

ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА (*NOS3*) ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ

Щёктова А. П.¹, Кривцов А. В.², Булатова И. А.¹, Загородских Е. Б.¹

¹ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера Минздравсоцразвития России, Пермь, Россия (614090, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26) psmalf@ru

²ФБУН Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь

Обследовано 40 больных хроническим вирусным гепатитом С, 15 больных циррозом печени, 13 практически здоровых лиц. Оценивали маркеры эндотелиальной дисфункции, гиалуроновую кислоту методом иммуноферментного анализа и полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*) по анализу кривых плавления, полученных при проведении ПЦР.

Эндотелиальная дисфункция более выражена при циррозе по сравнению с гепатитом. Эндотелиальная дисфункция и фиброз взаимосвязаны: при заболеваниях печени выявлены прямые корреляции гиалуроновой кислоты с эндотелином-1 и васкулоэндотелиальным фактором роста, при гепатите, кроме этого, обратная корреляция с оксидом азота. У популяции больных с заболеваниями печени выявлено снижение частоты протективного аллеля G и увеличение частоты аллеля риска T до 0,45 (полиморфизм 894G>T) преимущественно за счет гетерозиготного носительства.

Неблагоприятные аллельные варианты гена могут выступать как факторы наследственного риска развития эндотелиальной дисфункции при заболеваниях печени, а частота неблагоприятных вариантов гена eNOS связана с тяжестью эндотелиальной дисфункции и поражения печени при гепатите и циррозе печени.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, полиморфизм гена *NOS3*, хронический гепатит, цирроз печени.

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND POLYMORPHISM OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (*NOS3*) GENE IN CHRONIC HEPATIC DISEASES

Shchekotova A. P.¹, Krivtsov A. V.², Bulatova I. A.¹, Zagorodskikh E. B.¹

¹SBEE HPE Perm State Academy of Medicine named after Academician E.A. Wagner, Perm, Russia (614090, Perm Petropavlovskaya, 26), psmalf@ru

²Federal Research Center of Medicoprophyllactic Technologies of Public Health Risk Control

40 patients with chronic viral hepatitis C, 15 patients with hepatic cirrhosis, 13 practically healthy persons were examined. Endothelial dysfunction markers, hyaluronic acid were assessed with immunoferrmental analysis method and polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*) gene – by analyzing melting curves obtained with PCR.

Endothelial dysfunction was more marked in cirrhosis compared to hepatitis. Endothelial dysfunction and fibrosis are interconnected: direct correlations hyaluronic acid with endothelin-1 and vasculoendothelial growth factor are detected in hepatic diseases and invert correlation with nitric oxide in hepatitis. In the population of patients with hepatic diseases decrease in protective allele G frequency and increase in risk allele T frequency up to 0,45 (polymorphism 894G>T), mostly at the expense of heterozygous carrier.

Unfavourable allele variants of gene can be hereditary risk factors of developing endothelial dysfunction in hepatic diseases, but frequency of unfavourable gene eNOS variants is connected with severity of endothelial dysfunction and liver lesion in hepatitis and hepatic cirrhosis.

Keywords: endothelial dysfunction, *NOS3* gene polymorphism, chronic hepatitis, hepatic cirrhosis.

Введение

Расшифровка механизмов поражения печени при хронических вирусных заболеваниях печени (ХВЗП) является актуальной задачей гепатологии. Известно, что эндотелиальная дисфункция (ЭД) является предиктором и неизменным компонентом патогенеза многих заболеваний. Под ЭД понимают дисбаланс между веществами, вырабатываемыми

эндотелием. При «нормальной» функции эндотелия баланс всегда сдвинут в сторону поддержания вазодилатации, ингибиции ангиогенеза, антитромботического, противовоспалительного, антиоксидантного эффектов [6]. Наиболее важные маркеры ЭД – оксид азота (nitric oxide, NO) и эндотелин-1 (endothelin-1, Et-1), дисбаланс которых влияет на кровообращение в печени [4]. При заболеваниях печени отмечается вовлечение эндотелия в формирование ответной реакции на репликацию вируса. Ряд механизмов реализуется за счет синтеза NO, который обеспечивает защитные свойства эндотелия, связанные с элиминацией возбудителя, но, кроме того, обуславливает и ряд патологических реакций, связанных с расширением сосудов и их экспансией в ткань печени. Так как защитная функция NO при вирусных заболеваниях не является определяющей, основное развитие патологического процесса обуславливает его иммунорегуляторное и сосудисто-пролиферативное действие [4]. Такой маркер ЭД как Et-1 активирует звездчатые клетки печени, что способствует развитию фиброза в органе, уровень которого можно оценивать по концентрации гиалуроновой кислоты (hyaluronik acid, HA) в сыворотке крови [9]. На фоне поражения эндотелия также усиливается выработка васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), который стимулирует неоангиогенез и ведет к перестройке сосудистой архитектоники, в том числе при патологии печени [2].

