



Обухович А.Р.¹ ✉, Иоскевич Н.Н.¹, Гладкий М.Л.¹, Бабенко А.С.²

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Беларусь

Полиморфизмы генов фолатного цикла, эндотелина-1, синтазы оксида азота и остеопротегерина при облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей, сочетающемся с сахарным диабетом 2-го типа

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Обухович А.Р. – концепция и дизайн исследования, сбор и интерпретация данных, подготовка статьи; Иоскевич Н.Н. – критический пересмотр и редактирование статьи, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования; Гладкий М.Л. – сбор и анализ данных; Бабенко А.С. – сбор, анализ и интерпретация данных.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках гранта БРФФИ «Наука М-23» № М23М-098 от 02.05.2023 (гос. регистрация № 20231274) по теме «Роль остеопротегерина, эндотелина-1 и полиморфизма их генов в развитии хронической критической ишемии нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе, сочетающемся с сахарным диабетом, и исходах артериальных реконструкций». Финансовой поддержки со стороны компаний – производителей лекарственных препаратов авторы не получали.

Подана: 02.02.2025

Принята: 11.04.2025

Контакты: anneta.panasjuk@gmail.com

Резюме

Цель. Изучить распределение генотипов генов фолатного обмена (метилентетрагидрофолатредуктазы – MTHFR A1298C и C677T, метионин-синтазы-редуктазы – MTRR A66G, метионин-синтазы – MTR A2756G), синтазы окиси азота (NOS3) G894T, эндотелина-1 G5370T, остеопротегерина rs2073617, их связь с гомоцистеином, эндотелином-1 и остеопротегерином, а также влияние на исход реваскуляризирующих операций у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа.

Материалы и методы. Определение генотипов генов выполнялось у 129 пациентов с хронической ишемией нижних конечностей вследствие сочетания облитерирующего атеросклероза с сахарным диабетом 2-го типа (группа 1). Группу сравнения составили условно здоровые пациенты (n=51). В группе 1 наблюдались 78 пациентов 24 месяца после выполнения реваскуляризирующей операции (рентгенэндоваскулярной либо открытой). В зависимости от исхода операции пациенты этой группы были разделены на подгруппу 1А (пациенты, которым потребовалось повторное оперативное вмешательство или ампутация на оперированной нижней конечности, n=31; 39,74%) и 1Б (без такой необходимости, n=47; 60,26%).

Результаты. Доминирующими генотипами в группе пациентов с облитерирующим атеросклерозом, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа, были: генотип GA rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), генотип GG и аллель G rs5370 гена EDN-1, генотип GG и аллель G rs1799983 гена NOS3, генотипы AA, AC и аллель A rs1801131 (A1298C) гена MTHFR, генотипы CC и CT, а также аллель C rs1801133 (C677T) гена MTHFR, генотип



AG и аллель G rs1801394 (A66G) гена MTRR и гомозиготный генотип AA и аллель A rs1805087 (A2756G) гена MTR. Концентрация остеопротегерина, эндотелина-1 и гомоцистеина в сыворотке крови пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа, достоверно превышала их значения у здоровых лиц. Наличие генотипов GG/GA полиморфизма rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), AA/AG полиморфизма rs1801394 (A66G) гена MTRR, TT полиморфизма rs1801133 (C677T) гена MTHFR увеличивает соответственно в 5,7; 7,72 и 5,41 раза шанс выполнения повторной реваскуляризации у пациентов с вышеупомянутой сочетанной патологией, перенесших артериальную реконструкцию на нижних конечностях. Наличие генотипа AC/CC полиморфизма rs1801131 (A1298C) гена MTHFR снижает на 24% шанс необходимости выполнения повторной реваскуляризации, а генотипа CC – на 15% шанс высокой ампутации нижней конечности в данной группе пациентов.

Заключение. Разработанный метод определения вероятности прогрессирования облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа после выполнения реваскуляризирующих операций на инфраингвинальных артериях позволит выявить среди пациентов с сахарным диабетом лиц с высоким риском прогрессирования облитерирующего атеросклероза нижних конечностей.

Ключевые слова: облитерирующий атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа, остеопротегерин, эндотелин-1, гомоцистеин, артериальная реваскуляризация, гены фолатного цикла, полиморфизм синтазы окиси азота, полиморфизм эндотелина-1, полиморфизм остеопротегерина

Obuhovich A.¹ ✉, laskevich N.¹, Hladki M.¹, Babenka A.²

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² Republican Scientific and Practical Centre "Cardiology", Minsk, Belarus

Polymorphisms of Folate Cycle, Endothelin-1, Nitric Oxide Synthase and Osteoprotegerin Genes in Obliterating Atherosclerosis of Lower Limb Arteries Combined with Type 2 Diabetes Mellitus

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Obuhovich A. – study concept and design, data collection and interpretation, article preparation; laskevich N. – critical revision and editing of the article, final approval of the article version for publication; Hladki M. – data collection and analysis; Babenka A. – data collection, analysis and interpretation.

Funding. The work was carried out within the framework of the grant of the BRFFR "Science M-23" No. M23M-098 dated 02.05.2023 (state registration No. 20231274) on the topic: "Role of osteoprotegerin, endothelin-1 and polymorphism of their genes in chronic critical lower limb ischemia in obliterating atherosclerosis combined with diabetes mellitus, and the outcomes of arterial reconstructions". The authors did not receive financial support from drug manufacturers.

Submitted: 02.02.2025

Accepted: 11.04.2025

Contacts: anneta.panasiuk@gmail.com

Abstract

Purpose. To study the distribution of folate metabolism genes genotypes (methylene-tetrahydrofolate reductase – MTHFR A1298C and C677T, methionine synthase-reductase – MTRR A66G, methionine synthetase – MTR A2756G), nitric oxide synthetase 3 (NOS3) G894T, endothelin-1 G5370T, and osteoprotegerin rs2073617, their relationship with homocysteine, endothelin-1 and osteoprotegerin, as well as the effect on revascularization surgery outcomes in patients with lower limb atherosclerosis combined with type 2 diabetes mellitus.

Materials and methods. Genotyping was performed in 129 patients with chronic lower limb ischemia due to the combination of obliterating atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus (group 1). The comparison group consisted of conditionally healthy subjects (n=51). Group 1 consisted of 78 patients followed-up within 24 months after revascularization surgery (endovascular or open). Depending on the outcome of the surgery, the patients were subdivided into group 1A (patients who required repeated surgery or amputation on the operated lower limb, n=31; 39.74%) and group 1B (patients without such a need, n=47; 60.26%).

Results. The dominant genotypes in the group of patients with obliterating atherosclerosis combined with type 2 diabetes mellitus were: GA genotype rs2073617 of the TNFRSF11B gene (OPG), GG genotype and G allele rs5370 of the EDN-1 gene, GG genotype and G allele rs1799983 of the NOS3 gene, AA, AC genotypes and A allele rs1801131 (A1298C) of the MTHFR gene, CC and CT genotypes, as well as the C allele rs1801133 (C677T) of the MTHFR gene, AG genotype and G allele rs1801394 (A66G) of the MTRR gene and homozygous AA genotype and A allele rs1805087 (A2756G) of the MTR gene. The concentration s of osteoprotegerin, endothelin-1 and homocysteine in the blood serum of patients with obliterating atherosclerosis of the lower extremity arteries combined with type 2 diabetes mellitus significantly exceeded their values in healthy subjects. The presence



of the GG/GA genotypes of rs2073617 polymorphism of the TNFRSF11B gene (OPG), AA/AG polymorphism of rs1801394 (A66G) of the MTRR gene, and TT polymorphism of rs1801133 (C677T) of the MTHFR gene increase chances for repeated revascularization in patients with the above-mentioned combined pathology who already underwent arterial reconstruction on the lower extremities by 5.7 times, 7.72 times and 5.41 times, respectively. The presence of AC/CC genotype of rs1801131 (A1298C) polymorphism of the MTHFR gene reduces chances for repeated revascularization by 24%, while CC genotype reduces chances for high amputation of the lower limb in this group of patients by 15%.

