

UDC: 616.379-008.64-06:616.61]:575.113

[https://doi.org/10.32345/USMYJ.1\(144\).2024.55-60](https://doi.org/10.32345/USMYJ.1(144).2024.55-60)

Received: September 21, 2023

Accepted: February 05, 2024

## Поліморфізм rs1799983 гена ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на цукровий діабет 2 типу

Савічева Катерина, Несен Андрій, Семенових Поліна

Державна установа «Національний інститут терапії імені Л.Т. Малої НАМН України», Харків, Україна

### Address for correspondence:

Savicheva Kateryna

E-mail: [katyusha.savicheva@gmail.com](mailto:katyusha.savicheva@gmail.com)

**Анотація:** на сьогоднішній день цукровий діабет є одним з найпоширеніших неінфекційних захворювань людини після серцево-судинної та онкологічної патології, яке призводить до інвалідності та летальних наслідків. Встановлення асоціації поліморфізму rs 1799983 гена eNOS з розвитком та прогресуванням цукрового діабету та подальша оцінка індивідуального генетичного ризику мають важливе значення для розробки диференційованого підходу до профілактики та лікування даної патології та її ускладнень в залежності від спадкової схильності конкретного пацієнта. Метою дослідження було визначення поширеності поліморфізму rs 1799983 гена eNOS у хворих на цукровий діабет 2 типу з нефропатією та виявлення можливого асоціативного зв'язку перебігу захворювання з генетичним профілем обстежених. Матеріали і методи: в процесі виконання дослідження обстежено 126 хворих на діабетичну нефропатію, контрольну групу склали 20 здорових осіб. Дезоксирибонуклеїнові кислоти виділяли з крові стандартним методом з використанням набору реагентів «Neo-Prep50» («Неоген», Україна). Генотипування поліморфізму rs 1799983 гена eNOS проводили за технологією TaqMan із застосуванням набору Taq-Man® Fast Universal PCR Master Mix та TaqMan® SNP Assay. Статистичний аналіз генетичних асоціацій проводився з використанням програми SNP Stats. Результати: у хворих на цукровий діабет 2 типу з діабетичною нефропатією розподіл генотипів був наступним: G/G – 63,5 %, G/T – 33,3 % і T/T – 3,2 %. Розподіл алельних варіантів у даній групі становив: алель D – 80,2 %, алель T – 19,8 %. В групі контролю за результатами нашого дослідження G/G генотип поліморфізму rs1799983 гену eNOS становив 85,0 %, G/T – 10,0 % і T/T – 5,0 %. Частота зустрічальності алелі D була 90,0 %, алелі T – 10,0 %. Аналіз даних за допомогою онлайн програми SNPStats продемонстрував вірогідну різницю у частоті зустрічальності генотипів та алелей досліджуваного поліморфізму в групі хворих на діабетичну нефропатію в порівнянні з контролем, що відповідає домінантній моделі успадкування ВШ 0,31 (0,09-0,99);  $p = 0,045$ . Висновки: у хворих на діабетичну нефропатію розподіл генотипів поліморфізму rs 1799983 гена eNOS відповідав рівновазі Харді-Вайнберга в усіх досліджених групах та суттєво не відрізнявся від європейських популяцій. У групі хворих на цукровий діабет 2 типу з нефропатією сумарна частота зустрічальності генотипів G/T та T/T гена eNOS була у 3 рази більше, ніж у групі контролю, що доводить безперечний вплив T алелі на розвиток ураження нирок в даній когорті пацієнтів.

**Ключові слова:** нирки, діабетична нефропатія, цукровий діабет, синтаза оксиду азоту, гени

## Вступ

Проблема боротьби з цукровим діабетом (ЦД) з кожним роком стає все більш актуальною для сучасної медицини у зв'язку зі стрімким зростанням захворюваності у всьому світі. Суттєві зміни умов та способу життя людей у XXI столітті пов'язані з гіпокінезією, споживанням продуктів із високим вмістом вуглеводів, солі та трансжирів, часті стресові ситуації, а також шкідливі звички лежать в основі підвищення маси тіла, розвитку метаболічного синдрому й ЦД 2 типу. На сьогоднішній день ЦД є одним з найпоширеніших неінфекційних захворювань людини після серцево-судинної та онкологічної патології, яке призводить до інвалідності та летальних наслідків.

