

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 616.379-008.64-06:616.11-092

Т. В. Сергеева, Д. А. Чистяков, Ж. Д. Кобалова, В. С. Моисеев

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ С МАКРОСОСУДИСТЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2

Кафедра внутренних болезней (зав. — член-корр. РАН В. С. Моисеев) Российского университета дружбы народов, Государственный научный центр РФ "ГосНИИгенетика" (дир. — член-корр. РАН В. Г. Дебабов), Москва

С использованием метода полимеразной цепной реакции изучен полиморфизм типа вставка/отсутствие вставки (insertion/deletion, I/D) гена ангиотензин I-превращающего фермента (АПФ), T174M (замена треонина на метионин в 174-м положении аминокислотной последовательности) гена ангиотензиногена (AGT), A1166C гена сосудистого (типа I) рецептора ангиотензина II (AT1R) и ecNOS4a/4b гена эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) в группах больных сахарным диабетом (СД) типа 2 и артериальной гипертензией, неосложненных (контроль, n = 52) и осложненных сердечно-сосудистой патологией: инфарктом миокарда — ИМ (n = 53) и острым нарушением мозгового кровообращения — ОНМК (n = 50). Показано защитное действие генотипа I/I к развитию ИМ у больных СД типа 2. Отсутствие достоверных различий между распределением аллелей и генотипов гена AGT в трех группах больных свидетельствует о том, что данный ген вряд ли вовлечен в формирование сердечно-сосудистых осложнений при СД типа 2. Выявлена сильная ассоциация между полиморфизмом A1166C гена AT1R и развитием ИМ у больных СД типа 2 и гипертонической болезнью в московской популяции. При этом аллель A и генотип AA ослабляют риск раннего развития ИМ, тогда как аллель C и генотип CC, напротив, усиливают. Обнаружена связь между полиморфизмом минисателлита ecNOS4a/4b гена NOS3 и сердечно-сосудистыми поражениями у пациентов с СД типа 2 и гипертонической болезнью. Аллель 4a и генотипы 4a/4b и 4a/4a являются выраженными маркерами риска, а носительство аллеля 4b и генотипа 4b/4b, наоборот, сцеплено со сниженным риском данного осложнения.

The insertion/deletion (I/D) polymorphism of angiotensin 1-converting enzyme (ACE) gene, T174M (threonine substitution for methionine in position 174 of amino acid sequence) polymorphism of angiotensinogen (AGT) gene, A1166C polymorphism of angiotensin II vascular (type I) receptor (AT1R) gene, and ecNOS4a/4b polymorphism of endothelial NO synthase (NOS3) gene were studied by the polymerase chain reaction (PCR) in patients with type 2 diabetes mellitus and arterial hypertension uncomplicated (control, n = 52) and complicated with cardiovascular diseases (myocardial infarction, n = 53, and acute cerebrovascular disorders, n = 50). Protective effect of I/I genotype on development of myocardial infarction in diabetics was shown. The absence of significant differences in the distribution of alleles and genotypes of AGT gene in three groups of patients indicates that this gene is hardly involved in the formation of cardiovascular complications in type 2 diabetes. A strong association between A1166C polymorphism of AT1R gene and development of myocardial infarction in patients with type 2 diabetes and essential hypertension of the Moscow population was revealed; allele A and genotype AA attenuate the risk of early myocardial infarction, while allele C and genotype CC enhance it. A relationship between minisatellite ecNOS4a/4b polymorphism of NOS3 gene and cardiovascular diseases was detected in patients with type 2 diabetes and essential hypertension. Allele 4a and genotypes 4a/4b and 4a/4a are pronounced risk markers, and allele 4b and genotype 4b/4b carriership is associated with a low risk of this complication.

Макроангиопатии являются наиболее частым типом сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом (СД) типа 2. Фактически в России 88% больных СД типа 2 имеют сопутствующую гипертонию, у 50% встречается ишемическая болезнь сердца, у 18% — инфаркт миокарда (ИМ), у 10% — инсульт [1, 3]. Диабетические макроангиопатии относятся к сложным патологиям, в развитие которых может быть вовлечен ряд генов. К последним по праву относят гены ренин-ангиотензиновой системы (РАС), одной из основных функций которой является регуляция АД. К основным компонентам РАС относятся ангиотензиноген (AGT), ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) и сосудистый (тип I) рецептор ангиотензина II (AT1R). Внутри их генов найдены многочисленные полиморфные маркеры, многие из которых использованы в генетическом анализе наследственных заболеваний.

В 16-м интроне гена АПФ (хромосома 17q23) локализован полиморфный участок типа вставка/делеция (insertion/deletion, I/D), определяемый по наличию или отсутствию блока из 287 пар нуклео-

тидов (п. н.) [35]. Для данного полиморфного участка показана ассоциация с гипертонией, ИМ и гипертрофией левого желудочка, выражающаяся в существенном повышении встречаемости генотипа DD и снижении доли генотипа II у больных по сравнению с контролем в ряде популяций, включая и русскую [2, 4, 24, 31, 34].