Conclusion. The elaborated method for determining the probability of progressing obliterating atherosclerosis of the lower extremities arteries in patients with type 2 diabetes mellitus after revascularizing surgeries on infrainguinal arteries will allow identifying individuals with high risk of progressing obliterating atherosclerosis of the lower extremities among patients with diabetes mellitus.

Keywords: obliterating atherosclerosis, type 2 diabetes mellitus, osteoprotegerin, endothelin-1, homocysteine, arterial revascularization, folate cycle genes, nitric oxide synthase polymorphism, endothelin-1 polymorphism, osteoprotegerin polymorphism

■ ВВЕДЕНИЕ

Варианты фенотипа, возникающие ввиду экспрессии различных генов, давно вызывают интерес у ученых. Они играют ключевую роль в развитии заболеваний. Нерегулируемые экспрессии генов возникают при наложении генетических и экологических факторов.

Сердечно-сосудистые заболевания являются лидирующей причиной смертности. Особое место в структуре данной патологии занимает облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОААНК). От момента появления первых симптомов ОААНК 4–27% пациентов теряют нижнюю конечность в течение последующего срока 6,3 года [1]. Количество пациентов с СД также увеличивается с каждым годом. Половина из них – это лица трудоспособного возраста, что ввиду высокой инвалидности в данной группе пациентов имеет важные социальные и экономические последствия [2].

В аспекте неуклонного роста количества пациентов с СД в мире, в том числе и с сопутствующим ОААНК, остро стоит задача поиска генов, ответственных за возникновение и прогрессирование СД 2-го типа, ОААНК. Зная генотип пациента, возможным будет более раннее выявление группы риска с проведением соответствующих профилактических и лечебных мероприятий для выявления на ранних стадиях и предупреждения развития осложнений данных заболеваний.

Среди патологических процессов, оказывающих влияние на патогенез ОААНК и СД 2-го типа и наиболее часто изучаемых, следует отметить эндотелиальную дисфункцию (ЭД) и гипергомоцистеинемию (ГГЦ). Вместе с тем в последнее время большая дискуссия ведется вокруг связи атеросклероза с костным метаболизмом, который, по мнению некоторых авторов, также может быть вовлечен в дисфункцию сосудистой стенки [3, 4].

Эндотелин (ЭТ) – это пептид, состоящий из 21 аминокислотного остатка. Он существует в 3 изоформах: ЭТ-1, ЭТ-2 и ЭТ-3, отличающихся между собой единичными аминокислотами. Человеческий ЭТ-1 был открыт первым из всех эндотелинов в 1988 г. Основным источником ЭТ-1 является эндотелий сосудов. Однако доказана продукция этого пептида и другими клетками, такими как лейкоциты, гладкомышечные, мезангиальные клетки, кардиомиоциты, астроциты, эпителиальные клетки легких, кератиноциты, макрофаги, дендритические клетки [5, 6].

Роль ЭТ-1 в организме продолжает активно изучаться. Установлено, что он участвует в сигнальном пути белка G, т. е. влияет на функции практически всех органов: на эпителиальный транспорт ионов, например секрецию анионов хлора; регулирует объем секрета и жидкости на поверхности дыхательных путей; участвует в обеспечении перистальтики, абсорбции и секреции клетками кишечника; сокращает мезангиальные клетки, влияя тем самым на скорость клубочковой фильтрации; контролирует артериальное давление. ЭТ-1 рассматривается как профибротический цитокин, модулирующий проницаемость сосудов, увеличивающий транскрипцию провоспалительных цитокинов, способствующий адгезии и миграции нейтрофилов. Доказано влияние ЭТ-1 на прогрессирование рака на нескольких уровнях его развития, включая регуляцию пролиферации и миграции опухолевых клеток и действие в качестве проангиогенного фактора [5].

Активно изучается роль ЭТ-1 в патогенезе атеросклероза. Как известно, воспаление и активация иммунных клеток важны на всех этапах развития атеросклероза. У пациентов с коронарным атеросклерозом концентрация ЭТ-1 повышена как в плазме, так и в тканях. Отмечена также корреляция между уровнем ЭТ-1 в плазме с количеством зон, пораженных атеросклеротическими бляшками, у пациентов с симптомным коронарным атеросклерозом. Установлено, что данный пептид ускоряет прогрессирование атеросклероза за счет активации макрофагов и кальцификации бляшки [5]. Вместе с тем неизвестно, ЭТ-1 является ключевым патогенетическим компонентом развития атеросклероза или только маркером поврежденного сосудистого эндотелия [6]. Ген, ответственный за его продукцию, – Edn1 – находится на 6-й хромосоме. Наиболее часто изучаемым полиморфизмом является rs5370, в результате чего лизин заменяется аспарагиновой кислотой в кодоне 198 экзона 5.

В развитии ЭД участвует не только ЭТ-1, но также и нарушение синтеза оксида азота (NO), продуцируемого в основном при участии эндотелиальной синтазы NO (eNOS) в эндотелиальных клетках, тромбоцитах, эритроцитах. Он обладает важными антиатерогенными свойствами, может ингибировать агрегацию и адгезию тромбоцитов. Существует 3 полиморфизма гена eNOS: T786C, G894T и 4a/4b, которые могут быть ассоциированы с атеросклерозом. Среди них только G894T является функциональным, т. е. снижающим продукцию NO [7].

Гомоцистеин (ГЦ) – это аминокислота, которая образуется в промежуточных реакциях обмена, но не используется в процессах синтеза белков. В норме ГЦ содержится в организме в минимальных количествах, так как сразу же «обезвреживается» в процессе реметилирования (по фолат-зависимому либо бетаин-зависимому пути) или трансульфирования [8, 9]. Для этих реакций необходимы фолиевая кислота, витамины B₆, B₁₂. При нарушении внутриклеточного метаболизма ГЦ он выходит за пределы клетки, оказывая повреждающее действие на эндотелий сосудов.



Согласно многочисленным исследованиям, гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), бесплодия, невынашивания беременности, патологии развития плода [8, 10]. Ее негативное влияние связано с воздействием не только на клетки эндотелия, но и на гладкомышечные клетки стенок сосудов, тромбоциты, липиды крови, оксид азота и систему коагуляции [11]. ГЦ стимулирует синтез коллагена фибробластами гладкомышечных клеток сосудистой стенки, тем самым повышая ее плотность. Кроме этого, способствует развитию инсулинорезистентности и дисфункции β -клеток, ускоряя развитие СД [2]. Немногочисленные исследования изучали показатели ГЦ при сочетании СД 2-го типа и ишемической болезни сердца (ИБС) [11]. Вместе с тем исчерпывающей информации о ГЦ при ОААНК и сопутствующем СД 2-го типа нет.

