

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.218

©Коллектив авторов

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА C774T ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В РАЗВИТИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Н.С. Фаттахов¹, М.А. Василенко¹, Д.А. Скуратовская¹, Д.И. Куликов¹, Е.В. Кириенкова¹,
П.А. Затолокин², М.А. Белецкая³, Л.С. Литвинова^{1*}

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
36041, Калининград, ул. А. Невского, 14; эл. почта: larisalitivinova@yandex.ru

²Областная клиническая больница Калининградской области,
236016, Калининград, ул. Клиническая, 74; эл. почта: info@kokb.ru

³Городская детская поликлиника №6,
236029, Калининград, ул. Горького, д.203-203а; эл. почта: gdp6@infomed39.ru

Взаимосвязь продукции оксида азота с метаболическими нарушениями и роль эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS или NOS3) при метаболическом синдроме (МС) нуждаются в глубоком изучении. Особый интерес представляет роль гена NOS3 в патогенезе МС. Изучена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма C774T гена NOS3 с риском развития МС в славянской популяции Калининградской области и связь данного полиморфного варианта с некоторыми показателями эндотелиальной дисфункции. Обследованы 128 пациентов (48 мужчин и 80 женщин в возрасте от 36 до 52 лет) с МС. Контрольную группу составили 126 здоровых доноров (60 мужчин и 66 женщин в возрасте от 30 до 40 лет). Генотипы анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Уровни нитритов в сыворотке определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции Грисса. Уровни эндотелина-1 и eNOS в сыворотке оценивали методом ELISA. Показана ассоциация аллеля T (OR=2,06; p=0,0004; CI:1,38-3,08) и генотипа CT (OR=1,97; p=0,014; CI:1,14-3,40) полиморфизма C774T гена NOS3 с риском развития МС в славянской популяции Калининградской области. Аллель C (OR=0,48; p=0,0004; CI:0,32-0,72) и гомозиготный генотип CC (OR=0,41; p=0,001; CI:0,24-0,69) полиморфизма C774T гена NOS3 ассоциированы с пониженным риском развития данного синдрома. Выявлены статистически значимые различия в сывороточных уровнях eNOS и эндотелина-1 в зависимости от генотипов CT и TT полиморфизма C774T гена NOS3 при МС.

Ключевые слова: метаболический синдром, оксид азота, эндотелиальная NO-синтаза, однонуклеотидный полиморфизм C774T

DOI 10.18097/PBMC20166204447

ВВЕДЕНИЕ

Метаболический синдром (МС) представляет собой комплекс метаболических нарушений, которые в совокупности способствуют развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний, а также ранней смертности у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. В его основе лежат инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия. Распространённость МС в общей популяции довольно высока и колеблется от 20 до 25% [1].

Ранним предиктором атеросклеротических нарушений, развивающихся при МС, является эндотелиальная дисфункция, важными маркерами которой служат эндотелин-1 и оксид азота (NO). Эндотелин-1 играет ключевую роль в вазоконстрикции, а NO регулирует функции вазомоторного тонуса и кровотока. NO синтезируется в клетках из L-аргинина при участии фермента NO-синтазы, существующего в виде трёх изоформ, которые получили своё название по типу клеток: нейрональная NO-синтаза (nNOS или NOS1), эндотелиальная NO-синтаза (eNOS или NOS3) и индуцибельная NO-синтаза (iNOS или NOS2) [2]. nNOS и eNOS постоянно присутствуют в клетках и являются конститутивными,

а iNOS вырабатывается в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку. NO, продуцируемый под действием eNOS в эндотелиальных клетках, обеспечивает вазодилатацию, препятствует агрегации тромбоцитов, а также модулирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов.

В последнее время научным сообществом ведётся активный поиск генотипов и аллелей, ассоциированных с компонентами МС. Одним из генов-кандидатов, обуславливающих повышенный генетический риск развития МС, является ген NOS3. Известно более 100 полиморфных вариантов гена NOS3, наиболее изученными являются следующие полиморфизмы: T-786C в промоторе, вариативное число tandemных повторов (VNTR) в 4 интроне и Glu298Asp в 7 экзоне [3]. В литературе крайне мало встречается данных об ассоциации полиморфизма C774T в 6 экзоне гена NOS3 с развитием заболеваний.