Ген AGT расположен на хромосоме 1q42—q43 [23]. Для него описано 15 различных полиморфных состояний, из них наиболее активно исследованы 2, которые расположены во 2-м экзоне. Это нуклеотидные замены, в свою очередь приводящие к замене треонина на метионин в 235-м (M235T) и 174-м (T174M) положениях аминокислотной последовательности [14, 22]. Семейный анализ и популяционные исследования показали сцепленность молекулярных вариантов AGT, несущих треонин-235 и метионин-174, с артериальной гипертонией у представителей разных рас [14, 15, 18, 25, 30]. В московской популяции выявлена связь между полиморфизмом T174M гена AGT и развитием гипертонической болезни (ГБ), ИМ и гипертрофической кардиомиопатии. При этом аллель M и гено-

тип ММ усиливали риск развития сердечно-сосудистой патологии, тогда как аллель Т и генотип ТТ, наоборот, оказывали защитное действие [5, 6, 8].

В 3'-нетранслируемой области гена АТ1R, находящегося на хромосоме 3q21—q25, расположен полиморфный маркер А1166С, основанный на вариабельности оснований А (аденина) и С (цитидина) в 1166-м положении нуклеотидной последовательности гена [21]. У гипертоников показано существенное увеличение содержания аллеля, несущего в положении 1166 цитидин, что указывает на связь гена рецептора с гипертонией [19, 21]. Получены данные о наличии выраженной ассоциации между полиморфизмом гена сосудистого рецептора и ГБ в московской популяции, причем аллель А и генотип АА ослабляют риск раннего развития гипертонии, а аллель С и остальные варианты генотипов, напротив, способствуют этому [7]. Вариабельный участок А1166С может синергически взаимодействовать с полиморфизмом типа I/D гена АПФ, усиливая риск возникновения ИМ у носителей генотипа DD [38].

Оксид азота (NO), ранее описанная как эндотелиальный фактор релаксации [33], играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов (вазодилатация) и тромбогенеза [28]. Снижение содержания NO в кровяном русле ведет к нарушению нормальной деятельности сосудов и вазомоторики, к усилению процессов тромбообразования и атерогенеза [16, 17]. NO вырабатывается из L-аргинина при участии фермента NO-синтазы [34]. Известны 3 формы данного фермента, кодируемые разными генами [27]. Эндотелиальная NO-синтаза является продуктом гена NOS3, расположенного на хромосоме 7q36 [29]. Среди генов, кодирующих NO-синтазу, наиболее вероятным кандидатом на участие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний является именно ген NOS3.

В интроне 4 данного гена расположен минисателлит есNOS4a/4b, насчитывающий 2 аллеля, которые состоят из 4 (аллель 4a) или 5 (аллель 4b) тандемных повторов размером 27 п. н. [41]. В популяции аллель с пятью повторами встречается значительно чаще, чем с четырьмя. У лиц, гомозиготных по редкому аллелю, повышен уровень нитратов и нитритов в крови, напрямую связанный со скоростью выработки NO эндотелием сосудов, что свидетельствует о потенциальной генетической роли генотипа 4a/4a как фактора риска развития атеросклероза и заболеваний, приводящих к нарушению нормальной выработки NO [39, 42].

В настоящей работе мы изучали полиморфизм вышеупомянутых генов с тем, чтобы определить, связаны ли они с развитием сердечно-сосудистых осложнений при СД типа 2 в московской популяции.

Материалы и методы

Из терапевтического, кардиологического и неврологического отделений, а также из блоков интенсивной кардиологии и неврологии московской городской больницы № 64 отобраны больные с СД типа 2 и артериальной гипертензией (метаболический вариант эссенциальной гипертензии), у которых развились сердечно-сосудистые осложнения:

Таблица 1

Общая характеристика контрольной группы (больные СД типа 2 и ГБ без сердечно-сосудистых осложнений) и двух групп больных СД типа 2 и ГБ, перенесших ИМ или ОНМК

Показатель (средний \pm SD*)	Контроль (n = 52)	ИМ (n = 53)	ОНМК (n = 50)
Пол (М/Ж)	30/22	12/41	13/37
Возраст, годы	64,4 \pm 8,2	67,2 \pm 8,2	66,3 \pm 7,6
Длительность ГБ, годы	15,3 \pm 8,3	16,2 \pm 10,7	14,1 \pm 7,5
Длительность СД, годы	12,7 \pm 6,6	12,6 \pm 7,5	11,3 \pm 7,3
Систолическое АД, мм рт. ст.	172,1 \pm 11,7	158,3 \pm 8,4	161,2 \pm 9,6
Диастолическое АД, мм рт. ст.	95,4 \pm 8,3	92,1 \pm 7,6	91 \pm 8,4
Индекс массы тела, кг/м ²	27,9 \pm 2,8	27,7 \pm 4,2	28 \pm 4,3

* SD — стандартное отклонение.