Найбільша небезпека ЦД, безумовно, пов'язана з ускладненнями, що розвиваються завдяки його руйнівного впливу на дрібні судини. Важливе місце у цьому ряду займає діабетична нефропатія (ДН), за даними різних авторів, розвивається у 20-40 % пацієнтів на ЦД (Alicic R.Z. et al, 2017). ДН супроводжується специфічним ураженням як клубочків нирок, так і тубуло-інтерстиціальної тканини, і призводить до прогресивного зниження фільтраційної функції нирок та розвитку термінальної ниркової недостатності. Клінічно ДН проявляється альбумінурією, артеріальною гіпертензією і зниженням швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) (Shim K. et al, 2020; Giralt-Lopez A. et al, 2020).

Визначення генетичних маркерів, які обумовлюють генетичну схильність до розвитку ДН у хворих на ЦД 2 типу представляють великий клінічний інтерес через можливість прогнозування перебігу захворювання, а також виділення груп підвищеного ризику ще на доклінічному етапі, коли ураження нирок ще можуть бути зворотними.

Сучасні дослідження з виявлення генетичної детермінованості багатофакторних захворювань, таких як ДН, базується на визначенні поліморфних варіантів генів, білкові продукти експресії яких потенційно приймають участь у патогенезі досліджуваного захворювання.

Одним з таких продуктів є оксид азоту (NO), який відіграє важливу роль у регуляції

функціонального стану ендотелію та судинного тонусу, у тому числі і у хворих на ЦД (Monisha B., Vats P., 2014). Він утворюється в організмі шляхом трансформації амінокислоти L-аргініну під впливом ферментів сімейства цитохром-P-450-подібних гемопротейдів – NO-синтаз (NOS). Ендотеліальна синтаза оксиду азоту (eNOS) – одна з синтаз людини, що кодується геном NOS3 та відповідає за вироблення NO в ендотелії судин (Fish, J.E.; Marsden, P.A., 2006; Sumpio B.E. et al, 2002), відіграє вирішальну роль у регуляції тонусу судин, проліферації клітин, адгезії лейкоцитів й агрегації тромбоцитів (Forstermann U., Munzel T., 2006).

З моменту відкриття гена *eNOS* не припиняється активний науковий пошук асоціацій різних варіантів його поліморфізму у хворих на ЦД 2 типу з нирковою та судинною патологією. Встановлення асоціації поліморфізму гена з захворюванням та подальша оцінка індивідуального генетичного ризику мають важливе значення для розробки диференційованого підходу до профілактики та лікування даної патології та її ускладнень в залежності від спадкової схильності конкретного пацієнта. Тому в даний час одним з найбільш прогресивних підходів є розробка стратегії ранньої діагностики, прогнозування та превентивної терапії хвороби з використанням генетичних маркерів.

## Мета

Визначення поширеності поліморфізму rs 1799983 гена *eNOS* у хворих на цукровий діабет 2 типу з нефропатією та виявлення можливого асоціативного зв'язку перебігу захворювання з генетичним профілем обстежених.

## Матеріали і методи

Дослідження проводились у відділі профілактики та лікування хвороб нирок при коморбідних станах на базі клінічного відділення гіпертензій та захворювань нирок ДУ «Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України». Дослідження виконані згідно міжнародних стандартів щодо погодженої участі обстежених, етичної складової виконання досліджень та взяття біоматеріалу.

В процесі виконання дослідження обстежено 126 хворих на ДН. Контрольну групу

склали 20 здорових осіб. Критеріями виключення з дослідження були: вік менше 18 років, вагітність, ЦД 1 типу, уроджені аномалії сечовивідних шляхів і нирок, термінальна ниркова недостатність, серцева недостатність III-IV стадій (NYHA), гострий інфаркт міокарду, інфекційні та важкі запальні процеси, онкологічні захворювання, неконтрольовані хвороби крові, важка патологія печінки.

Дезоксирибонуклеїнові кислоти виділяли з крові стандартним методом з використанням набору реагентів «NeoPrep50» («Неоген», Україна) згідно інструкції виробника. Генотипування поліморфізму rs 1799983 гена *eNOS* проводили за технологією TaqMan (алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція з детекцією результату в реальному часі) із застосуванням набору Taq-Man® Fast Universal PCR Master Mix та TaqMan® SNP Assay. Ампліфікацію проводили за допомогою «Системи детекції продуктів ПЛР в реальному часі CFX96 Touch (BioRad, США). Для алельної дискримінації використовували програмне забезпечення CFX Manager Software (США).