В связи с этим, целью нашей работы явилось исследование ассоциации полиморфизма C774T (rs1549758) гена NOS3 с риском развития МС в славянской популяции Калининградской области и установление патогенетической роли данного полиморфизма в реализации эндотелиальной дисфункции.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

В исследовании принимали участие 128 пациентов с МС, проходивших лечение в Областной клинической больнице Калининградской области (48 мужчин и 80 женщин в возрасте от 36 до 52 лет), контрольную группу составили 126 здоровых доноров (60 мужчин и 66 женщин в возрасте от 30 до 40 лет), имеющих нормальные антропометрические и биохимические показатели углеводного и липидного обменов. Все участники исследования относились к различным восточнославянским популяциям Калининградской области (русские, украинцы, белорусы). Диагноз МС устанавливали согласно критериям Международной федерации диабета [1]. Распространённость сахарного диабета 2 типа в исследуемой группе составила 32%, артериальной гипертензии – 34%. Со всеми пациентами было подписано информационное согласие на исследование.

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь. Выделение геномной ДНК из венозной крови проводили с использованием коммерческих наборов ДНК-Экстрен-1, согласно протоколу производителя (“Синтол”, Россия). Исследование генотипов осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора LightCycler 480 Instrument II (“Roche”, Швейцария) и наборов по определению полиморфизма C774T гена NOS3 (“Синтол”). Протокол ПЦР включал нагрев реакционной смеси при 95°C продолжительностью 3 мин и амплификацию в течение 50 циклов в следующем режиме: 95°C – 15 с, 65°C – 40 с. Последовательности праймеров были следующими: 5'-gag-act-tcc-gaa-tct-gga-aca-3' (прямой); 5'-cct-tct-ccc-act-ggt-ttc-ct-3' (обратный). Используемые зонды были мечены флуоресцентными красителями FAM и R6G. Работы, связанные с подбором, синтезом и апробацией праймеров и зондов были выполнены с использованием оборудования ЦКП ВНИИСБ “Биотехнология” (Центр коллективного пользования Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии) и реагентов производства “Синтол”.

Биохимические исследования уровней глюкозы, триглицеридов, общего холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП) проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-180 (“Furuno Electric Company”, Япония) с применением тест-систем DiaSys (“DiaSys Diagnostic Systems”, Германия). Для выявления нарушения толерантности к глюкозе определяли индекс HOMA-IR (homeostasis model assessment – insulin resistance), который рассчитывали по формуле: $HOMA-IR = (Инс \times Гл) / 22,5$, где Инс – инсулин плазмы натощак (мкЕд/мл); Гл – глюкоза плазмы натощак (ммоль/л).

Уровни нитритов в сыворотке как косвенного показателя продукции оксида азота определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции Грисса [4]. Содержание эндотелина-1 и eNOS в сыворотке крови оценивали методом ELISA на автоматическом анализаторе DS2

(“Dynex Technologies”, США) с использованием коммерческих наборов Endothelin 1-21 (“Biomedica”, Австрия) и ELISA Kit for Nitric Oxide Synthase (“Cloud-Clone Corp”, США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica 8.0 (США). Проверку соответствия распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди-Вайнберга, а также сравнение частот аллелей и генотипов в выборках проводили с применением критерия χ^2 . На основании данных о частотах генотипов в группах больных и здоровых доноров, рассчитывали отношение шансов (OR). Значения $OR > 1$ указывают на возможную положительную ассоциацию аллеля или генотипа с симптомокомплексом.

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные клинические и биохимические характеристики изучаемых выборок представлены в таблице.