ИМ (n = 53) или острое нарушение мозгового кровообращения — ОНМК (n = 50) (табл. 1). Исследование типа случай—контроль было проведено с использованием сопоставимой по численности, возрасту, полу, длительности течения СД типа 2 и артериальной гипертензии контрольной группы больных, не имеющих сердечно-сосудистых осложнений (n = 52).

Геномную ДНК из венозной крови обследуемых выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. В работе использовали термостабильную ДНК-полимеразу Taq и рестриктазу NcoI, полученные от НПО "Биотех" (Москва), рестриктазу BstDEI — от НПО "Сибэнзим" (Новосибирск). Олигонуклеотидные праймеры получены от НПО "Сиптол" (Москва).

Ген АПФ. Амплификацию полиморфного участка гена АПФ проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе РНС-2 ("Techne", Великобритания) или PolyChainII ("Polygen", Германия) в 50 мкл среды, содержащей 67 мМ трис-НСl рН 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 2,0 мМ хлорид магния, 0,01% твин-20, 0,2 мМ каждого dNTP, по 66 нг праймеров АПФ-1 (5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTTCT-3') и АПФ-2 (5'-GATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT-3'), 50—100 нг геномной ДНК, 2,5 ед. ДНК-полимеразы Таq. 35 циклов ПЦР проводили по следующей программе: 94°C/1 мин, 55°C/1 мин, 72°C/1 мин, в том числе первая денатурация — 94°C/3 мин, последний синтез цепи — 72°C/7 мин. Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 2% агарозном геле. Гель окрашивали бромидом этидия.

Ген АГТ. Полиморфный участок гена АГТ амплифицировали в 50 мкл среды, содержащей 10 мМ трис-НСl рН 8,8, 50 мМ КCl, 1,5 мМ хлорид магния, 10% диметилсульфоксид, 0,2 мМ каждого dNTP, по 50 нг праймеров АГТ1 (5'-GATGCGACAAGGTCCTG-3') и АГТ2 (5'-CAGGGTGCTGTCCACTGGCTCGC-3'), 50—100 нг геномной ДНК, 2,5 ед. ДНК-полимеразы Таq. ПЦР проводили по следующей программе: первый цикл — 94°C/3 мин, 30 циклов — 94°C/1 мин, 60°C/1 мин, 70°C/2 мин, последний

цикл — 70°C/6 мин. К 15 мкл амплификационной смеси добавляли 2 мкл 10-кратного буфера Y (НПО "Ферментас", Вильнюс), содержащего 33 мМ трис-ацетат рН 7,9, 10 мМ ацетат калия и 66 мМ ацетат натрия, 2 мкл БСА (1 мг/мл) и 0,5 мкл рестриктазы NcoI (10 ед/мкл). Пробы выдерживали 3 ч при 37°C. Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 2% агарозном геле. Гель окрашивали бромидом этидия.

Ген AT1R. Полиморфный участок гена AT1R амплифицировали в среде того же состава, что и для гена АПФ, в присутствии праймеров AT1R-L (5'-ССТGCACCATGTTTTGAGGTTGAGTGAC-3') и AT1R-R (5'-AAAATAACAGGACA-AAAGCAG-GCTAGGGAG-3'). ПЦР проводили по следующей программе: первый цикл — 94°C/3 мин, 35 циклов — 94°C/1 мин, 65°C/1 мин, 72°C/2 мин, последний цикл — 72°C/6 мин. К 15 мкл амплификационной смеси добавляли 2 мкл 10-кратного буфера G (НПО "Сибэнзим", Новосибирск), содержащего 10 мМ трис-HCl рН 7,5, 10 мМ хлорид магния, 2 мкл БСА (1 мг/мл) и 1 мкл рестриктазы BstDEI (2 ед/мкл). Пробы выдерживали в течение ночи при 60°C. Продукты расщепления разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, который затем окрашивали бромидом этидия.

Ген NO-синтазы. Полиморфный участок есNOS4a/4b гена NOS3 амплифицировали в той же среде, что и ген АПФ, но в присутствии 1,5 мМ хлорида магния и праймеров NOS3-VNTR1 (5'-AGGCCSTATGGTAGTGCCTTT-3') и NOS3-VNTR2 (5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT-3'), 2,5 ед. ДНК-полимеразы Tag и 50–100 нг геномной ДНК. ПЦР проводили на амплификаторе РНС-2 ("Techne", Великобритания) по следующей программе: первый цикл — 94°C/3 мин, 35 циклов — 94°C/1 мин, 60°C/1 мин, 72°C/1 мин, последний цикл — 72°C/6 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле и окрашивали бромидом этидия.