Большой интерес для изучения ЭД представляет эндотелиальная NO-синтаза (eNOS). Эта изоформа фермента стабильно экспрессируется в клетках эндотелия сосудов и задействована в важных физиологических процессах, в частности, в вазодилатации, регуляции иммунного ответа [4]. Уровень экспрессии NO-синтазы ассоциируется с различными заболеваниями, такими как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, гестоз, атеросклероз, диабетическая нефропатия при сахарном диабете [1, 3, 7, 8]. В то же время, ген, кодирующий eNOS, обладает аллельным полиморфизмом, который ассоциирован с различной активностью выработки NO [1]. В гене *NOS3* выявлено несколько полиморфных сайтов. Интерес представляют полиморфизм 4a/4b в 5-ом интроне, полиморфизм промоторной области гена – 786T>C и структурная замена в 7 экзоне 894G>T. Многочисленные исследования посвящены полиморфизму 894G>T (rs1799983): выявлена ассоциация минорного аллеля T894 с инфарктом миокарда и гипертензией [5, 8]. Таким образом, при патологии значимыми являются частоты протективного аллеля G и минорного аллеля риска T. Распространенность аллеля T894 в смешанной североамериканской популяции составляет 24 % [10]. В отношении полиморфизма гена *NOS3* выявлены гендерные различия в распространенности аллелей: риск возникновения патологического процесса у женщин выше в 4 раза [5]. Изменения в аминокислотной последовательности фермента eNOS могут приводить к снижению его каталитической

активности и, как итог, низкой продукции NO в тех ситуациях, когда локально необходимо его участие в реализации защитных или регуляторных механизмов. Напротив, другие аллельные варианты гена могут приводить к развитию патологических процессов в других ситуациях, когда высокая каталитическая активность обуславливает высокую концентрацию NO и проявление его неблагоприятных эффектов, в частности, мутагенного и цитотоксического [6].

Цель исследования – изучение маркеров поражения эндотелия, фиброза и полиморфизма гена *NOS3* у больных с хроническим гепатитом (ХГ) и циррозом печени (ЦП).

Материалы и методы. Обследовано 40 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С в фазе реактивации, мужчин – 25, женщин – 15. Вторую группу составили 15 пациентов ЦП вирусной этиологии в стадии декомпенсации, из них 8 мужчин, 7 женщин. Критерии исключения – патологические состояния, сопровождающиеся ЭД: сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, ИБС, артериальная гипертензия, аритмии, инсульты в анамнезе), сахарный диабет, бронхиальная астма, онкологические заболевания, беременность. Средний возраст больных ХГ составил $38,8 \pm 14,5$ лет, при ЦП - $49,8 \pm 12,2$ года. Контрольная группа состояла из 13 практически здоровых лиц, не имеющих в анамнезе заболеваний печени, возраст – $32,8 \pm 8,3$ года. В предыдущих исследованиях нами было показано отсутствие взаимосвязи между ЭД, возрастом и полом при ХГ и ЦП. В качестве группы сравнения для оценки полиморфизма гена *NOS3* обследовано 15 пациентов с острым панкреатитом.

Изучались тесты оценки функционального состояния эндотелия в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА): уровень общего NO (набор SYSTEMS, США), Et-1 (набор BIOMEDICA GRUPPE, США), VEGF (набор Вектор-Бест, г. Новосибирск). Определяли НА в сыворотке крови с помощью набора BCM Diagnostics (США) методом ИФА. Полиморфизм гена *NOS3* исследовали на приборе «ДТ96» с помощью набора «ДНК-технология» (Москва). Результаты обработаны при помощи пакета программ Statistica 6.0 Microsoft, Office Excell 2003, BIOSTAT. Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Для описания полученных количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовалось среднее арифметическое (M) \pm одно среднее квадратичное стандартное отклонение (σ). Для корреляционного анализа применялся расчет средних величин показателей корреляционных отношений для количественных признаков по Пирсону (r). Различия между выборками считались статистически достоверными при значении для $p < 0,05$. Для оценки диагностической чувствительности и диагностической специфичности лабораторных тестов и возможности с их помощью дифференциации ХГ и ЦП были построены кумулятивные кривые, найдены точки разделения показателей у

обследованных групп пациентов, определена диагностическая эффективность тестов (Власов В.В., 2001).