Таблица. Клинические и биохимические характеристики выборок

Показатели	Пациенты с метаболическим синдромом (n=128)	Здоровые доноры (n=126)
Мужчины/женщины	48/80	60/66
Возраст, лет	44,2±7,8	34,9±5,1
ИМТ, кг/м ²	37,6±4*	22,9±2
Отношение объём талии/объём бедер	0,9±0,2	0,8±0,08
Систолическое давление, мм рт.ст.	132,1±12,8*	108±10,8
Диастолическое давление, мм рт.ст.	78,5±8,1*	66,8±9,4
Общий холестерин, ммоль/л	6,1±1,2	4,7±0,4
Триглицериды, ммоль/л	2,2±0,4*	0,9±0,4
ЛПВП, ммоль/л	0,9±0,2*	1,5±0,4
ЛПНП, ммоль/л	3,8±0,6*	2,7±0,4
Глюкоза, ммоль/л	7,2±1,2*	5,1±0,4
HOMA-IR	11,2(9,8-22,3)*	1,19 (0,82-1,75)

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению со здоровыми донорами. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

При генотипировании группы больных МС по полиморфному варианту *C774T* гена *NOS3*, были получены следующие частоты аллелей: 65,6% для аллеля *C* и 34,4% аллеля *T* в группе пациентов, в контрольной группе – 79,8% и 20,2%, соответственно. Выявленная в данной работе частота аллеля *C* (79,8%) близка к частотам в различных европейских популяциях и в целом соответствует данным литературы (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_search&type=rs&rs=1549758). По данным проекта Хардип, частота аллеля *C* в европейской популяции составляет 78,3%. Установлено, что в группе пациентов с МС частота аллеля *C* была ниже таковой в группе здоровых доноров ($p=0,0004$), а частота аллеля *T* при этом оказалась выше ($p=0,0004$) (рис. 1). Распределение частот генотипов полиморфизма *C774T* гена *NOS3* в группе пациентов с МС было следующим: *CC* – 42,2%, *CT* – 46,9%, *TT* – 10,9%, что соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,19$, $p=0,66$). В группе контроля частоты генотипов по данному полиморфному варианту составили: *CC* – 64,3%, *CT* – 30,9%, *TT* – 4,8%, что также соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,21$, $p=0,64$). Между группами больных МС и здоровых доноров выявлены достоверные различия в отношении распределения частот генотипов: среди пациентов с МС реже встречались гомозиготы по аллелю *C* ($p=0,001$), а частота генотипа *CT*

у больных МС была выше, чем в группе здоровых доноров ($p=0,014$) (рис. 1). Таким образом, аллель *T* ($OR=2,06$; $CI:1,38-3,08$) и генотип *CT* ($OR=1,97$; $CI:1,14-3,40$) полиморфизма *C774T* гена *NOS3* ассоциированы с повышенным риском развития МС. В то же время, аллель *C* ($OR=0,48$; $CI:0,32-0,72$) и гомозиготный *CC* генотип ($OR=0,41$; $CI:0,24-0,69$) ассоциированы с пониженным риском развития МС.

У пациентов с МС содержание эндотелина-1 в сыворотке (0,41 (0,23;1,3) фмоль/мл) было выше, чем у здоровых доноров (0,27 (0,24;0,32) фмоль/мл) (рис. 2а). Нами не было выявлено статистически значимых различий в сывороточных уровнях нитритов у больных МС (3,8 (3,23;4,98) мкмоль/л) по сравнению со здоровыми донорами (3,26 (3,02;3,62) мкмоль/л) (рис. 2б). Уровень eNOS в сыворотке больных МС (1418,44 (1113,48;1957,45) пг/мл) был выше, чем в группе здоровых доноров (865,25 (670,21;898,94) пг/мл) (рис. 2в).

Пациенты-носители генотипа *TT* имели более высокую концентрацию эндотелина-1 в сыворотке крови по сравнению со здоровыми донорами (рис. 3а). В группах больных МС и здоровых доноров не было обнаружено различий в уровнях нитритов в сыворотке крови в зависимости от генотипов исследуемого полиморфизма (рис. 3б). У пациентов с генотипом *CT* уровень eNOS в сыворотке крови был выше, чем у носителей данного генотипа в группе здоровых доноров (рис. 3в).