Наблюдаемые частоты встречаемости генотипов исследованных локусов проверяли на отклонение от равновесия Харди—Вейнберга по критериям χ^2 и G-статистики с помощью программы R × C (Rows × Columns) на основе алгоритма, описанного ранее [36]. Сравнение распределения частот аллелей и генотипов в группах обследованных проводили с использованием точного критерия Фишера. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$. Относительный риск (RR — Relative Risk) вычисляли по формуле [37]:

$$RR = (a + 0,5) \cdot (d + 0,5) / (b + 0,5) \cdot (c + 0,5),$$

где a — число больных с наличием, b — с отсутствием данного аллеля; c и d — число здоровых, с наличием и отсутствием данного аллеля соответственно; параметр 0,5 в этой формуле используется как поправка на малочисленность выборки. При $RR = 1$ нет ассоциации, $RR > 1$ рассматривали как положительную ассоциацию заболевания с аллелем или генотипом ("фактор риска") и $RR < 1$ — как отрицательную ассоциацию ("фактор устойчивости").

Результаты и их обсуждение

В результате амплификации полиморфного участка гена АПФ происходило образование двух фрагментов длиной 190 п. н. (аллель D с делецией) и 480 п. н. (аллель I, содержащий вставку). Таким образом, наличие одного фрагмента длиной 190 п. н. соответствовало генотипу DD, двух фрагментов (190 и 480 п. н.) — генотипу ID и одного фрагмента размером 480 п. н. — генотипу II.

Наблюдаемое распределение частот встречаемости генотипов гена АПФ, как, впрочем, и других генов, во всех группах обследованных соответствовало равновесию Харди—Вейнберга ($\chi^2 = 0,2229$ —1,9129 при $p = 0,4000$ —0,9120, G-статистика = 0,2230—1,9348 при $p = 0,3860$ —0,9120).

По сравнению с группой контроля в группе с ИМ частота аллеля I несколько снижена (35,8% против 50%), а частота аллеля D, наоборот, повышена (64,2% против 50%), хотя обнаруженная разница статистически недостоверна (табл. 2). Выявленная достоверная разница между частотами генотипа II в этих двух группах. В группе с ИМ отмечается значительное снижение частоты встречаемости этого генотипа по сравнению с контролем (3,8% против 19,2%; $p = 0,0129$), что можно расценивать как защитное действие аллеля I и генотипа I/I к развитию ИМ у больных СД типа 2 и гипертонией (RR 0,56 и RR 0,2 соответственно). Полученные нами данные о защитной роли аллеля I и генотипа I/I к развитию ИМ соответствуют результатам ранее проведенных аналогичных исследований [2, 38].

При сравнении распределения аллелей гена АПФ в группе с ОНМК и контрольной группой также отмечаются снижение частоты встречаемости аллеля I в группе перенесших ОНМК (38,6% против 50%) и небольшой рост частоты встречаемости аллеля D (61,4% против 50%). Обращает на себя внимание близкая к достоверной разница в распределении генотипа DD с повышением его содержания в группе перенесших ОНМК (37,1% против 19,2%; $p = 0,054$). Наличие данного генотипа может являться фактором риска развития ОНМК у больных СД типа 2 и артериальной гипертензией (RR 2,43). Также отмечается несущественное снижение частоты встречаемости генотипов I/I и I/D в данной группе по сравнению с контролем (14,3% против 19,2% и 48,6% против 61,5% соответственно).

Таблица 2

Сравнительный анализ распределения частот (в %) аллелей и генотипов гена АПФ в контрольной группе (больные СД типа 2 и ГБ без сердечно-сосудистых осложнений) и двух группах больных СД типа 2 и ГБ, перенесших ИМ или ОНМК

Генетический маркер	Конт- роль (n = 52)	ИМ (n = 53)			ОНМК (n = 50)		
		час- тот	p (Фишер)	RR	час- тот	p (Фишер)	RR
Генотип I/I	19,2	3,8	0,01297	0,20	14,3	0,38356	0,73
Генотип I/D	61,5	64,2	0,47012	1,12	48,6	0,16478	1,68
Генотип D/D	19,2	32,1	0,09965	1,94	37,1	0,05443	2,43
Аллель I	50,0	35,8	0,97914	0,56	38,6	0,11473	0,63
Аллель D	50,0	64,2	0,97914	1,78	61,4	0,11473	1,58

Таблица 3

Сравнительный анализ распределения частот (в %) аллелей и генотипов гена AGT в контрольной группе (больные СД типа 2 и ГБ без сердечно-сосудистых осложнений) и двух группах больных СД типа 2 и ГБ, перенесших ИМ или ОНМК

Генетический маркер	Контроль (n = 52)	ИМ (n = 53)			ОНМК (n = 50)		
		частота	p (Фишер)	RR	частота	p (Фишер)	RR
Генотип Т/Т	66,2	60,4	0,80581	0,78	60,0	0,80172	0,76
Генотип Т/М	25,7	32,1	0,83867	1,36	28,6	0,71222	1,17
Генотип М/М	8,1	7,5	0,59175	0,96	11,4	0,82173	1,51
Аллель Т	79,1	76,4	0,74395	0,86	74,3	0,83179	0,76
Аллель М	20,9	23,6	0,74395	1,17	25,7	0,83179	1,31

В результате амплификации полиморфного участка гена AGT получается фрагмент длиной 303 п. н. Аллель M174 расщепляется рестриктазой NcoI, образуя продукты размером 197 и 106 п. н.; аллель T174 остается нерасщепленным. Таким образом, наличие одного фрагмента длиной 303 п. н. после обработки NcoI соответствует генотипу T174T, двух фрагментов (197 и 106 п. н.) — генотипу M175M и трех фрагментов (106, 197 и 303 п. н.) — гетерозиготе T174M.