Статистичну обробку проводили з використанням пакетів програм IBM®SPSS® Statistics 23.0. Статистичний аналіз генетичних асоціацій проводився з використанням програми SNP Stats. Достовірність різниці у розподілі генотипів та алелей поліморфізму rs 1799983 гена *eNOS* між групами хворих та контролем оцінювали за критерієм  $\chi^2$  з використанням мультиплікативної, загальної та адитивної (тест Кохрана-Армітаджа) моделей.

### Результати

Розподіл генотипів та алелей поліморфізму *Alu I/D* гену *ACE* було проаналізовано у 126 обстежених хворих на ДН. Контрольну

групу склали 20 здорових осіб, у яких виявлено носійство G/G поліморфізму гена *eNOS* (n = 17); G/T поліморфізму гена *eNOS* (n = 2) та T/T поліморфізму гена *eNOS* (n = 1).

Як показали результати молекулярно-генетичного дослідження, розподіл генотипів поліморфізму rs 1799983 (G894T, Glu298Asp) гена *eNOS* знаходився у рівновазі Харді-Вайнберга в усіх досліджених групах (табл. 1).

**Таблиця 1.** Рівновага Харді – Вайнберга (значення p)

Поліморфізм	Хворі на ДН	Контроль	Всі дослідження
eNOS	0,78	0,15	1

Розподіл генотипів в обстежених нами групах (табл. 2), було порівняним з даними 1000 Genomes Project Phase 3 (1000 Genomes Project Phase 3, [www.internationalgenome.org](http://www.internationalgenome.org)). У базу даних 1000 Genomes для визначення частот генотипів поліморфізму rs1799983 гена *eNOS* було залучено 2504 людини. Мажорний гомозиготний генотип G/G визначався у 69,4% пацієнтів (за даними нашого дослідження – 66,4%), гетерозигота G/T – у 25,0% (у наших дослідженнях – 30,0%), мінорна гомозигота T/T – 4,6% (у наших дослідженнях – 3,5%). Таким чином, наші результати повністю відповідають частотам наведеним у генетичній базі 1000 Genomes.

Проведено порівняння розподілу алелів досліджуваного поліморфізму rs1799983 гену *eNOS* серед усіх пацієнтів (табл. 2) з даними генетичної бази даних 1000 Genomes (5008 досліджень): мажорна алель G визначалася у 82,4% пацієнтів (в нашому дослідженні – 81,5%), мутантна мінорна алель T – у 17,6% (за нашими даними – 18,5%). Таким

**Таблиця 2.** Частотний розподіл алелей поліморфізму гену *eNOS*

Група	Генотипи, %		Частота зустрічальності, %		
	G/G	G/T	T/T	G	T
Хворі на ДН	63,5	33,3	3,2	80,2	19,8
Контроль	85,0	10,0	5,0	90,0	10,0
Всі дослідження	66,4	30,1	3,5	81,5	18,5

чином, наші результати щодо розподілу алелів поліморфізму G894T гена *eNOS* також відповідали інформації у базі 1000 Genomes.

У хворих на ЦД 2 типу з ДН розподіл генотипів був наступним: G/G – 63,5 %, G/T – 33,3 % і T/T – 3,2 %. Розподіл алельних варіантів в даній групі становив: алель D – 80,2 %, алель T – 19,8 % (табл. 2).

В групі контролю за результатами нашого дослідження G/G генотип поліморфізму rs1799983 гену *eNOS* становив 85,0 %, G/T – 10,0 % і T/T – 5,0 %. Частота зустрічальності алелі D була 90,0 %, алелі T – 10,0 % (табл. 2).

Аналіз даних за допомогою онлайн програми SNPStats продемонстрував вірогідну різницю у частоті зустрічальності генотипів та алелей досліджуваного поліморфізму в групі хворих на ДН в порівнянні з контролем, що відповідає домінантній моделі успадкування ВШ 0,31 (0,09-0,99);  $p = 0,045$  (табл. 3).

Як видно з наведених в таблиці 3 даних, в групі хворих на ЦД 2 типу з ДН частота зустрічальності генотипів G/T або T/T гена *eNOS* була у 3 рази більше, ніж у групі контролю, що доводить безперечний вплив T алелі на розвиток захворювання.

### Обговорення

Численні публікації вказують на важливу роль поліморфізму rs1799983 гену *eNOS* на розвиток ЦД 2 типу. Tabatabaei-Malazy O. та співавтори проаналізували 4795 хворих на ЦД та 3805 контрольних випадки підсумувавши власні дослідження та чотири мета-аналізи,

що дозволило довести позитивний зв'язок поліморфізмом rs1799983 гена *eNOS* з розвитком захворювання (Tabatabaei-Malazy O. et al., 2017).