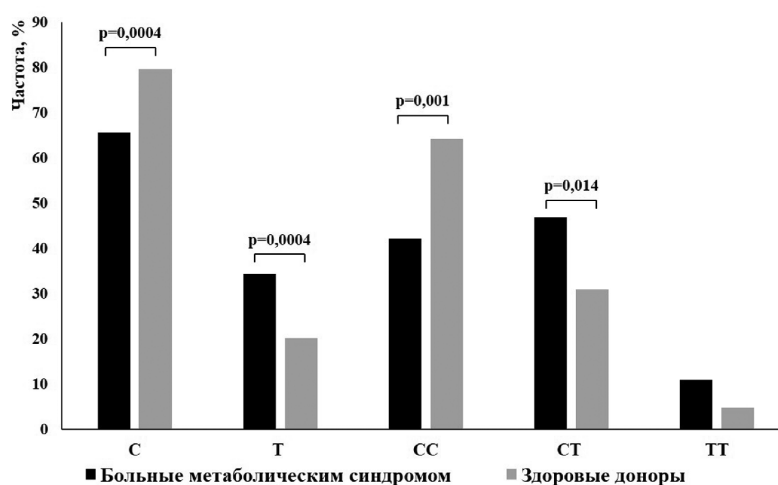


Рисунок 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма *C774T* гена *NOS3* в группах пациентов с метаболическим синдромом и здоровых доноров.

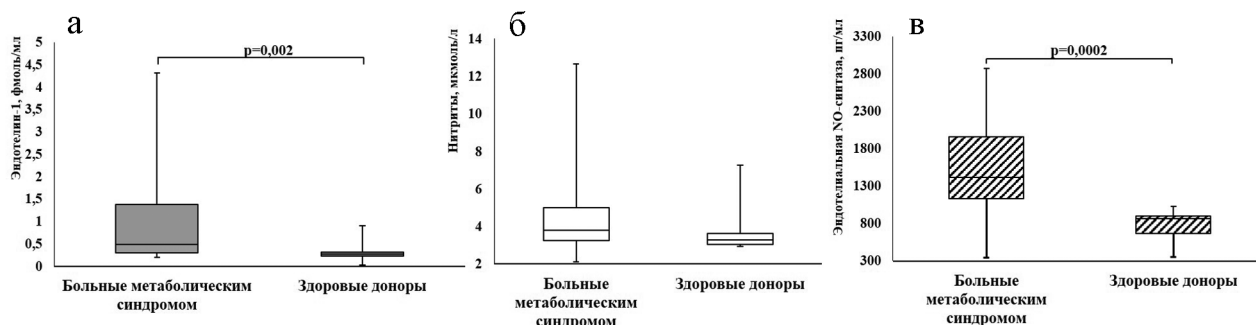


Рисунок 2. Содержание эндотелина-1 (а), нитритов (б) и эндотелиальной NO-синтазы (в) в сыворотке крови больных метаболическим синдромом и здоровых доноров.

