідуальна варіабельність термінів дебюту ускладнень та ступеня ураження органів - мішеней, що не завжди корелює із тривалістю захворювання та якістю компенсації порушень вуглеводного обміну; 2) висока частота виявлення ускладнень, їх тяжкий перебіг та швидке прогресування в певних популяційних групах; 3) підвищений ризик тяжких ускладнень у хворих на ЦД 1-го типу, родичі яких також мають такі ускладнення; 4) пік розвитку діабетичної нефропатії в межах 15-25 років тривалості захворювання

© Н.Б. Пранік, С.В. Гончаров, В.Л. Гур'янова, В.Г. Майданник, М.В. Хайтович, О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко

згідно з епідеміологічними дослідженнями та невисокий ризик формування тяжкої нефропатії, що виникла після 25 років у хворих на ЦД.

У зв'язку з цим останнім часом активізувався пошук SNPs, асоційованих і з схильністю або стійкістю до розвитку судинних ускладнень ЦД. Нині досліджено більше 100 SNPs на предмет їх зв'язку із розвитком та прогресуванням мікроангіопатій (діабетичної нефропатії, ретинопатії) при ЦД 1-го типу серед хворих різних етнічних груп (дані узагальнено в нашому огляді [10]). Проте поза увагою дослідників залишається роль SNPs у патогенезі макроангіопатій у хворих на ЦД 1-го типу, раннім маркером яких є порушення ендотелійзалежної вазодилатації (ЕЗВД).

Мета нашої роботи - пошук асоціації між поліморфізмом поодиноких нуклеотидів 10 генів (11 поліморфізмів) із рівнем ЕЗВД, яка відображає функціональний стан ендотелію великих судин еластично-м'язового типу (плечової артерії).

МЕТОДИКА

Обстежено 45 дітей (18 дівчат та 27 хлопців) хворих на ЦД 1-го типу віком від 7 до 17 років ($14,1 \pm 2,5$), які перебували на стаціонарному лікуванні в Міському ендокринологічному відділенні ДКЛ №6 м. Києва. Тривалість захворювання була від 3 до 16 років ($6,2 \pm 3,5$).

ЕЗВД визначали за допомогою манжеткової проби за стандартною методикою [11]. При порівнянні показників ЕЗВД у групах хворих із різними алейними варіантами досліджуваних генів враховували фактори, що суттєво впливають на ступінь вазодилатації, а саме компенсацію вуглеводного обміну (за вмістом глікозильованого гемоглобіну), тривалість захворювання, вихідний діаметр плечової артерії. Вміст глікозильованого гемоглобіну визначали методом іонообмінної хроматографії за допомогою набору GlycohemoglobinHbA₁-Test (Німеччина) і

він коливався від 5,9 до 11,5% (в середньому $8,4 \pm 1,4\%$).

Для генотипування використовували ДНК, що виділяли за допомогою набору „DIAtom DNA Prep100” (Росія) з букального епітелію. Інсерційно-делеційний поліморфізм 16-го інтрону гена ангіотензинперетворювального ферменту (*ACE*) визначали із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із наступним електрофорезом отриманих ампліфікатів [12]. Для виявлення поліморфізмів наступних генів: G⁸⁹⁴→T - поліморфізм 7-го екзону гена ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*) [13], Arg₆₀→His - поліморфізм гена, що кодує одну з індукбельних субодиниць протеасоми (*LMP2*) [14], Met²³⁵→Thr - поліморфізм гена ангіотензиногена (*AGT*) [15], A¹¹⁶⁶→C - поліморфізм гена рецептора 1-го типу ангіотензину II (*ATRI*) [16], C⁻¹⁵⁶²→T - поліморфізм гена металопротеїнази 9 (*MMP9*) [17], T⁻³⁸¹→C - поліморфізм гена натрійуретичного пептиду типу В (*NPPB*) [18] застосовували ПЛР із наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. C⁻¹³⁰⁶→T - поліморфізм гена металопротеїнази 2 (*MMP2*) визначали із застосуванням алей - специфічної ПЛР [19]. Праймери для ПЛР синтезовані Fermentas (Литва) та Metabion (Німеччина). ПЛР проводили в термоциклері Applied Biosystems 2700 («PerkinElmer», США). Для здійснення рестрикційного аналізу використовували такі рестриктази: Eco24I, Hin6I, PsyI (Tth111I), BsuRI (HaeIII), PaeI (SphI), MspI (HpaII) (Fermentas, Литва). Візуалізацію ампліфікатів генів після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 30-45 хв) проводили за допомогою трансільюмінатора та програмного забезпечення ViTran («Біоком», Росія).

Методом ПЛР у реальному часі досліджували такі поліморфізми: T⁻⁷⁸⁶→C промотору гена ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*), C⁻⁸→G - поліморфізм гена, що кодує α-6 субодиницю протеасоми (*PSMA6*) та A¹²⁶⁶→G - поліморфізм 16-го екзону гена еластину (*Eln*) із застосуванням CustomTaqMan® SNP

Assay, TaqMan® SNP Assay C_11599359_10 та TaqMan® SNP Assay C_1253630_1 відповідно. Ампліфікацію проводили за допомогою термоциклера “7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems, Foster City, США). Після ампліфікації визначали дискримінаційний аналіз алелей зазначених генів.