Результаты исследования и обсуждение. У пациентов с хроническими заболеваниями печени были выявлены лабораторные признаки поражения эндотелия. Сравнительный анализ показателей функционального состояния эндотелия и маркеров фиброза при хронических диффузных заболеваниях печени представлен в табл. 1. У больных выявлено достоверное снижение по сравнению со здоровыми – концентрации в крови высокоспецифичного маркера ЭД – NO, более выраженное у пациентов с ЦП: $13,07 \pm 4,52$ мкмоль/л. При ЦП также отмечено значимое увеличение Et-1 до $1,1 \pm 0,5$ фмоль/л, что свидетельствует о нарушении кровообращения в печени за счет преобладания вазоконстрикции. В обеих группах повышены показатели VEGF, относящегося собственно к маркерам повреждения эндотелия, что свидетельствует об активации неоангиогенеза в печени на фоне ХВЗП. При этом как между здоровыми и группами пациентов, так и между больными ХГ и ЦП выявлены достоверные различия. Таким образом, ЭД закономерно нарастает при прогрессировании ХГ и формировании ЦП.

Концентрация прямого маркера фиброза печени НА была достоверно повышена при ХВЗП, при этом у пациентов с ЦП медиана пятикратно превышала концентрацию гиалуроната по сравнению с гепатитом. Между группами пациентов отмечены достоверные различия ($p=0,00001$) (табл. 1). Таким образом, выраженность маркеров ЭД и фиброза в сыворотке крови при ЦП существенно выше, чем у здоровых лиц и у больных ХГ.

Таблица 1

Лабораторные показатели функционального состояния эндотелия и гиалуроновой кислоты у больных ХГ, ЦП и в группе практически здоровых лиц

Показатели	Здоровые (n=13)	ХГС (n=40)	ЦП (n=15)	p		
				p1	p2	p3
NO, мкмоль/л	$29,43 \pm 3,34$	$18,7 \pm 3,02$	$13,07 \pm 4,52$	<0,001	<0,001	0,01
Et-1, фмоль/л	$0,46 \pm 0,09$	$0,62 \pm 0,20$	$1,1 \pm 0,5$	0,1	0,007	0,005
VEGF, пг/мл	$158,7 \pm 72,8$	$249,5 \pm 94,5$	$375,0 \pm 116,6$	0,01	<0,001	<0,001
НА, нг/мл	$17,8 \pm 17,0$	$70,38 \pm 52,8$	$506,5 \pm 388,2$	0,02	0,007	<0,001

Примечание: p1 – значимость различий в группе контроля и у пациентов с ХГ; p2 – значимость различий в группе контроля и у пациентов с ЦП; p3 – значимость различий в группах больных ХГ и ЦП.

Установлено, что маркеры ЭД и фиброза печени взаимосвязаны (табл. 2). При ХГ выявлена обратная корреляция НА и NO и прямые взаимосвязи НА с Et-1 и VEGF при этом p1 составляет 0,01, 0,02, 0,01 соответственно. То есть, чем интенсивнее происходит

выработка грубой соединительной ткани в печени при хроническом вирусном поражении этого органа, тем меньше выработка в эндотелии NO и выше синтез Et-1 и VEGF.

Таблица 2

Корреляции показателей НА и состояния эндотелия при ХГ и ЦП

Показатели	ХГ		ЦП	
	r1	p1	r2	p2
НА и NO	-0,85	0,01	-0,1	0,7
НА и Et-1	0,74	0,02	0,96	0,0004
НА и VEGF	0,5	0,01	0,8	0,02

Примечание: r1 – взаимосвязь показателей в группе больных ХГ; r2 - взаимосвязь показателей в группе больных ЦП; p1 – значимость корреляции в группе пациентов с ХГ; p2 – значимость корреляции в группе пациентов с ЦП.

