

УДК 612.133:575.113

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ВАЗОКОНСТРИКЦИИ С ПОЛИМОРФИЗМОМ Т-786С ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА

<sup>1,2</sup>Бебякова Н.А., <sup>1,2</sup>Хромова А.В., <sup>1</sup>Феликсова О.М.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», Архангельск;

<sup>2</sup>Институт медико-биологических исследований ФГАОУ ВПО «Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова», e-mail: nbebyakova@mail.ru

Проанализированы результаты ПЦР-анализа в промоторе гена NO-синтазы на наличие Т-786С полиморфизма и ассоциация его с типом гемодинамической реакции на нагрузку у 168 юношей. В группе лиц с гипертонической реакцией на нагрузку частота встречаемости генотипа СС составила 23,5%, в то время как у лиц с нормотонической реакцией – только у 6,8%. Частоты генотипов ТТ составили 32,4 и 50,5% соответственно. Гетерозиготный генотип СТ встречался у 44,1% лиц с гипертонической реакцией и у 42,7% лиц с нормотонической реакцией. Таким образом, было выявлено, что генотип СС статистически значимо ( $p < 0,05$ ) чаще встречается у лиц с гипертонической реакцией на нагрузку. Для лиц с данным генотипом характерен более высокий тонус периферических сосудов. Уровень вазоактивных агентов и величина индекса NO/ЭТ-1 статистически значимо отличается у лиц с генотипом СС. У данных лиц дисбаланс продукции основных вазоактивных факторов проявляется в повышении продукции эндотелина-1. Перестройка промоторной области гена eNOS, ведущая к незначительному снижению активности синтазы оксида азота приводит не только к некоторому снижению уровня NO, но и сопровождается повышением продукции вазоконстриктора эндотелина-1.

**Ключевые слова:** гемодинамика, вазоконстрикция, тип реакции на нагрузку, эндотелин-1, NO, индекс периферического сопротивления, полиморфизм Т-786С в гене NO-синтазы

## T-786C POLYMORPHISM IN ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE IS ASSOCIATED WITH PERIPHERAL VASOCONSTRICTION

<sup>1,2</sup>Bebyakova N.A., <sup>1,2</sup>Khromova A.V., <sup>1</sup>Feliksova O.M.

<sup>1</sup>Northern State Medical University, Arkhangelsk;

<sup>2</sup>Institute for Biomedical Research FGAOU VPO «Northern (Arctic) Federal University. MV Lomonosov», e-mail: nbebyakova@mail.ru

168 male persons aged 18–22 years without complaints and heart problems were examined. We spent PCR analysis of T-786C polymorphism in promoters of NO-synthase gene and its association with the type of hemodynamic reaction to the load. We determined the basic parameters of hemodynamic and vascular tone. The study surveyed persons genotypes distribution of the studied polymorphism of NOS3 revealed that the ratio of normal homozygotes (TT), heterozygotes (TC) and pathological homozygotes (CC) – 42,6; 46,1 and 11,3%, respectively. The most rare genotype is the CC, which according to several authors associated with the risk of CHD and arterial hypertension. All respondents were divided into groups depending on the type of reaction to the load. Hypertensive reaction was detected in 23% of subjects, normotensive u – 73%. In the group of patients with hypertensive reaction to the load frequency of occurrence of the CC genotype was 23,5%, while among persons with normotensive reaction – only 6,8%. Frequency of genotypes TT amounted to 32,4 and 50,5% respectively. Heterozygous genotype met at 44,1% of patients with hypertensive response and 42,7% of persons with normotensive reaction. Thus it was revealed that the CC genotype statistically significantly more often ( $p < 0,05$ ) occurs in patients with hypertensive reaction to the load. For persons with CC genotype is characterized by more pronounced peripheral vasoconstriction, which they say high index values of peripheral resistance after load ( $p < 0,05$ ) compared with other genotypes.

**Keywords:** hemodynamic, vasoconstriction, the type of reaction to the load, endotheline-1, NO the index of peripheral resistance, T-786C polymorphism in endothelial nitric oxide synthase

Детальная расшифровка механизмов регуляции периферического тонуса сосудов является фундаментальной научной задачей. Нарушение активности и взаимодействия различных систем регуляции сосудистого тонуса ведёт к развитию артериальной гипертензии. В настоящее время наблюдается «генетизация» данной сферы научных изысканий, то есть активно ведутся молекулярно-генетические исследования, позволяющие выявить особенности генотипа, обладающие негативным или протективным эффектом в отношении нарушений регуляции сосудистого тонуса.