Для визначення ролі поліморфізму вказаних генів на ЕЗВД хворих розділяли на 2 групи залежної від рівня останнього ≤ 10 та $> 10\%$.

Отримані результати обробляли статистично з використанням програм Origin 7.0 та Excel 2000. При цьому вірогідність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм. Значення $P < 0,05$ вважали вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати ЕЗВД у дітей із різними алельними варіантами генів, поліморфізм яких було вивчено, наведено у табл. 1. Тільки 4 із 11 визначених поліморфізмів суттєво впливають на ЕЗВД, а саме: $G^{894} \rightarrow T$ *eNOS*, $A^{1266} \rightarrow G$ *Eln*, $T^{-381} \rightarrow C$ *NPPB*, *I/D ACE*.

При дослідженні $G^{894} \rightarrow T$ - поліморфізму 7-го екзону гена *eNOS* виявлено наступний розподіл генотипів: G/G – 43,9%, G/T – 46,3%, T/T – 9,8%. У хворих із генотипом G/G рівень ЕЗВД був $15,2 \pm 1,6\%$, G/T – $10,0 \pm 1,7\%$, T/T – $15,0 \pm 0,4\%$. А у носіїв обох алельних варіантів генів він виявився вірогідно нижчим, ніж у дітей з двома Т-алелями. Слід зазначити, що показники ЕЗВД, вміст глікозилизованого гемоглобіну, тривалість захворювання і вихідний діаметр плечової артерії у хворих з генотипами G/G та T/T вірогідно не відрізнялися. Отже, існує зв'язок рівня ЕЗВД із цим поліморфізмом.

При вивченні $A^{1266} \rightarrow G$ - поліморфізму 16-го екзону гена *Eln* розподіл генотипів був таким: A/A – 17,1%, A/G – 40,0%, G/G – 42,9%. У хворих із генотипом рівень ЕЗВД становив $16,0 \pm 3,3\%$, A/G – $14,8 \pm 1,9\%$, G/G – $10,3 \pm 1,6\%$. У носіїв обох G- алелей він був нижчим ($P < 0,05$) ніж у дітей з генотипами A/A та A/G. Показники ЕЗВД у дітей з A/G-

та A/A-генотипами вірогідно не відрізнялися між собою див табл. 1. При цьому не спостерігалось вірогідної різниці в групах з різними генотипами за вмістом глікозилизованого гемоглобіну, тривалістю захворювання та вихідним діаметром плечової артерії.

Ми використали рецесивну модель аналізу результатів, оскільки найнижчі значення ЕЗВД виявлено у носіїв різних алелей гена *eNOS*. При порівнянні ЕЗВД у хворих із G/G- та G/T+T/T- генотипами виявляються вірогідно нижчі показники в останій групі ($10,9 \pm 1,4\%$), порівняно із носіями обох G-алелей ($15,2 \pm 1,6\%$). Результати є порівнюваними за вмістом глікозилизованого гемоглобіну, тривалістю захворювання та вихідним діаметром плечової артерії (табл. 2). Із вищенаведеного випливає, що на рівень ЕЗВД негативно впливає Т-алель в 894 положенні 7 екзону гена *eNOS*.

Хворих розподілили на 2 групи згідно з рівнем ЕЗВД ($\leq 10\%$ та $> 10\%$). В групі пацієнтів із вазодилатацією $\leq 10\%$ переважали носії генотипу G/T (G/G – 27,3%, G/T – 63,6%, T/T – 9,1%), а у дітей із вищими цифрами ЕЗВД – G/G (G/G – 65,0%, G/T – 25,0%, T/T – 10,0%). Різниця вірогідна за критерієм Пірсона ($P < 0,05$).

Таким чином, у дітей із ЦД 1-го типу спостерігається асоціація Т-алеля та генотипу G/T поліморфізму $G^{894} \rightarrow T$ 7-го екзону гена *eNOS* із найнижчою ЕЗВД в групах хворих, які однорідні за рівнем компенсації глікемії, тривалістю захворювання та вихідними даними вазометрії. Функціональне значення вище вказаної трансверсії в екзоні, яка призводить до заміни глутаміну на аспарагін у 298-му положенні білка *eNOS*, остаточно не з'ясоване. Нами встановлено деяке зменшення експресії вмісту мРНК та активності продукції NO в ізольованих тромбоцитах у гетерозиготному стані порівняно G/G-генотипом [20], що повністю узгоджується з даними визначення ЕЗВД.

Порівняння значень ЕЗВД в групах з A/A+A/G- та G/G-генотипами, які становили $15,2 \pm 1,6$ та $10,3 \pm 1,6$ % ($P < 0,05$), вказує на

те що, найвищі показники вазодилатації асоціюються із А-алелем та генотипом А/А-поліморфізму 16-го екзону гена *Eln*. Найнижчий рівень ЕЗВД асоціюється із генотипом G/G (табл. 2).