Эти данные свидетельствуют об ассоциации фиброза с выраженностью ЭД еще на стадии ХГ. При ЦП нами были выявлены сильные взаимосвязи НА с Et-1 ($p_2=0,0004$) и VEGF ($p_2=0,02$), что согласуется с литературными данными о влиянии ЭД и, в частности, Et-1 на развитие фиброза в печени [9].

Для изучения возможностей дифференциальной диагностики ХГ и ЦП с помощью маркеров ЭД проведено исследование операционных характеристик исследованных тестов в сравнении с общепринятым тестом фиброза – НА (табл. 3).

Таблица 3

Операционные характеристики показателей состояния эндотелия и фиброза печени при ХГ и ЦП

Тесты	Точка разделения	Диагностическая чувствительность, %	Диагностическая специфичность, %	Диагностическая эффективность, %
NO, мкмоль/л	17,0	80	87	86
Et-1, фмоль/л	0,8	73	88	83
VEGF, пг/мл	260,0	83	69	79
НА, нг/мл	120,0	92	76	82

При точке разделения 120 нг/мл общая эффективность теста определения НА для стратификации ХГ и ЦП составила 82 %. Эффективность показателей состояния эндотелия для дифференциальной диагностики гепатита и цирроза колебалась от 79 до 86 %, при этом наиболее чувствительным тестом для этих целей оказался VEGF, а максимально специфичным – Et-1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что показатели ЭД могут служить непрямыми маркерами фиброза печени.

При исследовании полиморфизма гена *NOS3* у пациентов с ХВЗП и в группе сравнения получены следующие результаты (табл. 4). Патологическая гомозигота с заменой гуанина на тимин – 894G>T (rs1799983) отмечена у 19 % пациентов, что превышает встречаемость в группе сравнения (7 %) и в смешанной популяции (7 %) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss342250109). В целом распространенность генотипов и аллелей гена *NOS3* в группе сравнения практически не отличалась от смешанной североамериканской популяции, хотя из-за небольшого числа наблюдений достоверных отличий между пациентами с заболеваниями печени и острым панкреатитом не получено. Патологическая гомозигота при ХГ имела место в 21 %, что чаще, чем смешанной популяции: $z=2,565$, $p=0,01$. Гетерозигота (G894T) выявлена у 52 % с заболеваниями печени, что достоверно отличалось от смешанной популяции: $z=2,254$, $p=0,024$.

Таблица 4.

Распространенность генотипов и аллелей полиморфизма гена *NOS3* (T894G)

Заболевания	Генотипы			Аллели	
	T/T	G/T	G/G	T	G
ХВЗП (n=41)	19%	52%	29%	45%	55%
ЦП (n=15)	17 %	67 %	16 %	50 %	50 %
ХГ (n=29)	21 %	38 %	41 %	40 %	60 %
Острый панкреатит (n=15)	7%	40%	53%	27%	73%
Смешанная популяция (n=4480)	7 %	34 %	59 %	24 %	76 %

Чаще гетерозигота выявлялась и при ЦП: $z=2,419$, $p=0,016$. Нормальная гомозигота на фоне ЦП отмечена реже: $z=3,116$, $p=0,002$. Это связано с тем, что у популяции больных ХВЗП выявлено снижение частоты протективного аллеля G и увеличение частоты аллеля риска T до 0,45, что достоверно выше его распространенности в смешанной (0,24) популяции $z=2,943$, $p=0,003$. Аналогичные данные по генетическому полиморфизму получены нами для больных ХГ – распространенность патологического аллеля T составила в ней 40 %. В популяции больных с ЦП выявлено увеличение частоты патологического аллеля: аллель T у больных ЦП выявлялась у 50 %, в смешанной популяции – 24 %, $z=2,049$, $p=0,041$. Выявленные нами особенности генетического полиморфизма *NOS3* у пациентов с ХГ и ЦП позволяют нам рассматривать минорный аллель T как аллель риска в развитии хронических заболеваний печени, а максимальное его проявление следует ожидать у гомозигот TT. При относительном преобладании в смешанной популяции людей с генотипом G/G (59 %) в популяции пациентов с патологией печени это соотношение меняется в пользу генотипа G/T (52 %), причем гетерозиготное носительство аллеля T в большей степени встречается в группе больных ЦП. В популяции больных ХВЗП в целом