ГЦ признана состоянием с генетической предрасположенностью, на развитие которого влияют дополнительные факторы. Уровень ГЦ в плазме зависит от множества факторов: возраста, мужского пола, питания, образа жизни, приема некоторых лекарственных препаратов и ряда заболеваний. Полиморфизм генов, вовлеченных в фолатный цикл, а следовательно, и в развитие ГЦ, связан с заменой единичных нуклеотидов, это однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) [10]. Наиболее изученные из них: С677Т и А1298С гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), А66G гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR), А2756G гена метионин-синтазы (MTR).

Остеопротегерин (ОПГ) – это гликопротеин, относящийся к рецепторам ФНО- α [12]. Согласно некоторым научным источникам, он может являться связующим звеном между атеросклерозом и остеопорозом. ОПГ вовлечен в систему RANKL-RANK-OPG, участвующую в созревании и дифференцировке остеокластов и тем самым в развитии остеопороза [13, 14]. ОПГ присоединяется к RANKL, конкурируя с RANK, предотвращая их взаимодействие. Таким образом, ОПГ действует как эндогенный рецептор-ловушка для RANKL, нарушая процесс остеокластогенеза и резорбции кости. ОПГ синтезируется остеобластами, клетками стромы, эндотелиальными клетками сосудов и В-лимфоцитами [15]. Результаты клинических исследований говорят о том, что повышенная концентрация ОПГ в плазме крови может служить биомаркером наличия, тяжести и прогрессирования атеросклероза, в том числе и кальциноза [16, 17].

Ген ОПГ находится на хромосоме 8q23-24 и состоит из 5 экзонов и 4 интронов [18, 19]. Известны несколько его полиморфизмов, наиболее распространенными из которых являются 950Т/С в локусе rs2073617, 1181 G/С в локусе rs2073618, 163А/Г в локусе rs3102735 и 245Т/Г в локусе rs3134069. Влияние полиморфизмов на концентрацию ОПГ в плазме является предметом исследований в последние годы.

Таким образом, вышеупомянутые полиморфизмы могут быть ассоциированы с атеросклерозом коронарных, сонных, а также артерий нижних конечностей.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить распределение генотипов генов фолатного обмена (метилентетрагидрофолатредуктазы – MTHFR А1298С и С677Т, метионин-синтазы-редуктазы – MTRR А66G, метионин-синтазы – MTR А2756G), синтазы окиси азота 3 (NOS3) G894Т, эндотелина-1 G5370Т, остеопротегерина rs2073617, их связь с гомоцистеином, эндотелином-1 и остеопротегерином, а также влияние на исход реваскуляризирующих операций у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе отделения гнойной хирургии учреждения здравоохранения «Гродненская университетская клиника» в период с 2021 по 2024 г. были обследованы 129 пациентов с ОААНК, сочетающимся с СД 2-го типа (группа 1). Из них 77 мужчин (59,7%), 52 женщины (40,3%). Медиана возраста обследуемых пациентов – 65 лет (58; 73).

Лечение пациентов осуществлялось согласно рекомендуемым клиническим протоколам Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В процессе терапии применялись антигипертензивные (у 65,12% пациентов; в основном АПФ-ингибиторы – в 41,09% случаев, из них 40 пациентов получали лизиноприл, 7 – рамиприл, 2 – эналаприл и 4 – периндоприл, БРА – у 24,03%, из них 27 пациентов принимали лозартан, 4 – валсартан), липидоснижающие (у 63,3%, во всех случаях применялся аторвастатин под контролем липидограммы), сахароснижающие (бигуаниды, производные сульфонилмочевины либо инсулинотерапия) препараты, вазоактивная (пентоксифиллин, актовегин), а также антибактериальная (при наличии инфекционного процесса) терапия. Среди обследованных пациентов 27,13% являлись курильщиками.

Группу сравнения составили условно здоровые пациенты, госпитализированные в отделение гнойной хирургии в плановом порядке без ОА, СД 2-го типа и ишемической болезни сердца (ИБС) (группа 2, n=51). Среди них курильщиков было 27,45%.

Критериями включения в группу 1 являлись: верифицированный диагноз ОААНК в стадии хронической артериальной недостаточности стадии 2б, 3 и 4 (по Фонтейну – А.В. Покровскому), СД 2-го типа, отсутствие сопутствующих заболеваний в фазе обострения, наличие информированного согласия на участие в исследовании, возраст старше 18 лет.

Критерии не включения в данные группы: другие типы СД, декомпенсация СД 2-го типа, ОААНК в стадии хронической артериальной недостаточности стадии 1 и 2а (по Фонтейну – А.В. Покровскому), острый коронарный синдром, печеночная и почечная недостаточности независимо от степени тяжести, заболевания щитовидной железы с нарушением функции, сопутствующие соматические и инфекционные заболевания в стадии обострения или декомпенсации патологического процесса, онкологическое заболевание в анамнезе, прием витаминных препаратов, витаминов группы В и фолиевой кислоты в течение последних 6 месяцев.

На проведение исследования получено положительное решение этической комиссии УО «Гродненский государственный медицинский университет», УЗ «Гродненская университетская клиника» и письменное согласие пациентов.

Всем пациентам производился забор венозной крови из локтевой вены утром натощак.

Из 129 пациентов группы 1 в 78 случаях выполнялась реваскуляризирующая операция. В послеоперационном периоде пациенты наблюдались в течение 24 месяцев с целью оценки результата оперативного лечения.

Выделение геномной ДНК проводилось из образцов крови, набранных с использованием вакуумных систем с ЭДТА и комплекта реагентов для выделения ДНК из цельной крови методом магнитной сорбции (производство ООО «Синтол», РФ, «М-сорб-кровь»).

Определение генотипа rs1801131 (замена аденина (А) на цитозин (С) в позиции 1298) гена MTHFR; rs1801133 (замена цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 677) гена



MTHFR; SNP rs1801394 (замена аденина (A) на гуанин (G) в позиции 66) гена MTRR, SNP rs1805087 (замена аденина (A) на гуанин (G) в позиции 2756) гена MTR, SNP rs5370 (замена гуанина (G) на тимин (T)) в последовательности 5665 гена EDN-1, SNP rs1799983 (замена гуанина (G) на тимин (T) в позиции 894) гена NOS3 проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени посредством термоциклирующей системы Rotor Gene Q 5 plex HRM, QIAGEN, Германия, в соответствии с протоколами реакции фирмы-производителя ООО «Синтол» и компании ООО НПФ «Литех», РФ, к указанным полиморфизмам. Качественную и количественную оценку содержания ДНК в полученных препаратах проводили спектрофотометрически прибором SpectroStar Nano, BMG LABTECH, Германия, при длине волны 260 нм.

Полиморфный статус rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG) определяли методом аллельной дискриминации с использованием ПЦР в режиме реального времени и флуоресцентно-меченых зондов. Олигонуклеотидные праймеры и зонды выбирали на референсной последовательности 12-й хромосомы 38-й сборки генома ДНК человека NC_000008.11 (chr8:118952044 (GRCh38.p14)), доступной в бесплатной онлайн-базе NCBI. Данные о вариантах rs2073617 и последовательности близлежащих нуклеотидов получены с помощью раздела SNP базы NCBI. ПЦР-РВ проводили с использованием реагентов ОДО «Праймтех» (Беларусь). Термоциклирование с детекцией результатов в режиме реального времени проводили на оборудовании CFX Connect (Bio-Rad, США).