Коефіцієнт кореляції між кількістю поліморфних алелей та значеннями ЕЗВД $A^{1266} \rightarrow G$ - поліморфізму 16-го екзону гена *Eln* становив $-0,32$ ($P < 0,05$), що підтверджує асоціацію А/А-генотипу із найвищими показ-

Таблиця 1. Рівень ендотелійзалежної вазодилатації, вміст глікозильованого гемоглобіну, тривалість цукрового діабету 1-го типу та вихідний діаметр плечової артерії у дітей із різними алельними варіантами досліджуваних генів (M±m)

Поліморфізм	Алельні варіанти	Ендотелій-залежна вазодилатація %	Глікозильований гемоглобін, %	Тривалість цукрового діабету, роки	Вихідний діаметр артерії, мм
$G^{894} \rightarrow T$ - ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	G/G	15,2±1,6	8,4±0,5	6,8±1,1	2,8±0,1
	G/T	10,0±1,7*	8,3±0,3	5,7±0,7	2,8±0,1
	T/T	15,0±0,4	8,4±0,3	4,9±0,6	2,8±0,1
$A^{1266} \rightarrow G$ - ген еластину (<i>Eln</i>)	A/A	16,0±3,3	8,1±0,6	4,0±0,4	2,8±0,2
	A/G	14,8±1,9	8,5±0,5	5,5±0,6	2,7±0,1
	G/G	10,3±1,6**	7,9±0,4	6,2±0,9	2,8±0,1
$T^{-381} \rightarrow C$ - ген натрійуретичного пептиду типу В (<i>NPPB</i>)	T/T	13,1±2,1	8,1±0,2	5,9±0,8	2,8±0,1
	T/C	16,4±2,9	8,8±0,5	7,9±1,9	2,8±0,1
	C/C	10,7±2,0***	8,8±0,5	6,7±0,9	2,8±0,1
I/D ген ангіотензин-перетворювального ферменту (<i>ACE</i>)	I/I	12,6±1,5	8,6±0,4	7,3±1,3	2,9±0,1
	I/D	11,6±1,3	7,9±0,3	5,8±0,8	2,9±0,1
	D/D	17,2±2,8***	8,5±0,4	5,0±1,3	2,6±0,1*
$T^{-786} \rightarrow C$ ген ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	T/T	13,8±1,7	8,2±0,4	5,6±0,8	2,8±0,1
	T/C	12,6±1,5	8,5±0,4	6,5±0,7	2,9±0,1
	C/C	12,0±4,5	8,2±1,1	7,8±1,9	2,9±0,2
$Met^{235} \rightarrow Thr$ - ген ангіотензиногена (<i>AGT</i>)	Met/ Met	12,8±2,1	8,7±0,5	5,9±0,9	3,0±0,1
	Met/ Thr	12,6±1,5	8,2±0,3	6,7±0,8	2,8±0,1*
	Thr/ Thr	15,8±2,7	8,3±0,4	5,3±1,1	2,6±0,2
$A^{1166} \rightarrow C$ - поліморфізм гена рецептора 1-го типу ангіотензину II (<i>ATRI</i>)	A/A	13,1±1,2	8,6±0,4	6,8±0,8	2,9±0,1
	A/C	11,9±2,2	8,1±0,3	5,5±0,8	2,7±0,1
	C/C	13,8±2,1	8,9±0,9	7,6±2,5	2,9±0,1
$C^{-1306} \rightarrow T$ - ген металопротеїнази 2 (<i>MMP2</i>)	C/C	13,8±1,4	8,3±0,4	6,5±0,8	2,9±0,1
	C/T	12,9±1,7	8,7±0,4	6,5±0,9	2,9±0,1
	T/T	12,1±4,8	7,6±0,9	4,3±0,9	2,6±0,2
$C^{-1562} \rightarrow T$ - ген металопротеїнази 9 (<i>MMP9</i>)	C/C	12,9±1,2	8,5±0,2	6,6±0,6	2,9±0,1
	C/T	9,3±2,3	6,0±0,7*	4,0±0,6	2,4±0,2*
	T/T	13,8±7,1	9,1±1,5	7,0±1,0***	2,7±0,3
$Arg_{60} \rightarrow His$ - ген, що кодує одну з індукційних субодиниць протеасоми (<i>LMP2</i>)	Arg/ Arg	13,2±1,4	8,5±0,3	5,7±0,6	2,9±0,1
	Arg/ His	15,1±2,3	8,0±0,4	6,6±1,5	2,6±0,1****
	His/ His	7,1±0,9	8,5±0,9	6,0±1,0	2,9±0,4
$C^{-8} \rightarrow G$ - ген, що кодує α -6 субодиницю протеасоми (<i>PSMA6</i>)	C/C	13,1±1,2	8,3±0,3	6,3±0,6	2,8±0,1
	C/G	12,4±0,9	9,3±0,9	6,8±2,3	2,8±0,2
	G/G	—	—	—	—