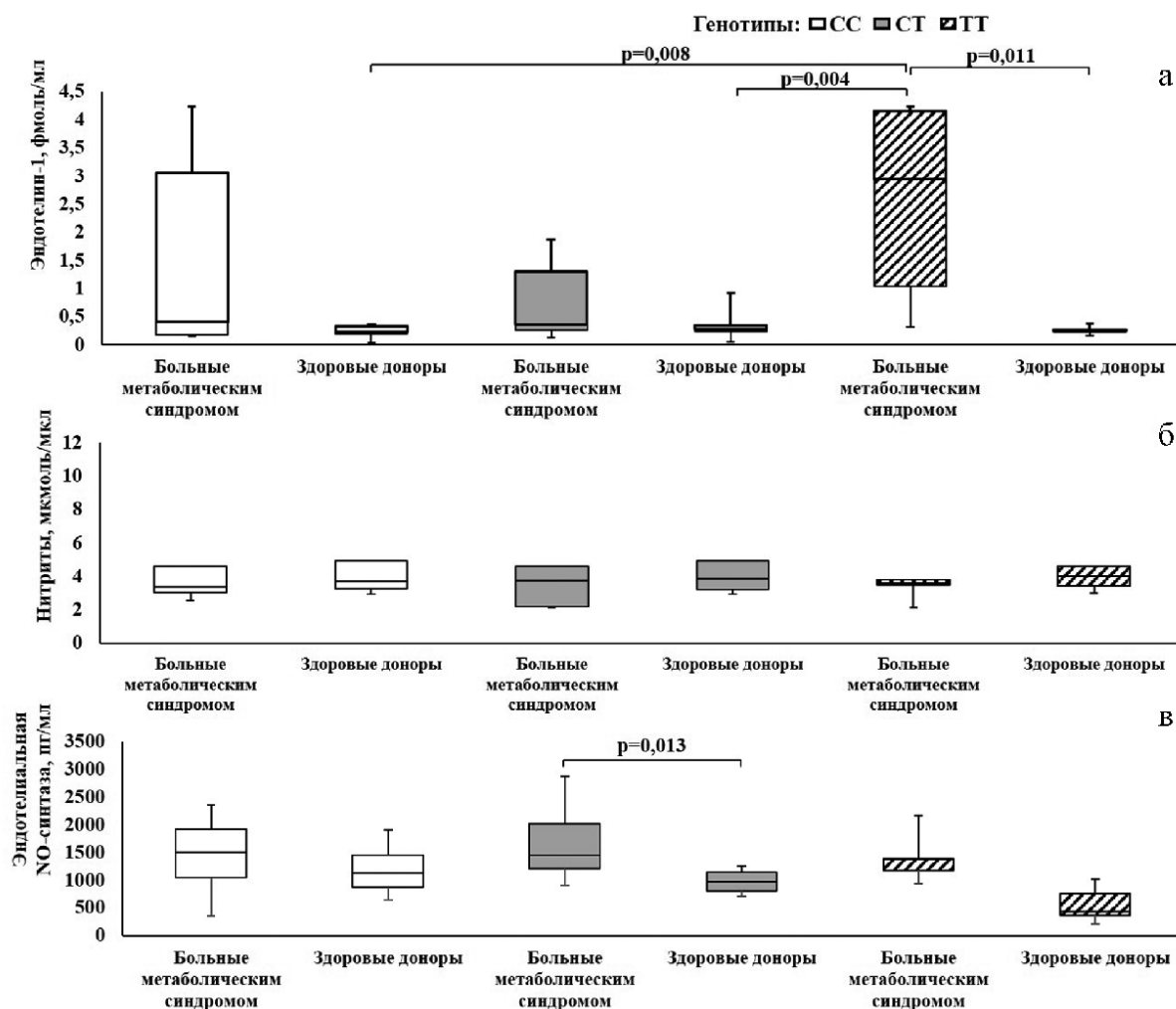


Рисунок 3. Содержание эндотелина-1 (а), нитритов (б) и эндотелиальной NO-синтазы (в) в сыворотке крови больных метаболическим синдромом и здоровых доноров в зависимости от генотипов полиморфизма *C774T* гена *NOS3*.

Полиморфизм *C774T* является “молчащим”, так как однонуклеотидная замена основания *C* на *T* приводит к изменению третьего основания кодона GAC, меняя его на кодон GAT, который также кодирует аминокислоту аспарагин. В связи с этим мы точно не можем объяснить выявленную ассоциацию данного полиморфизма с МС. Возможно, это связано с неравновесным сцеплением исследуемого маркера с функциональными полиморфизмами гена *NOS3*, например, *G894T* и *C1998G* [5]. Ранее предполагалось, что синонимичные однонуклеотидные полиморфизмы не играют существенной роли, поскольку первичная последовательность белка сохраняется. Однако результаты исследований, проведенных в течение последнего десятилетия, ставят под сомнение это предположение, демонстрируя, что синонимичные мутации также находятся под эволюционным давлением и могут быть причастны к развитию заболеваний, изменяя структуру, функции и экспрессию белков [6]. В частности, было показано, что синонимичные нуклеотидные замены могут влиять на промоторную активность, конформацию и стабильность пре-мРНК, а также влиять на фолдинг белков [6].