Количественное определение уровня ОПГ в плазме крови проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа Human OPG (Osteoprotegerin) ELISA Kit Cat. № EH0247, уровня ЭТ-1 – с помощью набора для иммуноферментного анализа Human Endothelin 1 ELISA Kit Cat. № E1238 Hu, а гомоцистеина – Human Homocysteine ELISA Kit Cat. № E3292 Hu. Согласно инструкциям по применению данных наборов, референсные значения не предусмотрены и зависят от конкретной популяции. Ввиду этого за референсные показатели нами приняты промежутки от 5-го до 95-го перцентиля показателей здоровых добровольцев. Они составили 54,8–183,54 пг/мл; 33,76–68,62 нг/л; 1,99–5,65 нмоль/мл соответственно для ОПГ, ЭТ-1 и ГЦ.

С помощью онлайн-калькулятора произведен расчет соответствия распределения генотипов и аллелей в выборке пациентов равновесию Харди – Вайнберга.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatSoft Statistica 10,0 для Windows и языка программирования R. Количественные данные, распределение которых не являлось нормальным, представлялись в виде медианы (Me), нижнего (Q25) и верхнего (Q75) квартилей. Для сравнения концентрации показателей между группами пациентов применялся критерий Манна – Уитни, генотипов – тест хи-квадрат. Построение регрессионных моделей было выполнено с помощью программы Rstudio 1.2 языка R (версия 3.4), характеристики моделей определялись с помощью стандартного пакета stats расширения языка R, ROC-анализ проводился с помощью пакетов расширения pROC и ROCR. Пороговое значение уровня значимости было принято равным 0,05.

Исследование выполнено в рамках гранта БРФФИ «Наука М-23» № M23M-098 от 02.05.2023 (гос. регистрация № 20231274) по теме «Роль остеопротегерина, эндотелина-1 и полиморфизма их генов в развитии хронической критической ишемии нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе, сочетающемся с сахарным диабетом, и исходах артериальных реконструкций».

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение всех генотипов соответствовало распределению Харди – Вайнберга. По результатам генотипирования полиморфизма rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG) у обследуемых пациентов установлено, что в 28,73% случаев встречался гомозиготный генотип GG, в 48,62% – гетерозиготный генотип GA. Носители мутантного генотипа AA выявлены в 22,09%. Генотип GA обнаруживался чаще, чем генотипы GG и AA ($p < 0,05$ в обоих случаях). Носителями аллели G являлись 53,04% пациентов, аллели A – 46,96% ($p > 0,05$).

По результатам генотипирования полиморфизма rs5370 гена EDN-1 выявлено, что в 62,2% случаев отмечался гомозиготный генотип GG, в 32,2% – гетерозиготный генотип GT, в 5,5% – мутантный генотип TT. Генотип GG встречался чаще, чем генотипы GT и TT, а GT – чаще, чем TT ($p < 0,05$ во всех случаях). Носителями аллели G были 78,3% пациентов, аллели T – 21,7% ($p < 0,05$).

Генотипирование полиморфизма rs1799983 гена NOS3 установило частоту гомозиготного генотипа GG в 58,33%, гетерозиготного GT – 35,56%, гомозиготного TT – 6,11%. Генотип GG обнаруживался чаще, чем генотипы GT и TT, а GT – чаще, чем TT ($p < 0,05$ во всех случаях). Носителями аллели G оказались 76,4% пациентов, аллели T – 23,6% ($p < 0,05$).

Полиморфизмы генотипа rs1801131 (A1298C) гена MTHFR распределились следующим образом: AA – 42,78%, AC – 46,11%, CC – 11,11%. Генотип AA встречался чаще, чем генотипы AC и CC, а AC чаще, чем CC ($p < 0,05$ во всех случаях). Носителями аллели A были 65,28% пациентов, а аллели C – 34,72% ($p < 0,05$).

Частота генотипа TT rs1801133 (C677T) гена MTHFR составила 13,33%, что оказалось значимо ниже, чем генотипа CC (45,0%) и CT (41,67%) ($p < 0,05$). Разницы между генотипами CC и CT обнаружено не было. Аллель C обнаружена в 65,83% случаев, T – в 34,17% ($p < 0,05$).

По результатам генотипирования полиморфизма rs1801394 (A66G) гена MTRR у обследуемых пациентов выявлено, что в 22,22% случаев имелся гомозиготный генотип AA, гетерозиготный генотип AG – в 43,89%. В 33,89% обнаружены носители мутантного генотипа GG. Генотип AG отмечался чаще генотипа AA ($p < 0,05$). Носителями аллели A являлись 43,89% пациентов, аллели G – 56,11%. Однако статистической достоверных различий между ними не было ($p > 0,05$).

Генотипирование полиморфизма rs1805087 (A2756G) гена MTR у обследуемых пациентов выявило, что в 22,22% случаев присутствовал гомозиготный генотип AA, в 43,89% – гетерозиготный генотип AG, в 33,89% – мутантный генотип GG. Генотип AG наблюдался чаще генотипа AA ($p < 0,05$). Носителями аллели A являлись 43,89% пациентов, аллели G – 56,11% ($p > 0,05$).

В табл. 1 представлены результаты распределения генотипов и аллелей полиморфных локусов изучаемых генов у обследованных групп пациентов.

Согласно данным табл. 1, в группе 1 генотип GA rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG) встречался достоверно чаще как генотипа GG, так и AA. В то время как в группе 2 статистически значимая разница получена только при сравнении генотипов GA и AA.

У пациентов группы 1 генотип GG rs5370 гена EDN-1 является доминирующим, его частота достоверно выше как генотипа GT, так и TT, в отличие от группы 2, где значимых различий в частоте GG и GT не наблюдалось. Аллель G в обеих группах обнаружена чаще, чем аллель T.

Таблица 1
Распределение генотипов и аллелей полиморфных локусов изучаемых генов
Table 1
Distribution of genotypes and alleles of polymorphic loci of the studied genes

Генотип, аллель	Группа 1, n=129	Группа 2, n=51	p
rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG)			
GG	37 (28,68%)	15 (29,41%)	>0,05
GA	63 (48,84%)*	25 (49,02%)*	>0,05
AA	29 (22,48%)	11 (21,57%)	>0,05
Аллель G	137 (53,1%)	55 (53,92%)	>0,05
Аллель A	121 (46,9%)	47 (46,08%)	>0,05
rs5370 гена EDN-1			
GG	82 (63,57%)*	30 (58,82%)*	>0,05
GT	39 (30,23%)*	19 (37,27%)*	>0,05
TT	8 (6,2%)	2 (3,92%)	>0,05
Аллель G	203 (78,68%) ^о	79 (77,45%) ^о	>0,05
Аллель T	55 (21,32%)	23 (22,55%)	>0,05
rs1799983 гена NOS3			
GG	77 (59,6%)*	28 (54,9%)*	>0,05
GT	43 (33,3%)*	21 (41,1%)*	>0,05
TT	9 (7,1%)	2 (4,0%)	>0,05
Аллель G	197 (75,9%) ^о	78 (76,4%) ^о	>0,05
Аллель T	61 (24,1%)	24 (24,1%)	>0,05
rs1801131 (A1298C) гена MTHFR			
AA	54 (41,68%)*	23 (45,1%)	>0,05
AC	63 (48,84%)*	20 (39,2%)	>0,05
CC	12 (9,48%)	8 (15,7%)	>0,05
Аллель A	170 (65,89%) ^о	65 (63,7%) ^о	>0,05
Аллель C	88 (34,11%)	37 (46,3%)	>0,05
rs1801133 (C677T) гена MTHFR			
CC	54 (41,86%)*	27 (52,9%)*	>0,05
CT	60 (46,51%)*	15 (29,4%)	>0,05
TT	15 (11,63%)	9 (17,7%)	>0,05
Аллель C	168 (65,12%) ^о	69 (67,65%) ^о	>0,05
Аллель T	90 (34,88%)	33 (32,35%)	>0,05
rs1801394 (A66G) гена MTRR			
AA	27 (20,93%)	13 (25,49%)	>0,05
AG	56 (43,41%)*	23 (45,09%)	>0,05
GG	46 (35,66%)*	15 (29,49%)	>0,05
Аллель A	110 (42,64%)	48 (47,06%)	>0,05
Аллель G	148 (57,36%) ^о	54 (52,94%)	>0,05
rs1805087 (A2756G) гена MTR			
AA	85 (65,89%)*	38 (74,51%)*	>0,05
AG	35 (27,13%)*	11 (21,57%)*	>0,05
GG	9 (6,98%)	2 (3,92%)	>0,05
Аллель A	209 (81,01%) ^о	88 (86,27%) ^о	>0,05
Аллель G	49 (18,99%)	14 (13,73%)	>0,05