* $P < 0,05$ порівняно з більш розповсюдженим генотипом, ** $P < 0,05$ порівняно з гетерозиготним станом та більш розповсюдженим генотипом, *** $P < 0,05$ порівняно з гетерозиготним станом, **** $P < 0,01$ порівняно з більш розповсюдженим генотипом

Таблиця 2. Рівень ендотелійзалежної вазодилатації, вміст глікозильованого гемоглобіну, тривалість цукрового діабету 1-го типу та вихідний діаметр плечової артерії у дітей із різними алельними варіантами досліджуваних генів (рецесивна та домінантна моделі) (M±m)

Поліморфізм	Алельні варіанти	Ендотелій-залежна вазодилатація %	Глікозильований гемоглобін, %	Тривалість цукрового діабету, роки	Вихідний діаметр артерії, мм
G ⁸⁹⁴ →T - ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	G/G	15,2±1,6	8,4±0,5	6,8±1,1	2,8±0,1
	G/T+ T/T	10,9±1,4*	8,3±0,3	5,6±0,6	2,8±0,1
	G/G+ G/T	12,6±1,4	8,3±0,3	6,2±0,6	2,8±0,1
A ¹²⁶⁶ →G - ген еластину (<i>Eln</i>)	T/T	15,0±0,4	8,4±0,3	4,9±0,6	2,8±0,1
	A/A	16,0±3,3	8,1±0,6	4,0±0,4	2,8±0,2
	A/G+G/G	12,3±1,4	8,2±0,7	5,9±0,6	2,8±0,1
T- ³⁸¹ →C - ген натрійуретичного пептиду типу В (<i>NPPB</i>)	A/A+G/G	15,2±1,6	8,4±0,7	5,1±0,5	2,7±0,1
	G/G	10,3±1,6*	7,9±0,4	6,2±0,9	2,8±0,1
	T/T	13,1±2,1	8,1±0,2	5,9±0,8	2,8±0,1
I/D ген ангіотензин-перетворювального ферменту (<i>ACE</i>)	T/C+C/C	13,2±1,8	8,8±0,4	7,2±0,9	2,7±0,1
	I/I	12,6±1,5	8,6±0,4	7,3±1,3	2,9±0,1
	I/I+I/D	12,1±1,1	8,2±0,3	6,9±0,7	2,9±0,1
T- ⁷⁸⁶ →C ген ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	D/D	17,2±2,8*	8,5±0,4	5,0±1,3	2,6±0,1*
	T/T	13,8±1,7	8,2±0,4	5,6±0,8	2,8±0,1
	T/C+C/C	12,3±1,4	8,4±0,3	6,8±0,7	2,9±0,1
Met ²³⁵ →Thr - ген ангіотензиногена (<i>AGT</i>)	T/T+T/C	13,2±1,3	8,4±0,3	6,1±0,6	2,8±0,1
	C/C	12,0±4,5	8,2±1,1	7,8±1,9	2,9±0,2
	Met/Met	12,8±2,1	8,7±0,5	5,9±0,9	3,0±0,1
A ¹¹⁶⁶ →C - поліморфізм гена рецептора 1-го типу ангіотензину II (<i>ATRI</i>)	Met/Thr+ Thr/Thr	13,1±1,3	8,2±0,3	6,4±0,7	2,8±0,1*
	Met/Met+ Met/Thr	12,7±1,2	8,4±0,3	6,4±0,6	2,9±0,1
	Thr/Thr	15,8±2,7	8,3±0,4	5,3±1,1	2,6±0,2
C- ¹³⁰⁶ →T – ген металопротейнази 2 (<i>MMP2</i>)	A/A	13,1±1,2	8,6±0,4	6,8±0,8	2,9±0,1
	A/C+C/C	12,4±1,7	8,3±0,3	6,1±0,9	2,8±0,1
	A/A+A/C	12,6±1,3	8,3±0,3	6,3±0,6	2,8±0,1
C- ¹⁵⁶² →T - ген металопротейнази 9 (<i>MMP9</i>)	C/C	13,8±2,1	8,9±0,9	7,6±2,5	2,9±0,2
	C/C	13,8±1,4	8,3±0,4	6,5±0,8	2,9±0,1
	C/T+T/T	12,7±1,7	8,4±0,4	5,9±0,8	2,8±0,1
Arg ₆₀ →His - ген, що кодує одну з індукційних субодиниць протеасоми (<i>LMP2</i>)	C/C+C/T	13,5±1,1	8,5±0,3	6,5±0,6	2,9±0,1
	T/T	12,1±4,8	7,6±0,9	4,3±0,9	2,6±0,2
	C/C	12,9±1,2	8,4±0,2	6,6±0,6	2,9±0,1
Arg/His+ His/His	C/T+T/T	11,1±2,3	9,1±1,1	7,0±1,0	2,7±0,2*
	C/C+C/T	12,6±1,2	8,3±0,3	6,4±0,6	2,9±0,1
	T/T	13,8±7,1	9,1±1,5	7,0±1,0	2,7±0,3
Arg/Arg+ Arg/His	Arg/Arg	13,2±1,4	8,5±0,3	5,7±0,6	2,9±0,1
	Arg/His+ His/His	13,8±2,1	8,1±0,4	6,5±1,2	2,6±0,1**
	Arg/Arg+ Arg/His	13,8±1,2	8,4±0,3	5,9±0,6	2,9±0,1
His/His	7,1±0,9	8,5±0,9	6,0±1,0	2,9±0,4	

*P<0,05 порівняно з іншим генотипом, **P<0,01 порівняно з іншим генотипом.