Во всех исследованных нами группах больных генотип TT существенно преобладает, тогда как гомозиготы MM встречаются довольно редко (табл. 3). Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов гена AGT в трех группах больных не выявил каких-либо статистически достоверных различий. По-видимому, полиморфизм T174M не влияет на возникновение сердечно-сосудистых осложнений у больных СД типа 2.

В результате амплификации полиморфного участка гена AT1R получается фрагмент длиной 352 п. н. Аллель C1166 расщепляется рестриктазой BstDEI, образуя продукты размером 114 и 238 п. н.; аллель A1166 остается нерасщепленным. Наличие фрагмента длиной 352 п. н. после обработки BstDEI соответствует генотипу AA, двух фрагментов (114 и 238 п. н.) — генотипу CC и трех (114, 238 и 352 п. н.) — гетерозиготе AC.

У больных с ИМ показаны достоверные ($p < 0,01$) изменения частот встречаемости аллелей по сравнению с контрольной группой: доля аллеля А снижена (58,5% против 78,8%), а содержание аллеля С, наоборот, увеличено (41,5% против 21,2%) (табл. 4). У этих больных также достоверно умень-

Таблица 4

Сравнительный анализ распределения частот (в %) аллелей и генотипов гена AT1R в контрольной группе (больные СД типа 2 и ГБ без сердечно-сосудистых осложнений) и двух группах больных СД типа 2 и ГБ, перенесших ИМ или ОНМК

Генетический маркер	Контроль (n = 52)	ИМ (n = 53)			ОНМК (n = 50)		
		частота	p (Фишер)	RR	частота	p (Фишер)	RR
Генотип AA	65,4	34,0	0,01365	0,37	50,0	0,08481	0,54
Генотип AC	26,9	49,1	0,01609	2,56	40,0	0,11697	1,78
Генотип CC	7,7	17	0,12509	2,3	10,0	0,47492	1,33
Аллель А	78,8	58,5	0,00116	0,38	70,0	0,09864	0,63
Аллель С	21,2	41,5	0,00116	2,61	30,0	0,09864	1,59

шается встречаемость гомозигот AA (34% против 65,4%; $p < 0,02$), тогда как доля других генотипов возрастает, причем изменение частоты встречаемости гетерозигот AC носит достоверный характер (49,1% против 26,9%; $p < 0,02$). Полученные данные свидетельствуют о наличии сильной ассоциации между полиморфизмом гена сосудистого рецептора и развитием ИМ у больных с метаболическим вариантом ГБ в московской популяции. Аллель А и генотип AA ослабляют риск ИМ (RR 0,38 и 0,37 соответственно), тогда как аллель С (RR 2,61) и остальные варианты генотипов, напротив, способствуют этому. Следует отметить, что предохраняющая роль аллеля А и гомозигот по нему выражена сильнее, чем предрасполагающее действие аллеля С и содержащих его генотипов. В то же время не выявлено достоверных различий в частотах встречаемости аллелей гена рецептора у больных, перенесших инсульт, по сравнению с группой контроля.

Наши данные соответствуют результатам зарубежных исследований, также обнаружившим связь между полиморфизмом A1166C и ИМ. У пациентов с гипертонией, несущих генотип CC, обнаружено утолщение стенки аорты и повышенное содержание холестерина в крови — факторы, способствующие развитию артериального атеросклероза и тем самым увеличивающие риск ИМ [11, 12]. Во французской популяции описан синергизм взаимодействия между генами AT1R и АПФ, заключающийся в возрастании риска ИМ у гомозигот DD (ген АПФ) при переходе от генотипа AA к CC [38]. В Норвегии показано усиление риска ИМ у мужчин с избыточной массой тела и повышенным уровнем аполипопротеина в крови, гомозиготных по аллелю С [9]. У французов — носителей генотипа CC также отмечено усиление риска развития коронарного атеросклероза и болезни коронарных сосудов сердца [26, 35]. В ряде исследований показано отсутствие ассоциации гена рецептора с ИМ [10, 13, 20, 40, 44]. Наличие столь противоречивых данных можно объяснить различиями в критериях отбора и формирования групп сравнения, в разной степени учитывающих влияние негенетических факторов, национальными особенностями, а также сложным характером развития сердечно-сосудистых осложнений ГБ. По всей видимости, в разных популяциях вклад тех или иных компонентов PAC в предрасположенность к развитию осложнений ГБ различен.