Примечания: * статистически значимая разница при сравнении внутри группы с рецессивной гомозиготой; * статистически значимая разница при сравнении внутри группы с доминантной гомозиготой; ^о статистически значимая разница при сравнении аллелей внутри группы.

В обеих обследованных группах генотип ТТ rs1799983 гена NOS3 наблюдался реже, чем генотип GG и GT. Однако в группе 1 генотип GG не только преобладал над ТТ, но и встречался достоверно чаще генотипа GT, чего не отмечалось в группе 2. Частота выявления аллели G в обеих группах была выше выявления аллели T.

Полиморфизмы генотипа rs1801131 (A1298C) гена MTHFR распределились следующим образом: преобладание генотипов AA и AC над генотипом CC ($p < 0,05$ в обоих случаях) в группе 1, в отличие от здоровых пациентов (группа 2), где статистически значимой разницы между распределением генотипов не получено. Аллель A преобладала в обеих группах ($p < 0,05$).

В группе 1 одинаково часто встречались генотипы CC и CT rs1801133 (C677T) гена MTHFR. Оба достоверно чаще, чем генотип TT ($p < 0,05$ в обоих случаях). В то же время в группе 2 достоверная разница получена только при сравнении частоты генотипов CC и TT. Аллель C обнаруживалась чаще аллели T в обеих группах.

В группе 1 генотип AA rs1801394 (A66G) гена MTRR наблюдался реже, чем генотипы AG и GG ($p < 0,05$ в обоих случаях), а аллель G чаще, чем аллель A ($p < 0,05$). В группе 2 разницы в распределении генотипов и аллелей не выявлено.

Согласно генотипированию полиморфизма rs1805087 (A2756G) гена MTR в обеих группах генотип AA встречался чаще, чем генотипы AG и GG, а AG – чаще, чем GG, аллель A – чаще аллели G ($p < 0,05$ во всех случаях).

Концентрация ОПГ в группе 1 составила 237,06 (167,57; 311,05) пг/мл, в группе 2 – 121,96 (100,69; 169,52) пг/мл ($p = 0,000$). У пациентов с генотипом GG концентрация ОПГ составила 199,79 (122,83; 276,77) пг/мл, GA – 190,08 (138,28; 288,35) пг/мл, AA – 170,75 (123,53; 200,61) пг/мл ($p > 0,05$). Зависимость концентрации ОПГ от генотипа и аллели в исследованных группах представлена в табл. 2.

Как следует из табл. 2, концентрация ОПГ в группе 1 была выше, чем в группе 2 среди пациентов со всеми генотипами и аллелями. В группе 1 концентрация ОПГ у пациентов с генотипом GA достоверно выше, чем у пациентов с генотипом AA, а с аллелью G – достоверно выше, чем с аллелью A.

Концентрация ЭТ-1 в группе 1 составила 67,95 (57,06; 77,82) нг/л, в группе 2 – 56,59 (50,59; 69,13) нг/л ($p = 0,0009$). У пациентов с генотипом GG концентрация ЭТ-1 составила 62,83 (53,48; 75,53) нг/л, GT – 67,39 (56,58; 77,08) нг/л, TT – 64,9 (61,11; 74,85) нг/л ($p > 0,05$). Зависимость концентрации ЭТ-1 от генотипа и аллели в каждой группе представлена в табл. 3.

Таблица 2
Концентрация ОПГ в зависимости от генотипирования rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG) (пг/мл)
Table 2
OPG concentration depending on genotyping of rs2073617 of the TNFRSF11B gene (OPG) (pg/ml)

Генотип, аллель	Группа 1, n=129	Группа 2, n=51	p
GG	241,48 (179,58; 309,09)	122,83 (90,61; 159,68)	0,000*
GA	228,15 (167,57; 312,85) [‡]	121,96 (107,9; 164,85)	0,000*
AA	176,75 (150,17; 237,06) [‡]	107,14 (93,92; 183,54)	0,04*
Аллель G	237,44 (179,58; 310,28) [°]	122,83 (97,66; 159,68)	0,000*
Аллель A	201,56 (160,28; 259,39) [°]	121,51 (101,13; 181,20)	0,000*

Примечания: * статистически значимая разница между группами; [‡] статистически значимая разница между парой генотипов; [°] статистически значимая разница между парой аллелей.

Таблица 3

Концентрация ЭТ-1 в зависимости от генотипирования rs5370 гена EDN-1 (нг/л)

Table 3

Concentration of ET-1 depending on genotyping of rs5370 of the EDN-1 gene (ng/l)

Генотип, аллель	Группа 1, n=129	Группа 2, n=51	p
GG	65,05 (54,76; 77,91)	55,81 (44,82; 69,63)	0,007*
GT	70,17 (64,58; 77,06)	59,83 (53,41; 70,82)	0,01*
TT	69,53 (62,66; 81,26)	60,26 (54,93; 65,59)	0,48
Аллель G	64,58 (54,76; 74,91)	55,9 (45,50; 69,63)	0,003*
Аллель T	70,17 (64,21; 77,37)*	58,72 (53,09; 65,98)*	0,0004*

Примечания: * статистически значимая разница между группами; * статистически значимая разница между аллелями.

Из табл. 3 следует, что концентрация ЭТ-1 при наличии генотипов GG и GT, а также обеих аллелей rs5370 гена EDN-1 достоверно выше в группе 1, чем в группе 2. Внутри каждой группы аллель T связана с достоверно более высокими показателями ЭТ-1, чем аллель G.