никами ЕЗВД, а генотипу G/G – з найнижчими. Не спостерігалось вірогідної різниці між генотипами дітей у групах із ЕЗВД $\leq 10\%$ та $>10\%$ за критерієм Пірсона.

Трансверсія А на G в 16-му екзоні гена *Eln* призводить до зміни серину на гліцин у 422-му положенні білка еластину, але патологіологічні наслідки такої заміни практично не вивчено. Немає даних й щодо значення цього поліморфізму для розвитку судинних ускладнень при ЦД 1-го типу. Можна припустити, що поліморфізм 16-го екзону впливає на чутливість еластину судинної стінки до еластолізу. Як відомо, пептиди еластину, що утворюються внаслідок цього, взаємодіють із еластинламініновими рецепторами ендотеліальних та гладеньком'язових клітин судинної стінки, стимулюючи синтез простагландинів і продукцію NO із розвитком незалежної вазодилатації [21]. З іншого боку, на фоні активації еластолізу відбувається деградація еластину судинної стінки, підвищується обмін еластину (на це вказує зростання в крові вмісту еластинових пептидів), спостерігається ремоделювання судинної стінки, що асоціюється із збільшенням її ригідності та вищим ризиком ангіопатій у хворих на ЦД 1-го типу [19]. Таким чином, підвищена стійкість еластинових волокон до еластолізу зберігає структурний матрикс судини та одночасно дає меншу продукцію NO і навпаки, менша стійкість молекул еластину до гідролізу повинна асоціюватися із порушенням архітекtonіки судинної стінки та більшим синтезом NO. Співвідношення цих різноспрямованих процесів, вплив поліморфізму 16-го екзону гена *Eln* потребують подальшого вивчення.

При вивченні T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена *NPPB* розподіл хворих за генотипами виявився таким: T/T – 36,4%, T/C – 40,9%, C/C – 22,7%. В групі хворих із генотипом T/T ЕЗВД становила $13,1 \pm 2,1\%$, T/C – $16,4 \pm 2,9\%$, C/C - $10,7 \pm 2,0\%$. Значення ЕЗВД в групі дітей, що мали обидва C-алелі, було нижчим, ніж у носіїв різних алелей

($P < 0,05$). Показники ЕЗВД в групах носіїв обох T- та різних алелей достовірно не відрізнялися між собою (табл. 1). При цьому не спостерігалось вірогідної різниці в групах з різними генотипами за вмістом глікозильованого гемоглобіну, тривалістю захворювання та вихідним діаметром плечової артерії.

Порівнюючи показники ЕЗВД у групах хворих із поєднаними генотипами T/T з T/C+C/C та T/T+T/C з C/C достовірної різниці не спостерігалось. Кореляції між кількістю поліморфних алелей та рівнем ЕЗВД - T⁻³⁸¹→C - поліморфізму гена *NPPB* виявлено не було. Не спостерігалось також достовірної різниці між генотипами дітей у групах із ЕЗВД $\leq 10\%$ та $>10\%$ за критерієм Пірсона.

Таким чином, нами було встановлено, що найнижчі показники ЕЗВД асоціюються із C/C-генотипом поліморфізму T⁻³⁸¹→C промотору гена *NPPB*. Найвищі показники вазодилатації спостерігаються у гетерозиготному стані.

Вплив T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена *NPPB* на ЕЗВД може бути реалізовано через наступні фізіологічні механізми дії натрійуретичного пептиду типу В: збільшення синтезу внутрішньоклітинного циклічного гуанозинмонофосфату в гладеньких м'язах судин, що викликає їх розслаблення та вазодилатацію (NO-подібна дія); зниження активності ренін-ангіотензин-альдостеронової та симпатичної нервової системи, збільшення натрійурезу та діурезу, що знижує системний артеріальний тиск; антипроліферативна дія (попереджає ремоделювання стінки судин) [22, 23]. Згідно з літературними даними у хворих на ЦД 1-го типу T/C- та C/C-генотипи промотору гена *NPPB* асоціюються із більшими концентраціями в плазмі крові натрійуретичного пептиду типу В порівняно із носіями обох T-алелей [24]. Звідси випливає, що найкращі показники вазодилатації очікуються у носіїв цих генотипів. У нашому дослідженні найвищі показники ЕЗВД реєструвалися у носіїв поліморфних варіантів гена, що підтверджують літературні дані. Та-

кої закономірності не виявлено у носіїв обох С-алелей, для яких були характерні найнижчі показники вазодилатації.