В результате амплификации полиморфного минисателлита eсNOS4a/4b гена NOS3 происходит образование двух фрагментов длиной 393 п. н. (аллель 4a) и 420 п. н. (аллель 4b). Наличие ПЦР-продукта длиной 393 п. н. соответствует генотипу 4a/4a, двух фрагментов (393 и 420 п. н.) — гетерозиготе 4a/4b и фрагмента размером 420 п. н. — гетерозиготе 4b/4b.

Если в контрольной группе преобладали гомозиготы 4b/4b, то у пациентов, перенесших ИМ, наиболее часто встречались гетерозиготы 4a/4b (табл. 5). Доля гетерозигот 4a/4b в группе "ИМ+" возрастала в 1,8 раза, а содержание гомозиготы 4b/4b уменьшалось в 2,2 раза. Данные различия носили высокодостоверный характер. В группе "ИМ+" также происходил рост встречаемости гомозигот

Таблица 5

Сравнительный анализ распределения частот (в %) аллелей и генотипов полиморфного минисателлита *ecNOS4a/4b* гена *NOS3* в контрольной группе (больные СД типа 2 и ГБ без сердечно-сосудистых осложнений) и двух группах больных СД типа 2 и ГБ, перенесших ИМ или ОНМК

Генетический маркер	Контроль (n = 52)	ИМ (n = 53)			ОНМК (n = 50)		
		частота	p (Фишер)	RR	частота	p (Фишер)	RR
Генотип 4a/4a	2,4	11,1	0,10656	4,43	19,6	0,00113	8,25
Генотип 4a/4b	33,7	60,0	0,00370	2,89	52,9	0,02217	2,24
Генотип 4b/4b	63,9	28,9	0,00014	0,24	27,5	0,00004	0,22
Аллель 4a	19,3	41,1	0,00018	2,90	46,1	< 0,00001	3,54
Аллель 4b	80,7	58,9	0,00018	0,34	53,9	< 0,00001	0,28

4a/4a (в 4,4 раза), причем это изменение было близко к достоверному ($p = 0,05162$). Существенный характер носило и перераспределение аллелей: доля аллеля 4a возрастала в 2,2 раза на фоне соответствующего уменьшения встречаемости другого аллеля. Итак, минисателлит *ecNOS4a/4b* гена *NOS3* обнаруживает выраженную ассоциацию с ИМ у больных СД типа 2 и ГБ. Аллель 4b и гомозиготность по нему связаны с пониженным риском инфаркта, аллель 4a ($RR = 2,90$) и генотипы 4a/4b ($RR = 2,89$) и 4a/4a ($RR = 4,43$), наоборот, являются маркерами риска. Результаты ассоциативного анализа в зарубежных популяциях однозначно свидетельствуют о наличии связи между геном эндотелиальной NO-синтазы и ИМ, при этом генотип 4a/4a сцеплен с повышенным риском патологии [41].

В группе перенесших ОНМК наблюдали высокодостоверное возрастание частоты аллеля 4a (в 2,4 раза) и особенно генотипа 4a/4a (в 8,2 раза) при соответствующем уменьшении содержания аллеля 4b (в 1,5 раза) и гомозигот 4b/4b (в 2,3 раза). Доля гетерозигот у больных достоверно увеличивалась в 1,6 раза (см. табл. 5). Следовательно, полиморфный маркер *ecNOS4a/4b* в гене *NOS3* обнаруживает сильную ассоциацию с развитием ОНМК у больных СД типа 2 в московской популяции. Аллель 4a ($RR = 3,54$) и генотипы 4a/4b ($RR = 2,24$) и 4a/4a в особой степени ($RR = 8,25$) являются выраженными маркерами риска, а носительство аллеля 4b ($RR = 0,28$) и 4b/4b ($RR = 0,22$), наоборот, сцеплено со сниженным риском данного заболевания.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о связи генов *RAS* и NO-синтазы с развитием сердечно-сосудистых осложнений у больных с метаболическим вариантом ГБ. Продукты этих генов напрямую связаны с обеспечением синтеза и активностью таких противоположных по своему действию на сосуды агентов, какими являются ангиотензин II и NO. Нарушение баланса между содержанием и активностью этих агентов в крови в пользу ангиотензина II может явиться одной из причин развития сердечно-сосудистых осложнений ГБ на фоне СД типа 2.

Выводы

1. Выявлено защитное действие генотипа I/I гена АПФ к развитию ИМ у больных СД типа 2 и ГБ.

2. Показано отсутствие связи между полиморфизмом T174M гена *AGT* и формированием сердечно-сосудистых осложнений у больных СД типа 2.

3. Обнаружена сильная ассоциация между полиморфизмом A1166C гена *AT1R* и развитием ИМ у больных СД типа 2 и ГБ в московской популяции. Аллель А и генотип АА ослабляют риск раннего развития гипертензии, тогда как аллель С и остальные варианты генотипов, наоборот, усиливают. В то же время ген рецептора, по-видимому, не связан с развитием ОНМК у больных ГБ при СД типа 2.