Ранним предиктором этих нарушений является эндотелиальная дисфункция, к наиболее важным маркерам которой относят уровни оксида азота и эндотелина-1 [4]. При «нормальной» функции эндотелия баланс всегда смещен в сторону поддержания вазодилатации, который обеспечивается в том числе и за счёт стабильной, достаточной экспрессии эндотелиальной NO-синтазы. Этот фермент участвует в синтезе NO и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления. Изменения экспрессии NO-синтазы ассоциируются с целым рядом сердечно-сосудистых забо-

леваний, в том числе и артериальной гипертензией [3, 6, 7]. Различная активность выработки NO связана с полиморфизмом гена NO-синтазы, в первую очередь, в зоне промотора гена. К настоящему моменту в этом гене выявлен полиморфизм в 11 местах, 8 из которых изучали в качестве фактора риска развития сердечно-сосудистой патологии. Эти исследования, как правило, выполнялись на больных с патологией системы кровообращения. Кроме того, часть исследований полиморфизмов в гене NO-синтазы проводилась с целью установить распространенность полиморфизмов в разных популяциях человека без выявления ассоциативных связей с какой-либо патологией.

В связи с этим **целью** нашей работы явилось установление связи и патогенетического значения полиморфизма T-786C промотора гена NO-синтазы с риском периферической вазоконстрикции у практически здоровых лиц.

#### Материалы и методы исследования

**Объект исследования** – практически здоровые мужчины в возрасте 18–22 лет, постоянно проживающие на территории Европейского Севера. Всего обследовано 168 человек. Группа обследуемых сформирована путем анализа амбулаторных карт, методом анкетирования, осмотра терапевта. Критериями исключения из исследования являлись: наличие у обследуемых острых воспалительных заболеваний, хронических заболеваний внутренних органов, в том числе и в стадии стойкой ремиссии, ожирения.

**Материалы и методы.** Тонус сосудов оценивался по данным периферической реовазографии с использованием индекса периферического сопротивления сосудов (ИПС). Параметры гемодинамики определялись до и после пробы с дозированной физической нагрузкой по Мартине–Кушелевскому [2] с выделением типов реакции сердечно-сосудистой системы. В группу были включены испытуемые, специально не занимающиеся спортом. Оценку концентрации оксида азота в сыворотке крови по суммарной концентрации стабильных метаболитов нитратов/нитритов проводили биохимическим методом с использованием набора «Total NO/Nitrite/Nitrate» («R&D Systems», США). Результаты выражали в мкмоль/л. Минимально определяемый уровень NO составил 0,25 мкмоль/л. Анализ плазменного содержания эндотелина-1 осуществляли методом ИФА с использованием диагностического набора «Enzyme immunoassay for the quantitative determination of human endothelin 1-21» («BIOMEDICA GRUPPE», Австрия). Результаты выражали в фмоль/мл, минимально детектируемый уровень ET-1 0,02 фмоль/мл. Рассчитывали индекс соотношения вазодилататор NO/вазоконстриктор ЭТ-1 по концентрации этих факторов в крови. ДНК выделяли из клеток крови при помощи набора «ДНК-экспресс кровь» («Литех»). Детекцию полиморфизма T-786C в гене NOS3 определяли методом полимеразной цепной реакции на базе генетической лаборатории ЦНИЛ СГМУ с использованием реактивов фирмы «Литех» (Москва).

Все результаты обследования обработаны вариационно-статистическими методами с использованием программы SPSS 17.0. Нормальность распределения количественных признаков проверялась с использованием критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение

Изучение среди обследованных лиц распределения генотипов по изучаемому полиморфизму гена NOS3 выявило следующее соотношение нормальных гомозигот (ТТ), гетерозигот (ТС) и патологических гомозигот (СС) – 42,6; 46,1 и 11,3% соответственно. Таким образом, наиболее редким генотипом является генотип СС, который, по данным ряда авторов, ассоциирован с риском развития ИБС, артериальной гипертензии и коронарораспазмом. Наблюдаемое распределение частоты выявляемости генотипов соответствовало закону равновесия Харди–Вайнберга.

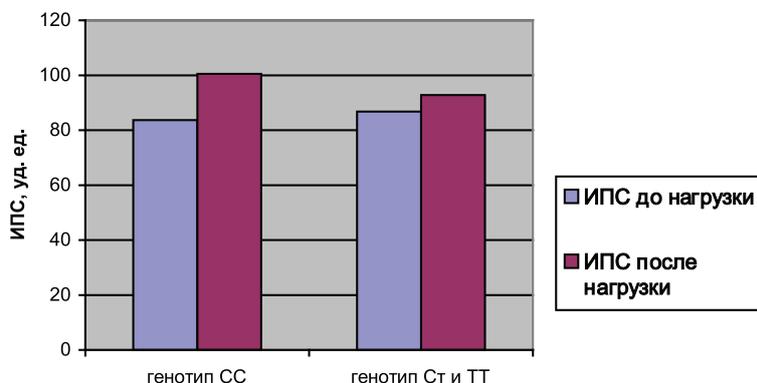
Все обследуемые были разделены на группы в зависимости от типа реакции на нагрузку. Гипертоническая реакция на нагрузку была выявлена у 23% обследуемых, нормотоническая у – 73%. Гипотоническая и дистоническая встречалась у 4%.