В 2009 р. Zintzaras E. et al. опублікували результати метааналізу поліморфізму G894T (Glu289Asp) у 7401 хворого на ДН порівняно з 8046 пацієнтами контрольної групи. Результати виявили значиму асоціацію поліморфізму G894T гену *eNOS* з вираженою ДН у осіб з ЦД 2 типу в Східній Азії (Zintzaras E. et al, 2009).

За результатами єгипетського дослідження El-Lebedy D. встановлено, що наявність мутантної алелі T в 3,07 рази збільшувала ризик розвитку ЦД 2 типу та в 3,08 рази ризик виникнення серцево-судинних ускладнень у цієї категорії хворих (El-Lebedy D., 2018). Також для хворих китайської популяції Хан показана значуща різниця у розподілі мутантної алелі T поліморфізму rs1799983 гена *eNOS* та встановлений зв'язок поліморфізму з ЦД 2 типу (Li J.Y. et al. 2015). Серед індійської популяції хворих Angeline T. та співавтори (Angeline T. et al., 2011) привели дані щодо асоціації поліморфізму G894T та ЦД – мутантний генотип (GT/TT) зустрічався в 7,2 рази частіше у пацієнтів з досліджуваною патологією, ніж в контрольній групі.

### Висновки

У хворих на ДН розподіл генотипів поліморфізму rs 1799983 гена *eNOS* відповідав рівновазі Харді-Вайнберга в усіх досліджених

**Таблиця 3.** Поліморфізм гена *eNOS* у хворих на ДН та у групі контролю

Модель успадкування	Генотип	Хворі ДН (n = 126)	Контроль (n = 20)	ВШ (95% ДІ)	p	ІКА	РХВ
Кодомінантна	G/G	80 (63,5%)	17 (85,0%)	1,00	0,07	117,3	126,3
	G/T	42 (33,3%)	2 (10,0%)	0,22 (0,05-1,02)			
	T/T	4 (3,2%)	1 (5,0%)	1,18 (0,12-11,20)			
Домінантна	G/G	80 (63,5%)	17 (85,0%)	1,00	0,045	116,6	122,6
	G/T-T/T	46 (36,5%)	3 (15,0%)	0,31 (0,09-0,99)			
Рецесивна	G/G-G/T	122 (96,8%)	19 (95,0%)	1,00	0,69	120,5	126,5
	T/T	4 (3,2%)	1 (5,0%)	1,61 (0,17-15,14)			
Над-домінантна	G/G-T/T	84 (66,7%)	18 (9,0%)	1,00	0,021	115,3	121,3
	G/T	42(33,3%)	2 (10,0%)	0,22 (0,05-1,00)			
Лог-адитивна	–	–	–	0,45 (0,15-1,32)	0,11	118,1	124,1

групах та суттєво не відрізнявся від європейських популяцій

У групі хворих на ЦД 2 типу з ДН сумарна частота зустрічальності генотипів G/T та T/T гена *eNOS* була у 3 рази більше, ніж у групі контролю, що доводить безперечний вплив T алелі на розвиток ураження нирок в даній когорті пацієнтів.

#### Фінансування

Не було отримано жодного зовнішнього фінансування для проведення дослідження.

#### Конфлікт інтересів

Під час проведення дослідження не виникло конфлікту інтересів.

#### Згода на публікацію

Всі автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

#### ORCID ID та внесок авторів

[0000-0003-1015-8832](https://orcid.org/0000-0003-1015-8832) (B,C,D,E) Savicheva

Kateryna

[0000-0002-0834-0216](https://orcid.org/0000-0002-0834-0216) (A,F) Nesen Andrii

[0000-0003-0475-8524](https://orcid.org/0000-0003-0475-8524) (A,C,E) Semenovykh

Polina

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation, D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F – Final approval of article

## ЛІТЕРАТУРА

1000 Genomes Project Phase 3. Available at: <http://www.internationalgenome.org>.

Alicic R.Z., Rooney M.T., Katherine R. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2017; 12 (12): 2032-2045. doi: 10.2215/CJN.11491116

Angeline T. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and diabetes mellitus (type II) among South Indians. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2011; 2011: 462607. doi: 10.1155/2011/462607

El-Lebedy D. Interaction between endothelial nitric oxide synthase rs1799983, cholesteryl ester-transfer protein rs708272 and angiopoietin-like protein rs2278426 gene variants highly elevates the risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Diabetol*. 2018; 17(1), e97. doi: 10.1186/s12933-018-0742-8.