Полученные нами данные схожи с результатами других популяционных исследований по типу “случай-контроль”. Так, в исследовании, посвященном изучению вклада генетических факторов в развитие бронхиальной астмы, было выявлено, что гаплотип гена *NOS3*, в который входит аллель *T* полиморфизма *C774T*, связан с повышенным риском развития бронхиальной астмы [7]. В последнее время в литературе всё чаще встречаются работы, свидетельствующие об ассоциативной связи бронхиальной астмы и МС, а именно таких его компонентов, как абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия и дислипидемия. Среди возможных патогенетических механизмов, объясняющих такую взаимосвязь, ведущую роль отводят субклиническому хроническому воспалению при МС, в частности, воспалительному сигнальному каскаду, который генерирует жировая ткань. По данным других исследователей, генотип *TT* полиморфизма *C774T* гена *NOS3* ассоциирован с поздним началом тяжелой формы диабетической ретинопатии [8]. Также было установлено, что аллель *C* ассоциирован с сахарным диабетом первого типа, что было подтверждено исследованиями на популяционном и семейном уровнях [9].

Полученные в работе результаты о содержании эндотелина-1 подтверждают данные литературы об увеличении активности этого фактора при ожирении в сочетании с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2 типа [10]. Известно также, что повышенная продукция эндотелина-1 эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками сосудов ассоциирована с окислительным стрессом [10]. Нами впервые продемонстрирована взаимосвязь полиморфизма *C774T* гена *NOS3* и продукции вазоконстриктора – эндотелина-1. Другими авторами отмечено, что у детей с сахарным диабетом 1 типа, с генотипами данного полиморфизма, в которых присутствует аллель *T*, повышена поглотительная способность нейтрофилов [9]. В свою очередь, существует тесная взаимосвязь между поглотительной способностью фагоцитов и образованием активных форм кислорода, что также может приводить к формированию окислительного стресса.

В проведённом исследовании не было выявлено влияния генотипов полиморфизма *C774T* на содержание нитритов в сыворотке крови больных МС и здоровых доноров. Согласно данным научной периодики, полиморфизмы гена *NOS3*, объединённые в определённые гаплотипы, модулируют продукцию NO [11].

В литературе представлены противоречивые данные об уровнях метаболитов NO в сыворотке крови у больных МС. В большинстве научных работ продемонстрировано повышенное содержание нитритов и нитратов при МС [12]. Следует подчеркнуть, что некоторые авторы также отмечают положительную ассоциацию между концентрацией метаболитов NO и количеством компонентов МС [13]. Намного реже встречаются работы, в которых сообщается о сниженной продукции NO при МС и СД [14].

Разночтения, существующие в литературе, по-видимому, связаны с различиями клинических характеристик больных МС, разными методологическими подходами к оценке продукции NO, а также различиями в активностях разных изоформ NO-синтаз. Высвобождение большого количества NO при МС, прежде всего, связано с его избыточной продукцией макрофагами, нейтрофилами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками, в которых происходит активация iNOS в ответ на провоспалительные стимулы [16]. Повышенная продукция такого NO может приводить к образованию других активных форм азота с большим цитотоксическим потенциалом, таких как пероксинитрит [17]. Так, на животных моделях, одними авторами было показано, что повышенная экспрессия iNOS может способствовать индуцированному ожирением инсулинорезистентности [18], тогда как другими было продемонстрировано, что нокаут гена *iNOS* не предотвращает развитие артериальной гипертензии и окислительного стресса [19]. Интересен тот факт, что индуцированная цитокинами эндогенная экспрессия и активность iNOS может играть роль

в поддержании функции эндотелия и предотвращении окислительного стресса [20].

В связи с тем, что в нашей работе мы выявили повышенное содержание тотальной eNOS в сыворотке крови, но при этом не было детектировано повышения продукции NO у таких пациентов, мы можем сделать вывод о связи наблюдаемого явления с несколькими факторами. Одними из факторов могут быть наличие ингибиторов синтеза NO, снижение биодоступности L-аргинина. При отсутствии или сниженной биодоступности тетрагидробиоптерина, важного кофактора eNOS, перенос электронов с редуктазного на оксигеназный домен фермента, необходимый для связывания eNOS с L-аргинином, может стать “разобщённым” и приводить к генерации супероксид-аниона [21]. Кроме этого, инсулинорезистентность и висцеральное ожирение, две ключевые особенности МС, способствуют снижению биодоступности NO [22]. При этом изменения в передаче сигнала по PI3K-Akt сигнальному пути могут приводить к уменьшенному фосфорилированию серина eNOS в позиции Ser1177, необходимого для продукции NO данной изоформой [23]. Эффектами в данном случае будут вазоконстрикция, агрегация и адгезия тромбоцитов, лейкоцитов, пролиферация гладкомышечных клеток. Однако мы не наблюдали снижения базальной продукции NO у больных, возможно, ввиду активации iNOS на фоне субклинического хронического воспаления при МС.