4. Минисателлит *ecNOS4a/4b* гена *NOS3* строго связан с ИМ и ОНМК у больных ГБ на фоне СД типа 2. Аллель 4b и гомозиготность по нему связаны с пониженным риском сердечно-сосудистой патологии, аллель 4a и генотипы 4a/4b и 4a/4a наоборот, являются маркерами риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И. // Сахарный диабет. — 1998. — № 1. — С. 7—18.
2. Демуров Л. М., Чистяков Д. А., Чугунова Л. А. и др. // Молекул. биол. — 1997. — Т. 31, № 1. — С. 59—62.
3. Суцов Ю. И., Дедов И. И., Кудрякова С. В. // Сахарный диабет. — 1998. — № 1. — С. 41—43.
4. Чистяков Д. А., Демуров Л. М., Кондратьев Я. Ю. и др. // Молекул. биол. — 1998. — Т. 32, № 3. — С. 410—415.
5. Чистяков Д. А., Туракулов Р. И., Моисеев С. В. и др. // Там же. — 1999. — Т. 33, № 4. — С. 592—594.
6. Чистяков Д. А., Туракулов Р. И., Терещенко С. Н. и др. // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 8. — С. 1160—1164.
7. Чистяков Д. А., Кобалава Ж. Д., Терещенко С. Н. и др. // Тер. арх. — 2000. — Т. 76, № 4. — С. 30—35.
8. Шадрин М. И. Изучение генетических факторов риска ишемической болезни сердца: Дис. ... канд. биол. наук. — М., 1997.
9. Amant C., Hamon M., Bauters C. et al. // Am. J. Cardiol. — 1997. — Vol. 29. — P. 486—490.
10. Badenhop R. F., Wang X. L., Wicklen D. E. // Circulation. — 1996. — Vol. 93. — P. 2092—2096.
11. Benetos A., Topouchian J., Ricard S. et al. // Hypertension. — 1995. — Vol. 26. — P. 44—47.
12. Benetos A., Gautier S., Ricard S. et al. // Circulation. — 1996. — Vol. 94. — P. 698—703.
13. Castellano M., Muiesan M. L., Beschi M. et al. // Hypertension. — 1996. — Vol. 28. — P. 1076—1080.
14. Caulfield M., Lavender P., Farral M. et al. // New Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 330. — P. 1629—1633.
15. Caulfield M., Lavender P., Newell-Price J. // J. Clin. Invest. — 1995. — Vol. 96. — P. 687—692.
16. Cooke J. P., Tsao P. // Curr. Opin. Cardiol. — 1992. — Vol. 7. — P. 799—804.
17. Dinerman J. L., Lowenstein C. J., Snyder S. H. // Circulat. Res. — 1993. — Vol. 73. — P. 217—222.
18. Fornage M., Turner S. T., Sing C. F., Boerwinkle E. // Hum. Genet. — 1995. — Vol. 96. — P. 295—301.
19. Gemill R. M., Drabkin H. A. // Cytogenet. Cell. Genet. — 1991. — Vol. 57. — P. 162—166.
20. Hamon M., Amant C., Bauters C. et al. // Am. J. Cardiol. — 1998. — Vol. 81. — P. 79—81.
21. Hingorani A. D., Brown M. J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1995. — Vol. 231. — P. 725—729.
22. Hixson J. E., Powers P. K. // Hum. Genet. — 1995. — Vol. 96. — P. 110—112.
23. Isa M. N., Boyd E., Morrison N. et al. // Genomics. — 1990. — Vol. 8. — P. 598—600.
24. Jalil J. E., Piddo A. M., Cordova S. et al. // Am. J. Hypertens. — 1999. — Vol. 12. — P. 697—704.
25. Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y. V. et al. // Cell. — 1992. — Vol. 71. — P. 169—180.
26. Jeunemaitre X., Ledru F., Battaglia S. et al. // Hum. Genet. — 1997. — Vol. 99. — P. 66—73.
27. Knowles R. G., Moncada S. // Biochem. J. — 1994. — Vol. 298. — P. 249—258.
28. Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. // Pharmacol. Rev. — 1991. — Vol. 43. — P. 109—142.