Fish, J.E., Marsden P.A. Endothelial nitric oxide synthase: Insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. *Cell Mol. Life Sci*. 2006; 63: 144–162.

Forstermann U., Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation*. 2006; 113: 1708–1714.

Giralt-Lopez A., Molina-Van D.B.M., Vergara A. et al. Revisiting experimental models of diabetic nephropathy. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21: 3587–3609. doi: 10.3390/ijms21103587.

Li J.Y., Tao F., Wu X.X. et al. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes contribute to the development of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Genet. Mol. Res*. 2015; 14(4): 12993-13002. doi: 10.4238/2015.October.21.20.

Monisha B., Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Human Genetics*. 2014; 20(1): 10–19.

Shim K., Begum R., Yang C. et al. Complement activation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes*. 2020; 11: 1–12. doi: 10.4239/wjd.v11.i1.1.

Sumpio B.E., Riley, J.T., Dardik, A. Cells in focus: Endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2002; 34: 1508–1512.

Tabatabaei-Malazy O., Khodaeian M., Bitarafan F. et al. Polymorphisms of Antioxidant Genes as a Target for Diabetes Management. *Int. J. Mol. Cell Med*. 2017; 6(3): 135-147. doi: 10.22088/acadpub.BUMS.6.3.135.

Zintzaras E., Papathanasiou A.A., Stefanidis I. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy: a HuGE review and meta-analysis. *Genet. Med*. 2009; 11(10): 695–706. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181b2046b.

## Polymorphism rs1799983 of the eNOS gene in patients with type 2 diabetes mellitus

Savicheva Kateryna, Nesen Andrii, Semenovykh Polina

GI “L.T. Malaya Therapy National Institute of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kharkiv, Ukraine

**Address for correspondence:**

Savicheva Kateryna

E-mail: [katyusha.savicheva@gmail.com](mailto:katyusha.savicheva@gmail.com)

**Abstract:** Nowadays diabetes mellitus is one of the most common non-communicable human diseases after cardiovascular and oncological pathology, leading to disability and death. Establishing the association of the rs1799983 polymorphism of the eNOS gene with the development and progression of diabetes mellitus and further assessment of individual genetic risk is important for the development of a differentiated approach to the prevention and treatment of this pathology and its complications, depending on the hereditary predisposition of a particular patient. The purpose of the study was to determine the prevalence of the rs1799983 polymorphism of the eNOS gene in patients with type 2 diabetes mellitus with nephropathy and to identify a possible association between the course of the disease and the genetic profile of the subjects. **Materials and methods:** 126 patients with diabetic nephropathy were examined during the study, and the control group consisted of 20 healthy individuals. Deoxyribonucleic acids were isolated from blood by the standard method using the NeoPrep50 reagent kit (Neogen, Ukraine). Genotyping of the rs1799983 polymorphism of the eNOS gene was performed by TaqMan technology using the Taq-Man® Fast Universal PCR Master Mix and TaqMan® SNP Assay. Statistical analysis of genetic associations was performed using the SNP Stats program. **Results:** in patients with type 2 diabetes mellitus with diabetic nephropathy, the distribution of genotypes was as follows: G/G – 63.5 %, G/T – 33,3 % i T/T – 3,2 %. The distribution of allelic variants in this group of patients was as follows: G allele – 80.2%, T allele – 19.8%. In the control group, according to the results of our study, the G/G genotype of the rs1799983 polymorphism of the eNOS gene was 85.0%, G/T – 10.0% and T/T – 5.0%. The frequency of the D allele was 90.0%, and the T allele was 10.0%. Data analysis using the online program SNPStats demonstrated a significant difference in the frequency of genotypes and alleles of the studied polymorphism in the group of patients with diabetic nephropathy compared with controls, which corresponds to the dominant model of inheritance of the HR 0.31 (0.09-0.99);  $p = 0.045$ . **Conclusions:** in patients with diabetic nephropathy, the distribution of genotypes of the rs 1799983 polymorphism of the eNOS gene corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium in all studied groups and did not differ significantly from European populations. In the group of patients with type 2 diabetes with nephropathy, the total frequency of G/T and T/T genotypes of the eNOS gene was 3 times higher than in the control group, which proves the undeniable influence of the T allele on the development of kidney damage in this cohort of patients.

**Keywords:** [Kidney](#), [Diabetic Nephropathies](#), [Diabetes Mellitus](#), [Nitric Oxide Synthase](#), [Genes](#)



Copyright: © 2024 by the authors; licensee USMYJ, Kyiv, Ukraine.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).