Ранее в статьях уже сообщалось о том, между уровнями NO и экспрессией eNOS в эндотелиальных клетках существует механизм отрицательной обратной связи [24]. Соответственно, сниженная биодоступность NO может быть триггером повышенной экспрессии eNOS. Так, в исследовании с клеточными культурами эндотелиоцитов ранее было показано, что при повышенных уровнях мРНК гена *NOS3* и общего белка eNOS, то есть фосфорилированной и нефосфорилированной форм при сахарном диабете детектируется сниженная биодоступность сосудистого NO [25]. Обнаруженная в проведенном нами исследовании взаимосвязь повышенных уровней eNOS и генотипа *CT* полиморфизма *C774T* гена *NOS3* у больных МС косвенно может свидетельствовать о негативном влиянии этого генотипа повышенного риска на снижение биодоступности продуцируемого NO.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что полиморфизм *C774T* гена *NOS3* вовлечён в патогенез эндотелиальной дисфункции при МС. Выявление данного полиморфизма у лиц славянской популяции Калининградской области, безусловно, имеет практический интерес, поскольку, он может служить в качестве одного из маркеров генетического риска МС. Оценка взаимосвязи между продукцией NO, экспрессией iNOS и eNOS, а также активностями данных изоформ в клетках стенок сосудов требуют дальнейшего детального изучения.

Исследование выполнено в рамках субсидии на выполнение государственной работы “Организация проведения научных исследований №603”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. (2006) *Diabet. Med.*, **23**, 469-480.
2. Bredt D.S. (1999) *Free Radic. Res.*, **31**(6), 577-596.
3. Tanus-Santos J.E., Desai M., Flockhart D.A. (2001) *Pharmacogenetics*, **11**(8), 719-725.
4. Moshage H., Kok B., Huizenga J.R., Jansen P.L. (1995) *Clin. Chem.*, **41**(6 Pt 1), 892-896.
5. Novoradovsky A., Brantly M.L., Waclawiw M.A., Chaudhary P.P., Ihara H., Qi L., Eissa N.T., Barnes P.M., Gabriele K.M., Ehrmantraut M.E., Rogliani P., Moss J. (1999) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **20**(3), 441-447.
6. Hunt R., Sauna Z.E., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Kimchi-Sarfaty C. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **578**, 23-39.
7. Holla L.I., Jurajda M., Pohunek P., Znojil V. (2008) *Hum. Immunol.*, **69**(4-5), 306-313.
8. Taverna M.J., Elgrably F., Selmi H., Selam J.L., Slama G. (2005) *Nitric Oxide*, **13**(1), 88-92.
9. Кондратьева Е.И., Пузырев В.П., Тарасенко Н.В., Косьянкова Т.В., Милованова Т.Д., Гулиева Н.Г., Гудкова Т.К. (2007) *Сахарный диабет*, **2**, 9-13.
10. Ruef J., Moser M., Kubler W., Bode C. (2001) *Cardiovasc. Pathol.*, **10**(6), 311-315.
11. Metzger I.F., Sertório J.T., Tanus-Santos J.E. (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **43**(6), 987-992.
12. Caimi G., Lo Presti R., Montana M., Noto D., Canino B., Aversa M.R., Hopps E. (2014) *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2014**, 824756. DOI: 10.1155/2014/824756.
13. Ueyama J., Kondo T., Imai R., Kimata A., Yamamoto K., Suzuki K., Inoue T., Ito Y., Miyamoto K., Hasegawa T. et al. (2008) *Environ. Health Prev. Med.*, **13**(1), 36-42.
14. Tessari P., Cecchet D., Cosma A., Vettore M., Coracina A., Millioni R., Iori E., Puricelli L., Avogaro A., Vedovato M. (2010) *Diabetes*, **59**(9), 2152-2159.
15. Avogaro A., Toffolo G., Kiwanuka E., de Kreutzenberg S.V., Tessari P., Cobelli C. (2003) *Diabetes*, **52**(3), 795-802.
16. Weinberg J.B. (1998) *Molecular Medicine*, **4**(9), 557-591.
17. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. (2007) *Physiol. Rev.*, **87**(1), 315-424.
18. Tsuchiya K., Sakai H., Suzuki N., Iwashima F., Yoshimoto T., Shichiri M., Hirata Y. (2007) *Endocrinology*, **148**, 4548-4556.
19. Noronha B.T., Li J.M., Wheatcroft S.B., Shah A.M., Kearney M.T. (2005) *Diabetes*, **54**, 1082-1089.
20. Hemmrich K., Suschek C.V., Lerzynski G., Kolb-Bachofen V. (2003) *J. Appl. Physiol.*, **95**, 1937-1946.
21. Cosentino F., Patton S., d'Uscio L.V., Werner E.R., Werner-Felmayer G., Moreau P., Malinski T., Lüscher T.F. (1998) *J. Clin. Invest.*, **101**, 1530-1537.
22. Clapp B.R., Hingorani A.D., Kharbanda R.K., Mohamed-Ali V., Stephens J.W., Vallance P., MacAllister R.J. (2004) *Cardiovasc. Res.*, **64**(1), 172-178.
23. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. (1999) *Nature*, **399**(6736), 601-605.
24. Buga G.M., Griscavage J.M., Rogers N.E., Ignarro L.J. (1993) *Circ. Res.*, **73**, 808-812.
25. Hink U., Li H., Mollnau H., Oelze M., Matheis E., Hartmann M., Skatchkov M., Thaiss F., Stahl R.A., Warnholtz A. et al. (2001) *Circ. Res.*, **88**(2), E14-22.