При вивченні I/D - поліморфізму гена ACE виявлено такий розподіл генотипів: I/I – 33,3%, I/D – 41,1%, D/D – 25,6%. У хворих із генотипом I/I рівень ЕЗВД становив 12,6±1,5%, I/D – 11,6±1,3%, D/D - 17,2±2,8%. При гомозиготності за D-алелем рівень ЕЗВД був вірогідно вищим ніж при гетерозиготності (P<0,05). Показники ЕЗВД в групах носіїв обох I- та поліморфних алелях вірогідно не відрізнялися між собою. При цьому не спостерігалось достовірної різниці в групах з різними генотипами за вмістом глікозильованого гемоглобіну та тривалості захворювання.

При зіставленні рівня ЕЗВД дітей із I/I+I/D- та D/D-генотипами вірогідно вищими показники вазодилатації були у останніх. Найнижчі значення ЕЗВД асоціювалися із I-алелем даного поліморфізму. В групі дітей із D/D-генотипом реєстрували достовірно менший (P<0,05) вихідний діаметр плечової артерії (2,6±0,1мм), ніж у I/I та I/I+I/D-групах (2,9±0,1мм). Це явище можна пояснити реалізацією пресорного ефекту на судини в хворих з D/D-генотипом, оскільки при гомозиготності за поліморфним алелем спостерігається підвищена активність ангіотензинперетворювального ферменту, що збільшує продукцію ангіотензину II та прискорює деградацію брадикініну із виник-

ненням вазоспастичних реакцій [25].

Також нами було проведено кореляційний аналіз асоціації поєднання генотипів *eNOS* (G⁸⁹⁴→T), *Eln* (A¹²⁶⁶→G), *NPPB* (T⁻³⁸¹→C), *ACE* (I/D), при яких зустрічалися найнижчі показники вазодилатації, із рівнем ЕЗВД. Отримано достовірний кореляційний зв'язок (P<0,01), який найбільш сильним був при поєднанні G/T-генотипу *eNOS* (G⁸⁹⁴→T), G/G-генотипу *Eln* (A¹²⁶⁶→G), C/C - генотипу *NPPB* (T⁻³⁸¹→C) та I/D - генотипу *ACE* (I/D) і становив 0,61 (табл. 3).

При індивідуальному аналізі вищевказаних поліморфізмів та показників ЕЗВД у дітей із нетривалим перебігом захворювання (до 4 років) та низькими показниками ЕЗВД (<12%) виявляється поєднання наведених генотипів. У дітей із перебігом захворювання більше 15 років і високими показниками ЕЗВД (<18%) ці генотипи зустрічаються рідше, виявляються генотипи, асоційовані із кращими показниками вазодилатації (табл. 4).

Отже, генотипування хворих із визначенням G⁸⁹⁴→T - поліморфізму 7 екзону гена *eNOS*, A¹²⁶⁶→G - поліморфізму 16 екзону гена *Eln*, T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена *NPPB*, I/D - генотипу *ACE* може дати змогу виділити групу ризику судинних ускладнень у дітей під час встановлення діагнозу, проводити профілактику розвитку ендотеліальної дисфункції та більш інтенсивну терапію мікро- та макроангіопатій.

Таблиця 3. Кореляційний аналіз впливу різних поєднань алельних варіантів G⁸⁹⁴→T-поліморфізму екзону 7-го гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), A¹²⁶⁶→G гена еластину (Eln), T⁻³⁸¹→C гена натрійуретичного пептиду типу В (NPPB), I/D 16-го інтрону гена ангіотензинперетворювального ферменту (ACE) на зниження ендотеліальної вазодилатації

		Різновиди поєднання алельних варіантів поліморфізмів										
Поліморфізм	G ⁸⁹⁴ →T eNOS	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T
	A ¹²⁶⁶ →G Eln	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	T ⁻³⁸¹ →C NPPB	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
	I/D ACE	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D
Коефіцієнт кореляції		0,61	0,51	0,50	0,49	0,45	0,42	0,39	0,38	0,37	0,36	0,30

Таблиця 4. Індивідуальний аналіз поліморфізмів G⁸⁹⁴→T екзону 7-го гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), A¹²⁶⁶→G гена еластину (Eln), T⁻³⁸¹→C гена натрійуретичного пептиду типу В (NPPB), I/D 16-го інтрону гена ангіотензин-перетворювального ферменту (ACE), показників ендотеліязалежної вазодилатації, тривалості захворювання, вміст глікозильованого гемоглобіну та вихідного діаметра плечової артерії.