Концентрация ГЦ в группе 1 составила 5,67 (4,64; 6,88) нмоль/мл, в группе 2 – 5,03 (3,67; 5,95) нмоль/мл ($p=0,0048$). У пациентов с генотипом AA полиморфизма A1298C гена MTHFR уровень ГЦ равнялся 5,32 (3,94; 6,87) нмоль/мл, AC – 5,36 (4,28; 6,45) нмоль/мл, CC – 5,48 (3,73; 6,37) нмоль/мл ($p>0,05$). У пациентов с генотипом CC полиморфизма C677T гена MTHFR уровень ГЦ составил 5,42 (3,8; 6,43) нмоль/мл, CT – 5,33 (4,1; 6,86) нмоль/мл, TT – 5,03 (4,12; 6,49) нмоль/мл ($p>0,05$). При наличии генотипа AA полиморфизма A66G гена MTRR уровень ГЦ оказался равным 4,99 (3,51; 6,58) нмоль/мл, AG – 5,64 (4,28; 6,47) нмоль/мл, GG – 5,38 (4,3; 6,81) нмоль/мл ($p>0,05$). У пациентов с генотипом AA полиморфизма A2756G гена MTR концентрация ГЦ составила 5,42 (4,07; 6,58) нмоль/мл, AG – 5,18 (4,19; 6,68) нмоль/мл, GG – 5,96 (4,35; 34,09) нмоль/мл ($p>0,05$). Зависимость концентрации ГЦ от генотипа и аллели в каждой группе представлена в табл. 4.

Как следует из табл. 4, пациенты с генотипом AA и аллелью A полиморфизма A1298C гена MTHFR группы 1 имели достоверно более высокие показатели ГЦ, чем пациенты группы 2. Такие же результаты наблюдались в случае генотипов CC, CT и аллели T полиморфизма C677T гена MTHFR, а также генотипов AA, AG и аллели A полиморфизма A66G гена MTRR и генотипов AG, GG, аллели G полиморфизма A2756G гена MTR. В группе 2 наличие аллели G полиморфизма A66G гена MTRR было связано с достоверно более высокими показателями ГЦ, чем у пациентов с аллелью A ($p=0,009$).

Как упоминалось выше, у 78 пациентов группы 1 выполнялся один из видов реваскуляризирующей операции. Данные пациенты находились под наблюдением в течение 24 месяцев. За это время им было выполнено 15 (19,23%) повторных реваскуляризирующих вмешательств и 18 (23,08%) высоких ампутаций нижних конечностей. Медиана срока ампутации составила 2 месяца (0,75; 5).

В зависимости от исхода операции пациенты были разделены на 2 подгруппы. Подгруппа 1А (n=31) – пациенты, которым потребовалось повторное оперативное вмешательство или ампутация на оперированной нижней конечности. Подгруппа 1Б (n=47) – пациенты, которым не потребовались вмешательства на оперированной нижней конечности. Обе подгруппы были сравнимы по полу, возрасту, стадии

Таблица 4
Концентрация ГЦ в зависимости от генотипирования полиморфизмов генов фолатного цикла (нмоль/мл)
Table 4
Concentration of HC depending on genotyping of polymorphisms of folate cycle genes (nmol/ml)

Генотип, аллель	Группа 1, n=129	Группа 2, n=51	p
rs1801131 (A1298C) гена MTHFR			
AA	5,35 (4,45; 7,4)	4,07 (2,29; 6,38)	0,027*
AC	5,63 (4,54; 6,47)	4,68 (3,49; 5,87)	0,13
CC	5,38 (3,79; 6,61)	5,61 (5,01; 6,29)	0,09
Аллель А	5,52 (4,52; 6,87)	4,68 (3,02; 6,38)	0,0043*
Аллель С	5,40 (4,13; 6,50)	5,37 (3,80; 6,29)	0,3914
rs1801133 (C677T) гена MTHFR			
CC	5,63 (5,14; 6,50)	4,32 (3,59; 5,80)	0,0334*
CT	5,49 (4,51; 6,94)	4,07 (2,29; 5,69)	0,047*
TT	5,8 (4,3; 6,87)	5,03 (4,12; 6,49)	0,57
Аллель С	5,42 (4,51; 6,69)	5,11 (3,59; 5,87)	0,0258*
Аллель Т	5,87 (4,54; 6,94)	5,05 (3,49; 6,38)	0,038*
rs1801394 (A66G) гена MTRR			
AA	5,75 (4,74; 6,61)	3,4 (2,29; 4,07)	0,019*
AG	5,88 (4,78; 6,69)	4,71 (3,54; 5,85)	0,04*
GG	5,19 (4,02; 6,84)	5,69 (5,05; 6,81)	0,29
Аллель А	5,87 (4,74; 6,61)	3,94 (2,90; 5,84)†	0,0001*
Аллель G	5,38 (4,30; 6,86)	5,61 (4,32; 6,59)	0,7301
rs1805087 (A2756G) гена MTR			
AA	5,38 (4,36; 6,59)	5,58 (3,59; 6,46)	0,1
AG	5,62 (4,4; 7,13)	4,28 (1,99; 5,16)	0,0288*
GG	7,0 (4,93; 61,19)	3,8 (3,77; 5,58)	0,03*
Аллель А	5,40 (4,37; 6,61)	5,13 (3,59; 6,38)	0,0635
Аллель G	6,06 (4,6; 7,4)	4,02 (2,9; 5,16)	0,0137*

Примечания: * статистически значимая разница между группами; † статистически значимая разница внутри группы между аллелями.

хронической ишемии нижней конечности, гликированному гемоглобину и характеру выполненной операции. Результаты генотипирования данных подгрупп пациентов представлены в табл. 5.

С учетом распространенности исследуемых генотипов и аллелей в обследованной группе пациентов был проведен расчет отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (ДИ) отношения шансов развития неблагоприятного исхода в группе оперированных пациентов с ОА, сочетающимся с СД 2-го типа.

Установлено, что наличие генотипов GG/GA полиморфизма rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG) увеличивает шанс необходимости повторной реваскуляризации в 5,70 раза (95% ДИ 1,01–10,74, p=0,047) в рецессивной модели наследования в сравнении с генотипом AA. Наличие генотипов AA/AG полиморфизма rs1801394 (A66G) гена MTRR увеличивает шанс необходимости повторной операции в 7,72 раза (95% ДИ 1,03–12,63, p=0,017) в доминантной модели наследования, генотипа AG – в 8,44 раза (95% ДИ 1,02–15,44, p=0,054), а генотипа AA – в 6,53 раза (95% ДИ 1,01–11,97)

Таблица 5
Распределение генотипов и аллелей полиморфных локусов изучаемых генов у оперированных пациентов
Table 5
Distribution of genotypes and alleles of polymorphic loci of the studied genes in operated patients