выявлено достоверное увеличение патологического аллеля T, это говорит об ассоциации этого аллеля с предрасположенностью к формированию у пациентов хронических заболеваний печени. При этом, вероятно, не имеет значение одна или две копии аллеля имеется у пациента. В любом случае перестройка промоторной области гена ведет к снижению продукции фермента eNOS и его общей ферментативной активности и, в итоге, к дефициту выработки NO в эндотелии с развитием ЭД, что может способствовать хронизации воспалительного процесса в печени. ЭД, в свою очередь, сопровождается активацией выработки соединительной ткани и неоангиогенезом с прогрессированием поражения печени вплоть до развития цирроза.

У пациентов с ЦП тяжесть ЭД больше по сравнению с больными ХГ, достоверно чаще также встречается минорный аллель T. Выявленные генетические особенности подтверждают предрасположенность к нарушению синтеза в эндотелии eNOS при ХВЗП, особенно у больных с ЦП, и могут использоваться в качестве теста прогнозирования прогрессирующего течения вирусного поражения печени с формированием цирроза.

Заключение. Выраженность поражения эндотелия при хронических заболеваниях печени зависит от тяжести патологического процесса: более значимые изменения выявлены при ЦП по сравнению с ХГ. Патогенетическое участие ЭД в прогрессировании поражения печени подтверждается корреляциями маркеров ЭД и прямого теста фиброза печени – гиалуроновой кислоты. Выявленные особенности генетического полиморфизма *NOS3* у пациентов с поражением печени, а именно, увеличение частоты патологического аллеля T по сравнению с группой сравнения, особенно при ЦП, позволяет предположить вовлеченность этого гена в формирование тяжелой патологии печени. Неблагоприятные в таких случаях аллельные варианты гена могут выступать как факторы наследственного риска развития ЭД при заболеваниях печени, а частота неблагоприятных вариантов гена eNOS связана с тяжестью ЭД и поражения печени при ХГ и ЦП.

Список литературы

1. Best L.G., Nadeau M., Bercier S. Genetic variants, endothelial function, and risk of preeclampsia among american indians / *L.G. Best, M. Nadeau, S. Bercier* // *Hypertens Pregnancy*. 2012. 31(1):1-10.
2. Le Couter J., Moritz D. R., Phillips G. L. et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGF / *J. Le Couter, D.R. Moritz, G.L. Phillips et al.* // *Science* 2003. 299: 890 – 893.
3. Grøntved A., Andersen L. B., Franks P. W. et al. NOS3 variants, physical activity, and blood pressure in the European Youth Heart Study / *A. Grøntved, L.B. Andersen, P.W. Franks et al.* // *Am J Hypertens*. 2011 Apr; 24(4):444-50.

4. Hon W. M., Lee W. H., Khoo H. E. Nitric oxide in liver diseases / *W.M. Hon, W.H. Lee, H.E. Khoo* // *Annals of the New York Academy of sciences* 2002. 962: 278 – 295.
5. Li J., Cun Y., Tang W. R. et al. Association of eNOS gene polymorphisms with essential hypertension in the Han population in southwestern China. / *J. Li, Y. Cun, W.R. Tang et al.* // *Genet Mol Res.* 2011 Sep 27.10(3):2202-12.
6. Meigs J. B., Rifai N. Biomarkers of endothelial dysfunction / *J.B. Meigs, N. Rifai* // *JAMA* 2004. 297: 1978 – 1986.
7. Möllsten A., Lajer M., Jorsal A., Tarnow L. The endothelial nitric oxide synthase gene and risk of diabetic nephropathy and development of cardiovascular disease in type 1 diabetes. / *A. Möllsten, M. Lajer, A. Jorsal, L. Tarnow* // *Mol Genet Metab.* 2009. May. 97(1):80-4.
8. Rai H., Fitt J., Sharma A. K. et al. Lack of association between Glu298Asp polymorphism and coronary artery disease in North Indians. / *H. Rai, J. Fitt, A.K. Sharma et al.* // *Mol Biol Rep.* 2011. Dec 30.
9. Wynn A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / *A. Wynn* // *J Pathol.* 2008. 2(14). 199–210.

Рецензенты:

Устинова Ольга Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности Пермского государственного национального исследовательского университета, г. Пермь.

Юшкова Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пермской государственной фармацевтической академии, г. Пермь.