В группе лиц с гипертонической реакцией на нагрузку частота встречаемости генотипа СС составила 23,5%, в то время как у лиц с нормотонической реакцией – только у 6,8%. Частоты генотипов ТТ составили 32,4 и 50,5% соответственно. Гетерозиготный генотип СТ встречался у 44,1% лиц с гипертонической реакцией и у 42,7% лиц с нормотонической реакцией. Таким образом, было выявлено, что генотип СС статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ) встречается у лиц с гипертонической реакцией на нагрузку.

Для лиц с генотипом СС характерна более выраженная периферическая вазоконстрикция, о которой говорят высокие значения индекса периферического сопротивления после нагрузки ( $p < 0,05$ ) по сравнению с другими генотипами (рисунок). При анализе тонуса периферических сосудов у лиц с нормотонической реакцией статистических значимых различий в зависимости от генотипа выявлено не было (таблица), а у лиц с гипертонической реакцией наличие генотипа СС сопровождается более высоким ИПС в покое ( $p < 0,05$ ), что может повышать риск развития у них в дальнейшем сосудистых нарушений. Известно, что на напряженность механизмов регуляции давления указывает и природой СДД более чем на 15% [1]. У лиц с гипертонической реакцией СДД увеличивалось

на 23 % и составило 119,3 мм рт.ст. после нагрузки, в то время как у лиц с нормотонической наблюдался рост на 9,7% до

величины 106 мм рт.ст. Достоверных различий у лиц с разными генотипами выявлено не было.



*Показатели индекса периферического сопротивления у лиц с разными генотипами до и после нагрузки*

Значения исследуемых параметров у лиц с разными генотипами (Me (25-й; 75-й перцентили))

Параметры	Гипертоническая реакция		Нормотоническая реакция	
	Генотип СС	Генотипы СТ и ТТ	Генотип СС	Генотипы СТ и ТТ
ЭТ-1, фмоль/мл	0,7599* (0,6870; 1,0187)	0,6304 (0,4119;0,918)	0,2689* (0,1744; 0,3437)	0,3385 (0,2641;4520)
NO, мкмоль/л	22,62 (18,15; 29,57)	21,67 (18,75;26,29)	20,54 (19,04;24,70)	22,62 (19,31;30,64)
NO/ЭТ-1	24,62 (22,89; 38,78)	36,41 (20,49;51,80)	78,5 (64,2;112,6)	70,7 (47,3;107,0)
САД в покое	128 (122; 132)	130 (124;140)	132 (120;142)	130 (124;138)
ДАД в покое	78 (72; 86)	80 (74; 86)	70 (65; 71)*	78 (73; 84)
САД после нагрузки	175 (160; 194)	176 (162-185)	156 (136; 160)	156 (145; 161)
ДАД после нагрузки	90 (82; 96)	95 (90; 100)	74 (66; 85)	80 (74; 90)
ПД в покое, мм рт.ст.	48 (41; 58)	51 (44; 58)	58 (49; 79)*	51 (44; 58)
ПД после нагрузки, мм рт.ст.	90 (76; 98)*	78 (65; 90)	74 (66; 85)	75 (65; 82)
ИПС в покое, уд.ед.	100** (85,8;102,6)	91 (85,2; 97,5)	80,9 (79,7; 81,6)	85,9 (81,3; 89,5)
ИПС после нагрузки, уд.ед.	108** (105,7; 122,5)	111 (101,3; 118,5)	87,1 (82,5; 93,5)	89,6 (84,1; 96,1)

Пр и м е ч а н и е . \* – достоверные различия в зависимости от генотипа ( $p < 0,05$ ); \*\* – достоверные различия в зависимости о типа реакции ( $p < 0,05$ ).

При анализе уровня вазодиллятора оксида азота достоверных различий как в группах с разной гемодинамической реакцией, так и в группах с разными генотипами выявлено не было (см. таблицу). При этом наиболее низкий уровень NO выявлен у лиц с генотипом СС. При этом средний

уровень вазоконстриктора ЭТ-1 у лиц с генотипом СС составил 0,4857 фмоль/мл, у лиц с генотипом СТ – 0,3601 фмоль/мл, с генотипом ТТ – 0,3897 фмоль/мл. В группе лиц с гипертонической реакцией этот показатель составил 0,7599 фмоль/мл у носителей генотипа СС и 0,6304 фмоль/мл

у лиц с генотипами СТ и ТТ. В группе лиц с нормотонической реакцией он был статистически ниже как у носителей генотипа СС, так и у носителей генотипов СТ и ТТ (0,2689 и 0,3425 фмоль/мл соответственно). Таким образом, были выявлены достоверные различия в уровне эндотелина-1 у лиц с генотипом СС.