Генотип, аллель	Группа 1А, n=31	Группа 1Б, n=47	p
rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG)			
GG	7 (22,58%)	10 (21,28%)	0,89
GA	19 (61,29%)	22 (46,81%)	0,21
AA	5 (16,13%)	15 (31,91%)	0,11
Аллель G	33 (53,23%)	42 (44,68%)	0,29
Аллель A	29 (46,77%)	52 (55,32%)	0,29
rs5370 гена EDN-1			
GG	18 (58,06%)	30 (63,83%)	0,61
GT	10 (32,26%)	14 (29,79%)	0,82
TT	3 (9,68%)	3 (6,38%)	0,60
Аллель G	46 (74,19%)	74 (78,72%)	0,51
Аллель T	16 (25,81%)	20 (21,28%)	0,51
rs1799983 гена NOS3			
GG	19 (61,29%)	24 (51,06%)	0,70
GT	11 (35,48%)	15 (31,91%)	0,78
TT	1 (3,23%)	8 (17,02%)	0,22
Аллель G	44 (78,57%)	63 (67,02%)	0,13
Аллель T	12 (21,43%)	31 (32,98%)	0,13
rs1801131 (A1298C) гена MTHFR			
AA	15 (48,39%)	19 (40,43%)	0,48
AC	16 (51,61%)	16 (34,03%)	0,12
CC	0 (0%)	12 (25,53%)	0,0142*
Аллель A	46 (74,19%)	54 (57,45%)	0,03*
Аллель C	16 (25,81%)	40 (42,55%)	0,0428*
rs1801133 (C677T) гена MTHFR			
CC	11 (35,48%)	21 (44,68%)	0,37
CT	13 (41,93%)	19 (40,43%)	0,92
TT	7 (22,58%)	7 (14,89%)	0,16
Аллель C	35 (56,45%)	61 (64,89%)	0,28
Аллель T	27 (43,55%)	33 (35,11%)	0,28
rs1801394 (A66G) гена MTRR			
AA	7 (22,58%)	11 (23,40%)	0,94
AG	8 (25,81%)	17 (36,17%)	0,23
GG	16 (51,61%)	19 (40,43%)	0,18
Аллель A	22 (35,48%)	39 (41,49%)	0,45
Аллель G	40 (64,52%)	55 (58,51%)	0,45
rs1805087 (A2756G) гена MTR			
AA	22 (70,97%)	29 (61,70%)	0,7
AG	6 (19,35%)	12 (25,53%)	0,58
GG	3 (9,68%)	6 (12,77%)	0,84
Аллель A	50 (80,65%)	70 (74,47%)	0,37
Аллель G	12 (19,35%)	24 (25,53%)	0,37

Примечание: * статистически значимая разница между группами.

в кодоминантных моделях наследования. При наличии генотипа ТТ полиморфизма rs1801133 (C677T) гена MTHFR шанс необходимости выполнения повторного вмешательства увеличивается в 5,41 раза (95% ДИ 1,12–26,16, $p=0,068$) в кодоминантной модели наследования, а генотипов СТ/ТТ того же гена – в 3,06 раза (95% ДИ 1,02–9,15, $p=0,034$) в доминантной модели. В то же время наличие генотипа АС/СС полиморфизма rs1801131 (A1298C) гена MTHFR снижает шанс необходимости выполнения повторной реваскуляризации на 24% ($OR=0,24$, 95% ДИ 0,06–0,89, $p=0,025$).

Установлена связь полиморфизма rs1801131 (A1298C) гена MTHFR с шансом выполнения высокой ампутации нижних конечностей в послеоперационном периоде. Наличие генотипа СС вышеупомянутого полиморфизма снижает шанс данного исхода на 15% ($OR=0,15$, 95% ДИ 0,02–0,95, $p=0,033$) в рецессивной модели наследования.

Необходимость выполнения повторной реконструктивной операции или высокой ампутации является следствием прогрессирования ОА.

После проведения регрессионного анализа с построением и фильтрацией всех возможных моделей логистической регрессии с числом независимых переменных, не превышающим заданное, нами построено оптимальное уравнение бинарной регрессии с логит-функцией связи. Выбраны показатели с наилучшими оценками коэффициентов регрессионного уравнения и их характеристиками. В модель вошли генотип АА rs2073617 (ген TNFRSF11B (OPG)), генотип АС rs1801131 (ген MTHFR A1298C) и аллель G rs1801394 (ген MTRR A66G). Отношения шансов и их доверительные интервалы для каждого из предикторов приведены в сводной табл. 6.

Определение вероятности прогрессирования ОААНК у пациентов с СД 2-го типа после реваскуляризирующей операции осуществляется по математической формуле $Z=2,03-2,003a-2,87b-2,318c$, где Z – линейный предиктор уравнения логистической регрессии для вероятности прогрессирования атеросклероза артерий нижних конечностей; коэффициент $a=1$ при наличии генотипа АА, $a=0$ при наличии генотипа GG или GA rs2073617 (ген TNFRSF11B (OPG)); коэффициент $b=1$ при наличии генотипа АС, $b=0$ при наличии генотипа АА или СС rs1801131 (ген MTHFR A1298C); коэффициент $c=1$ при наличии аллели G, $c=0$ при наличии аллели А гена rs1801394 (ген MTRR A66G). Если Z больше, чем $-0,288$, то констатируют наличие высокой вероятности прогрессирования атеросклероза артерий нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

Данный метод обладает чувствительностью 80%, специфичностью 74,42%, точностью 75,47%.

Таблица 6
Отношения шансов для каждого из регрессоров, включенных в модель
Table 6
Odds ratios for each of the regressors included in the model

Показатель	ОШ	НГДИ	ВГДИ	p
Генотип АА rs2073617 (ген TNFRSF11B (OPG))	0,135	0,0237	0,6178	0,0145
Генотип АС rs1801131 (ген MTHFR A1298C)	0,0567	0,0136	0,1875	0,0000
Аллель G rs1801394 (ген MTRR A66G)	0,0985	0,0185	0,4037	0,0028

Примечания: ОШ – отношения шансов; НГДИ и ВГДИ – нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала для ОШ соответственно.



■ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно исследованиям Гусейновой Н.Т. с соавт., в геноме человека определено около 1500 генов болезней, мутации которых связаны с развитием того или иного заболевания. В большинстве случаев изученный механизм патогенеза касается белок-кодирующей части гена. Это значит, что при наследовании определенных мутаций в организме появляются дефектные белки. Несмотря на то что все гены человека идентифицированы и даже известна их нуклеотидная последовательность, функции значительной части из них непонятны [20]. Одновременно с этим активно развивается эпигенетика, поддерживающая мнение о том, что, начиная с внутриутробного развития, окружающие факторы изменяют экспрессию генов, полученных при рождении [21].

Немаловажную роль играют демографические и этнические особенности. Так, среди азиатов полиморфизмом гена ОПГ, связанным с ССЗ, был T950C, в то время как среди китайской популяции – T245G [22]. По данным ряда японских исследователей, среди здоровых лиц европеоидной и монголоидной расы, а американских ученых – негроидной и европеоидной расы преобладающим генотипом гена ЭТ-1 является Lys198Lys, а преобладающей аллелью – аллель Lys. Аллель 198Asn встречается чаще среди азиатов и белых европейцев, чем среди афроамериканцев, индийцев и якутов. Вероятность ее обнаружения в Южной Америке достаточно низкая [23]. Генотип ТТ полиморфизма C677T гена MTHFR чаще встречается у жителей Китая, Мексики и Южной Италии, реже – Африки [11]. Полиморфизм G894T гена eNOS ассоциирован с артериальной гипертензией среди жителей Китая и Индии, но среди жителей Восточной Азии и европейцев такой связи не обнаружено [24].

Согласно результатам выполненного нами исследования доминирующими генотипами в обследованной группе пациентов были: гетерозиготный генотип GA rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), доминантный гомозиготный генотип GG и аллель G rs5370 гена EDN-1, доминантный гомозиготный генотип GG и аллель G rs1799983 гена NOS3, доминантный гомозиготный генотип AA и аллель A rs1801131 (A1298C) гена MTHFR, генотипы CC и CT, а также аллель C rs1801133 (C677T) гена MTHFR, гетерозиготный генотип AG rs1801394 (A66G) гена MTRR и гетерозиготный генотип AG rs1805087 (A2756G) гена MTR.

При сравнении распределения генотипов и аллелей между группой относительно здоровых лиц и пациентов с ОААНК, сочетающимся с СД 2-го типа, выявлены достоверные отличия во внутригрупповом распределении изучаемых генов. Также отмечена связь вышеупомянутых генов с концентрацией кодируемых ими белков. Достоверная разница получена как при сравнении 2 групп пациентов, так и при внутригрупповом сравнении аллелей.