Індивідуальний шифр зразка ДНК	CD63	CD35	CD52	CD16	CD32	CD51	CD54	CD53
Ендотеліязалежна вазодилатація %	0	3,7	4,8	8,1	8,3	11,5	21,4	18,5
Полі-морфізм	G ⁸⁹⁴ →T eNOS	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/G	G/G
	A ¹²⁶⁶ →G Eln	G/G	G/G	A/G	G/G	G/G	G/G	
	T ⁻³⁸¹ →C NPPB	C/C	T/T	T/T	T/C	T/T	C/C	T/C
	I/D ACE	I/I	I/I	I/D	I/D	I/I	D/D	I/D
Тривалість цукрового діабету, роки	4	3	3	4	4	4,5	15	16
Глікозильований гемоглобін, %	6,5	8,0	5,9	7,8	7,2	8,3	10,7	7,6
Вихідний діаметр артерії, мм	3,2	2,7	2,1	3,7	3,6	3,2	2,8	2,7

Генотипи, які асоціюються із низькими показниками ендотеліязалежної вазодилатації, генотипи, які асоціюються із високими показниками ендотеліязалежної вазодилатації

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що поліморфізми генів G⁸⁹⁴→T eNOS, A¹²⁶⁶→G Eln, T⁻³⁸¹→C NPPB та I/D ACE суттєво впливають на рівень ЕЗВД у дітей, хворих на ЦД 1-го типу.

2. Не виявлено асоціації поліморфізмів Arg₆₀→His гена LMP2, Met²³⁵→Thr гена AGT, A¹¹⁶⁶→C гена ATR1, C⁻¹⁵⁶²→T гена MMP9, C⁻¹³⁰⁶→T гена MMP2, T⁻⁷⁸⁶→C гена eNOS, C⁻⁸→G гена PSMA6 із показниками ЕЗВД в досліджуваній групі хворих.

3. У дітей із нижчими показниками глікозильованого гемоглобіну та тривалістю ЦД 1-го до 10 років із порушеннями ЕЗВД асоціюються G/T-генотип G⁸⁹⁴→T - поліморфізму 7 екзону гена eNOS, G/G-генотип A¹²⁶⁶→G - поліморфізм 16-го екзону гена Eln, C/C-генотип T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена NPPB, I/D - генотип інсерційно-делеційного поліморфізму гена ACE. Поєднання згаданих генотипів більшою мірою впливає на зниження ЕЗВД, ніж кожен з них окремо.

4. У дітей із тривалістю ЦД до 4 років із показником ЕЗВД менше 12% спостерігається поєднання G/T-генотипу (G⁸⁹⁴→T) eNOS, G/G-генотипу (A¹²⁶⁶→G) Eln, C/C-генотипу (T⁻³⁸¹→C) NPPB, I/D-генотипу (I/D) ACE в той

час як у дітей із тривалим перебігом захворювання (більше 15 років) і високим показником ЕЗВД (>18%) ці генотипи виявляються рідше, спостерігаються алельні варіанти генів, асоційовані із кращими показниками вазодилатації.

Н.Б. Праник, С.В. Гончаров, В.Л. Гурьянова, В.Г. Майданник, Н.В. Хайтович, А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ 11 ПОЛИМОРФИЗМОВ ОДИНОЧНЫХ НУКЛЕОТИДОВ С УРОВНЕМ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЙ ВАЗОДИЛАТАЦИИ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

Представлены результаты поиска ассоциации 11 полиморфизмов одиночных нуклеотидов 10 генов с уровнем эндотелийзависимой вазодилатации (ЭЗВД) у 45 детей с сахарным диабетом 1-го типа. Изучены следующие полиморфизмы: G⁸⁹⁴→T экзона 7 и T⁻⁷⁸⁶→C промотора eNOS, A¹²⁶⁶→G экзона 16 Eln, T⁻³⁸¹→C промотора NPPB, I/D ACE, Arg₆₀→His LMP2, Met²³⁵→Thr AGT, A¹¹⁶⁶→C ATR1, C⁻¹⁵⁶²→T MMP9, C⁻¹³⁰⁶→T MMP2, C⁻⁸→G PSMA6. Установлено, что у детей с генотипами G/T eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C NPPB (T⁻³⁸¹→C), I/D ACE уровень ЭЗВД ниже (P<0,05), чем в группах пациентов с другими аллельными вариантами данных генов, который не зависит от длительности заболевания, уровня гликозилированного гемоглобина и исходного диаметра плечевой артерии.

Сочетание вышеуказанных генотипов в большей мере влияет на снижение ЭЗВД ($r=0,61$; $P<0,01$), чем каждый генотип в отдельности. При анализе влияния сочетания указанных полиморфизмов на эндотелиальную функцию установлено, что генетические факторы являются более значимыми в уменьшении ЭЗВД, чем длительность заболевания и уровень гликозилированного гемоглобина.

Ключевые слова: полиморфизм одиночных нуклеотидов; эндотелийзависимая вазодилатация; сахарный диабет 1-го типа.