Величина индекса вазодилататор NO/вазоконстриктор ЭТ-1, которая описывает соотношение эндотелиальных факторов, у лиц с генотипом СС была в 1,4 раза ниже, чем у лиц с генотипами ТС и ТТ, что говорит о сдвиге баланса эндотелиальных факторов в сторону вазоконстрикции. При этом в группе лиц с нормотонической реакцией статистически значимых различий в зависимости от генотипа выявлено не было, в то время как в группе с гипертонической реакцией величина NO/ЭТ-1 была в 1,5 раза ниже, чем в группе с нормотонической реакцией. Таким образом, состояние вазомоторной функции эндотелия связано с полиморфизмом Т-786С гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

### Выводы

Таким образом, у лиц, имеющих гипертоническую реакцию на нагрузку, в 3,5 раза чаще встречался патологический генотип СС промотора гена эндотелиальной синтазы оксида азота. Для лиц с данным генотипом характерен более высокий тонус периферических сосудов. Таким образом, данный аллельный вариант гена можно рассматривать как фактор риска развития периферической вазоконстрикции.

Уровень вазоактивных агентов и величина индекса NO/ЭТ-1 статистически значимо отличается у лиц с патологическим генотипом СС. У данных лиц дисбаланс продукции основных вазоактивных факторов проявляется в повышении продукции эндотелина-1. Перестройка промоторной области гена eNOS, ведущая к незначительному снижению активности синтазы оксида азота, приводит не только к некоторому снижению уровня NO, но и сопровождается повышением продукции вазоконстриктора эндотелина-1.

Вероятно, полиморфизм опосредованно влияет либо на транскрипцию гена эндотелина EDN1, либо на посттранскрипционные и трансляционные механизмы синтеза ЭТ-1 [7]. Данные механизмы требуют дальнейшего детального изучения.

### Список литературы

1. Кобалова Ж.Д., Котовская Ю.В. Артериальная гипертония 2000: ключевые аспекты диагностики и дифференци-

альной диагностики, профилактики, клиники и лечения. – М., 2001. – 208 с.

2. Кушаковский М.С. Гипертоническая болезнь (эссенциальная гипертензия). – 4-е изд. – СПб.: Сотис, 1995 – 311 с.

3. Пархоменко А.Н. и др. Полиморфизм Т-786С промотора гена эндотелиальной NO-синтазы: связь с эффективностью тромболитической терапии у пациентов с острым инфарктом миокарда.// Украинський медичний часопис. –2008. – № 4(66). – С. 20–23.

4. Guiliano D., Marfella R., Verazzo G. et al. The vascular effects of L-arginine in humans: the role of endogenous insulin // J Clin Invest 1997; 99:433–438.

5. Hyndman M.E., Parsons H.G., Verma S. et al. (2002) The T-786C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. – Hypertension, 2002. – № 39(4). – P. 919–922.

6. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T-786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 2864–2870.

7. Wang X.L., Wang J. (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Molec. Genet. and Metabol., 70(4): 241–251.

### References

1. Kobalova Zh.D., Kotovskaja Ju.V. Arterial'naja gipertoniya 2000: kljucheveye aspekty diagnostiki i differencial'noj diagnostiki, profilaktiki, kliniki i lechenija. M., 2001. 208 p.

2. Kushakovskij M.S. Gipertonicheskaja bolezn' (jessencial'naja gipertenzija). 4-e izd. SPb.: Sotis, 1995 311 p.

3. Parhomenko A.N. i dr. Polimorfizm T-786S promotora gena jendotelial'noj NO-sintazy: svjaz' s jeffektivnost'ju tromboliticheskoy terapii u pacientov s ostrym infarktom miokarda.// Ukrain's'kij medichnij chasopis, 2008. no. 4(66). pp. 20–23.

4. Guiliano D., Marfella R., Verazzo G. et al. The vascular effects of L-arginine in humans: the role of endogenous insulin // J Clin Invest 1997; 99:433–438.

5. Hyndman M.E., Parsons H.G., Verma S. et al. (2002) The T-786C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. Hypertension, 2002, 39(4): 919–922.

6. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T-786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm // Circulation. 1999. Vol. 99. pp. 2864–2870.

7. Wang X.L., Wang J. (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Molec. Genet. and Metabol., 70(4): 241–251.

### Рецензенты:

Щеголева Л.С., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой экологической физиологии и биохимии Института естественных наук и биомедицины, ФГАОУ ВПО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова», г. Архангельск;

Гудков А.Б., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гигиены и медицинской экологии СГМУ, ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Министрства здравоохранения Российской Федерации, г. Архангельск.

Работа поступила в редакцию 16.12.2013.