Поступила: 16. 02. 2015.
Принята к печати: 10. 06. 2015.

PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF C774T SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIAL NO SYNTHASE GENE IN THE DEVELOPMENT OF METABOLIC SYNDROME

N.S. Fattakhov¹, M.A. Vasilenko¹, D.A. Skuratovskaya¹, D.I. Kulikov¹, E.V. Kirienkova¹,
P.A. Zatolokin², M.A. Beletskaya³, L.S. Litvinova¹

¹Immanuel Kant Baltic Federal University,

14 Alexandra Nevskogo str., Kaliningrad, 36041 Russia; e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

²Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region,

74 Klinicheskaya str., Kaliningrad, 236016 Russia; e-mail: info@kokb.ru

³Municipal Children's Hospital No. 6,

203-203a Gorkogo str., Kaliningrad, 236029 Russia; e-mail: gdp6@infomed39.ru

The relationship between nitric oxide production and metabolic disorders and the role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS or NOS3) in metabolic syndrome (MS) remain poorly understood and need deeper investigation. In this context the role of the NOS3 gene in pathogenesis of MS is of special interest. The aim of the study was to investigate association of NOS3 single nucleotide polymorphism C774T with risk of MS in the Slavic population of the Kaliningrad region and the relationship of this polymorphic variant with some parameters of endothelial dysfunction. The study included 128 patients (48 men and 80 women aged from 36 to 52 years) with MS. The control group consisted of 126 healthy volunteers (60 men and 66 women aged from 30 to 40 years). Genotyping was performed by real-time PCR. Serum nitrite levels were determined spectrophotometrically by the Griess method. Serum levels of endothelin-1 and eNOS were evaluated by ELISA. The study has shown association of T allele (OR=2.06; p=0.0004; CI: 1.38-3.08) and CT genotype (OR=1.97; p=0.014; CI: 1.14-3.40) C774T polymorphism of the NOS3 gene with risk of MS in the Slavic population of the Kaliningrad region. Allele C (OR=0.48; p=0.0004; CI: 0.32-0.72) and homozygous CC genotype (OR=0.41; p=0.001; CI: 0.24-0.69) C774T polymorphism of the NOS3 gene were associated with reduced risk of the development of MS. Significant differences in serum levels of eNOS and endothelin-1 depended on the CT and TT genotypes of C774T polymorphism of the NOS3 gene in MS.

Key words: metabolic syndrome, nitric oxide, endothelial NO synthase, C774T single nucleotide polymorphism