N.B. Pranik¹, S.V. Goncharov², V.L. Gurianova², V.G. Maidannik¹, M.V. Khaitovych¹, A.A. Moibenko², V.E. Dosenko²

ASSOCIATION ANALYSIS OF 11 POLYMORPHISMS OF SNPs WITH ENDOTHELIUM DEPENDENT VASODILATATION IN CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1

We have studied the association with the level of the endothelium dependent vasodilatation (EDVD) among 11 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 10 genes in 45 children suffering from diabetes mellitus type 1. Following polymorphisms have been studied: G⁸⁹⁴→T of the eNOS exon 7 and T⁻⁷⁸⁶→C of the eNOS promotor, A¹²⁶⁶→G of the Eln exon 16, T⁻³⁸¹→C of the NPPB promotor, I/D of the ACE, Arg₆₀→His of the LMP2, Met²³⁵→Thr of the AGT, A¹¹⁶⁶→C of the ATR1, C⁻¹⁵⁶²→T of the MMP9, C⁻¹³⁰⁶→T of the MMP2, and C⁻⁸→G of the PSMA6. It was shown that children with genotypes G/T by eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G by Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C by NPPB (T⁻³⁸¹→C) and I/D by ACE genes have lower EDVD ($P<0,05$) than patients with others allelic variants of these genes, and this does not depend on duration of the disease, level of glycosylated hemoglobin and initial diameter of a humeral (brachial) artery. The combination of the above-stated genotypes influences most significantly on EDVD decrease ($r=0,61$; $P<0,01$), comparing to each genotype separately.

Key words: single nucleotide polymorphism; endothelium dependent vasodilatation; diabetes mellitus type 1

¹*Bogomolets National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv*

²*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Efimov A, Zueva N, Skrobonskaya N. Diabetic angiopathy: etiology and pathogenesis. *Liky Ukrayiny*. 2004; 10: 36-8. [Russian].
2. Zargar AH, Wani AI, Masoodi SR, Bashir MI. Mortality in diabetes mellitus - data from a developing region of the world. *Diabetes Res Clinical Pract*. 1999; 43: 67-74.
3. Esper R, Nordaby R, Vilarino J, Paragano A, Cacharron J, Machado R. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006; 5: 1470-5.
4. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci*. 2005; 109: 143-159.
5. Schiavoni M, Cosentino F, Camici G, Luescher T. Diabetes and Endothelial Dysfunction: What's the Culprit? *High Blood Pressure & Cardiovasc. Prevention*. 2007; 14 (1): 5-10.
6. Balabolkin MI, Klebanov EM, Kreminskaya VM. Treatment of diabetes and its complications. Guidelines for doctors. Moscow: Medicine: 2003. [Russian]
7. Ewens K, George R, Sharma K, Ziyadeh F, Spielman R. Assessment of 115 Candidate Genes for Diabetic Nephropathy by Transmission/Disequilibrium Test. *Diabetes*. 2005; 54: 3305-18.
8. Marre M, Hadjadj S, Bouhanick B. Hereditary factors in the development of diabetic renal disease. *Diabetes Metab*. 2000; 26 (4): 30-5.
9. Dedov II, Shestakova MV. Diabetes. Guidelines for doctors. Moscow: The Universe Publishing: 2003.
10. Maidannik VG, Pranik NB. Genetic markers of late complications of 1 type of diabetes mellitus. *Pediatrics, Akusherstvo ta Ginekologiya*. 2009; 434 (4): 16-27. [Ukrainian].
11. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE., Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340(8828): 1111-5.
12. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero J, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzales I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide*. 2001; 5 (4): 343-8.
13. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998; 32 (3): 521-6.
14. Vinasco J, Fraile A, Nieto A, Beraun Y, Pareja E, Mataran L, Martin J. Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1998; 57: 33-7.
15. Tiago AD, Samani NJ, Candy GP, Brooksbank R, Libhaber EN, Sareli P, Woodiwiss AJ, Norton GR. Angiotensinogen gene promoter region variant modifies body size-ambulatory blood pressure relations in hypertension. *Circulation*. 2002; 17: 1483-7.
16. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop A, Zaluska W, Spasiewicz D, Ksiazek A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 979-83.
17. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C⁻¹⁵⁶²T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003; 38: 1363-7.

18. Meirhaeghe A, Sandhu MS, McCarthy MI, de Groote P, Cotel D, Arveiler D, Ferrières J, Groves CJ, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Wareham NJ, Amouyel P. Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations. *Hum Mol Genet.* 2007 Jun 1;16(11):1343-50.
19. O-charoenrat P, Khantapura P. The role of genetic polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. *J Oral Oncol.* 2006; 42: 257-67.
20. Dosenko VE, Zagoriy VYu, Moibenko AA, Parchomenko AN. Pathophysiological aspects of endothelial NO-synthase genetic polymorphysm. *Fiziol Zh.* 2002; 48 (6): 86-102. [Ukrainian].
21. Faury G, Ristori M, Verdetti J, Jacob M, Robert L. Effect of Elastin Peptides on Vascular Tone. *J Vasc Res.* 1995; 32 (2): 112-9.
22. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP. *Eur J Heart Fail.* 2004; 15(6): 257-60.
23. Sear J, Howard-Alpe G. Preoperative plasma BNP concentrations: do they improve our care of high-risk non-cardiac surgical patients? *Br J Anaesth* 2007; 99 (2): 151-4.
24. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Parving H. Polymorphisms in the B-type natriuretic peptide (BNP) gene are associated with NT-proBNP levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22(11): 3235-9.
25. Danser AH, Schalekamp MA, BaxWA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation.* 1995; 92: 1387-88.

*Матеріал надійшов
до редакції 31.03.2015*