29. Nadaud S., Bonnardeaux A., Lathrop M., Soubrier F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1994. — Vol. 198. — P. 1027—1033.
30. Nishiuma S., Kario K., Kayaba K. et al. // J. Hypertens. — 1995. — Vol. 13. — P. 717—722.
31. Oren I., Brook J. G., Gershoni-Baruch R. et al. // Atherosclerosis. — 1999. — Vol. 145. — P. 267—271.
32. Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S. // Nature. — 1987. — Vol. 327. — P. 524—526.
33. Palmer R. M., Rees D. D., Ashton D. S., Moncada S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1988. — Vol. 153. — P. 1251—1256.
34. Pfohl M., Koch M., Prescod S. et al. // Eur. Heart J. — 1999. — Vol. 20. — P. 1318—1325.
35. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. // J. Clin. Invest. — 1990. — Vol. 86. — P. 1343—1346.
36. Roff D. A., Bentzen P. // Mol. Biol. Evol. — 1989. — Vol. 6. — P. 539—545.
37. Thomson G. // Theor. Popul. Biol. — 1981. — Vol. 20. — P. 168.
38. Tiret L., Bonnardeaux A., Poirier O. et al. // Lancet. — 1994. — Vol. 344. — P. 910—913.
39. Tsukada T., Yokoyama K., Arai T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1998. — Vol. 245. — P. 190—193.
40. Van Geel P. P., Pinto Y. M., Buikema H., van Gilst W. H. // Eur. Heart J. — 1998. — Vol. 19. — P. 13—17.
41. Wang X. L., Sim A. S., Badenhop R. F. et al. // Nature Med. — 1996. — Vol. 2. — P. 41—45.
42. Wang X. L., Mahaney M. C., Sim A. S. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1997. — Vol. 17. — P. 3147—3153.
43. Williams R. R., Hunt S. C., Hasstedt S. J. // J. Hypertens. — 1989. — Vol. 7. — P. 8—13.
44. Zedda N., Onni S., Angius A. et al. // Cardiologia. — 1997. — Vol. 42. — P. 281—285.

Поступила 28.03.2000

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 616.379-008.64-07:616.154:577.175.62-055.1

Н. П. Гончаров, Г. В. Каця, С. Ю. Калинин, Т. Н. Тодуа, Н. М. Малышева

МЕТАБОЛИЗМ АНДРОГЕНОВ У МУЖЧИН, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 1

Эндокринологический научный центр (дир — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Целью работы являлось изучение метаболизма и содержания в периферической крови основных андрогенов надпочечников (дегидроэпиандростерона и его сульфатной формы) и гонад (тестостерона) у мужчин различных возрастных групп в условиях инсулинотерапии. Обследовано 35 мужчин, больных сахарным диабетом типа 1 в возрасте 15—52 лет и 34 паритетных по возрасту здоровых мужчин контрольной группы. Результаты работы показали, что у больных сахарным диабетом содержание дегидроэпиандростерона и дегидроэпи-андростерона-сульфата в периферической крови снижено по сравнению со здоровыми мужчинами аналогичного возраста. Выраженные различия регистрируются в молодом возрасте 15—45 лет. Одновременно у обследованных пациентов наблюдаются более высокие показатели содержания кортизола. Разнонаправленные изменения в уровнях надпочечниковых андрогенов и кортизола вызывают резкое нарушение баланса данных гормонов в организме больных сахарным диабетом типа 1.

У 28 из 35 обследованных пациентов в условиях инсулинотерапии содержание тестостерона поддерживалось на нормальном уровне, в среднем $20,6 \pm 1,2$ нмоль/л. У 7 пациентов с более высокими показателями гликемии среднее содержание тестостерона не превышало $6,3 \pm 1,1$ нмоль/л. Следует полагать, что у больных сахарным диабетом в условиях инсулинотерапии при поддержании хорошего метаболического контроля сохраняется нормальный уровень тестостерона в отличие от надпочечниковых андрогенов, содержание которых снижается.

The purpose of this work was to study metabolism and peripheral blood content of the main adrenal and gonadal androgens (dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate and testosterone, respectively) in men of different age treated by insulin. Thirty-five diabetics type 1 aged 15-52 years and 34 age-matched healthy controls were examined. The levels of DHEA and DHEA sulfate in the peripheral blood were decreased in the diabetics in comparison with healthy men, the differences being the most pronounced at the age of 15-45 years. In parallel with this, hydrocortisone levels were increased in the patients. Opposite changes in the levels of adrenal androgens and hydrocortisone cause a drastic shift in these hormones balance in the patients with type I diabetes.

The content of testosterone was normal (20.6 ± 1.2 nmol/liter) in 28 of 35 patients during insulin therapy, while in 7 with higher glycemia values the mean testosterone content was no higher than 6.3 ± 1.1 nmol/liter. Presumably, the content of testosterone remains normal in diabetics during insulin therapy in the presence of adequate metabolic control, while the content of adrenal androgens decreases.

Данные последних лет указывают на возможное участие инсулина в многофакторной системе регуляции секреции андрогенов надпочечниками и семенниками [5, 13]. В большинстве клинических наблюдений отмечается выраженная тенденция к снижению уровня тестостерона у больных сахарным диабетом (СД) [7, 11].

На модели стрептозотоцинового диабета у крыс обнаружено снижение концентрации тестостерона в периферической крови, уменьшение в клетках Лейдига количества рецепторов к лютеинизиру-

ющему гормону (ЛГ) и снижение способности к синтезу тестостерона. При введении данным животным экзогенного инсулина наблюдалась активация в клетках Лейдига 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы и как следствие увеличение секреции тестостерона. При этом количество рецепторов к ЛГ достигало нормального уровня [1, 3, 9].

В то же время вопрос о состоянии секреции надпочечниковых андрогенов у больных СД остается открытым. Как хорошо известно, с возрастным снижением секреции дегидроэпиандростерона