При анализе влияния изученных полиморфизмов на прогрессирование ОААНК среди пациентов с СД 2-го типа, которым выполнена реваскуляризирующая операция, выявлены гены-виновники. Ими являются полиморфизмы rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), rs1801394 (A66G) гена MTRR, rs1801133 (C677T) гена MTHFR. Геном, который выполняет защитную роль, является rs1801131 (A1298C) MTHFR.

Дооперационная оценка с выявлением лиц группы риска, а также динамическое наблюдение в послеоперационном периоде в группе пациентов с ОААНК, сочетающимся с СД 2-го типа, позволит установить окклюзионно-стенотическое поражение артерий до момента развития критической ишемии нижней конечности

с последующим снижением частоты высоких ампутаций, уменьшением инвалидизации и смертности, обусловленных прогрессирующим течением как СД, так и ОА.

Быстрое развитие методов диагностики и генной инженерии в медицине заставляет искать новые возможности прогнозирования результатов оперативного лечения. Увеличение спроса на диагностические параметры влечет за собой все большую их доступность.

Разработанный метод определения вероятности прогрессирования ОААНК у пациентов с СД 2-го типа после выполнения одной из реваскуляризирующих операций, заключающийся в определении полиморфизмов rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), rs1801394 (A66G) гена MTRR, rs1801133 (C677T) гена MTHFR, позволяет выявить пациентов с высоким риском прогрессирования атеросклероза. При отнесении пациента к группе высокого риска рекомендуется его регулярная диспансеризация. Проводимый в таком случае комплекс врачебных мероприятий позволит в ранние сроки диагностировать развитие повторной ишемии ранее реваскуляризированной нижней конечности и оказать необходимую медицинскую помощь, направленную на предотвращение ампутации данной ноги. Предложенный метод прост в использовании. Кроме того, интенсивное развитие молекулярно-генетических исследований в настоящее время в мире с повсеместной тенденцией к активному внедрению в клиническую практику в недалком времени сделает данный метод определения вероятности прогрессирования облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа после выполнения реваскуляризирующих операций на инфраингвинальных артериях доступным для использования в амбулаторных и стационарных условиях.

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа, генотип GA rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG) встречается достоверно чаще генотипа как GG, так и AA; генотип GG rs5370 гена EDN-1 является доминирующим, его частота достоверно выше генотипа как GT, так и TT, а аллель G обнаруживается чаще, чем аллель T; генотип GG rs1799983 гена NOS3 преобладает над генотипами TT и GT, TT – достоверно реже, аллель G – чаще аллели T; при полиморфизме rs1801131 (A1298C) гена MTHFR наблюдается преобладание генотипов AA и AC над генотипом CC, а аллели A над C; одинаково часто встречаются генотипы CC и CT rs1801133 (C677T) гена MTHFR, оба достоверно чаще, чем генотип TT, аллель C обнаруживалась чаще аллели T; генотип AA rs1801394 (A66G) гена MTRR встречался реже, чем генотипы AG и GG, а аллель G – чаще, чем аллель A; при полиморфизме rs1805087 (A2756G) гена MTRR генотип AA встречался чаще, чем генотипы AG и GG, а AG – чаще, чем GG, аллель A – чаще аллели G.
2. Концентрация остеопротегерина, эндотелина-1 и гомоцистеина в сыворотке крови пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа, достоверно превышает их значения у здоровых лиц. Концентрация ОПГ у пациентов с генотипом GA гена TNFRSF11B (OPG) достоверно выше, чем у пациентов с генотипом AA, а с аллелью G – достоверно выше, чем с аллелью A. Аллель T rs5370 гена EDN-1 связана с достоверно более высокими показателями ЭТ-1, чем аллель G.

3. Наличие генотипов GG/GA полиморфизма rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), AA/AG полиморфизма rs1801394 (A66G) гена MTRR, TT полиморфизма rs1801133 (C677T) гена MTHFR увеличивает соответственно в 5,7; 7,72 и 5,41 раза шанс выполнения повторной реваскуляризации у пациентов с облитерирующим атеросклерозом, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа, перенесших артериальную реконструкцию на инфраингвинальных артериях в связи с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей.
4. Наличие генотипа AC/CC полиморфизма rs1801131 (A1298C) гена MTHFR снижает на 24% необходимость выполнения повторной реваскуляризации у пациентов с облитерирующим атеросклерозом, сочетающимся с сахарным диабетом 2-го типа, перенесших артериальную реконструкцию на инфраингвинальных артериях в связи с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей, а генотипа CC – на 15% риск высокой ампутации нижней конечности.
5. Разработанный метод определения вероятности прогрессирования облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа после выполнения реваскуляризирующих операций на инфраингвинальных артериях, заключающийся в определении полиморфизмов rs2073617 гена TNFRSF11B (OPG), rs1801394 (A66G) гена MTRR, rs1801133 (C677T) гена MTHFR, позволяет выявить пациентов с высоким риском прогрессирования атеросклероза. При отнесении пациента к группе высокого риска рекомендуется его регулярная диспансеризация. Данный метод позволит в ранние сроки диагностировать повторную ишемию реваскуляризированной нижней конечности и оказать необходимую медицинскую помощь, направленную на предотвращение ее ампутации.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Baumgartner I., Norgren L., Fowkes F.G.R. Cardiovascular Outcomes After Lower Extremity Endovascular or Surgical Revascularization: The EUCLID Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;2 (72(14)):1563–1572. doi: 10.1016/j.jacc.2018.07.046
2. Davydchik E.H.V. Prediction of an adverse outcome of coronary heart disease in patients suffering from type 2 diabetes mellitus. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2019;17(6):644–649. doi: 10.25298/2221-8785-2019-17-6-644-649. (in Russian)
3. Ragino J., Kashtanova E.V., Murashov I.S., Volkov A.M., Kurguzov A.V., Sadovskij E.V., Maslakov N.A., Shcherbakova L.V., Chernjavskij A.M., Polonskaja Ja.V. The Study of Biochemical Factors of Calcification of Stable and Unstable Plaques in the Coronary Arteries of Man. *Kardiologiya*. 2020;60(2):83–88. doi: 10.18087/cardio.2020.2.n775. (in Russian)
4. Strobescu-Ciobanu C., Giusca S.E., Caruntu I.D., Amalinei C., Rusu A., Cojocaru E., Popa R.F., Lupascu C.D. Osteopontin and Osteoprotegerin in atherosclerotic plaque – are they significant markers of plaque vulnerability? *RomJ Morphol Embryol*. 2020;61(3):793–801. doi: 10.47162/RJME.61.3.17
5. Banecki K.M.R.M., Dora K.A. Endothelin-1 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Science*. 2023;24:11295. doi: 10.3390/ijms241411295
6. Dmour B.A., Costache A.D., Dmour A. Could Endothelin-1 Be a Promising Neurohormonal Biomarker in Acute Heart Failure? *Diagnostics*. 2023;13:2277. doi: 10.3390/diagnostics13132277
7. Chen Y., Chen L., Zhou Q. Genetic association between eNOS gene polymorphisms and risk of carotid atherosclerosis, a meta-analysis. *Herz*. 2020;46(Suppl 2):253–264. doi: 10.1007/s00059-020-04995-z
8. Podzolkova N.M., Skvortsova M.YU. Hyperhomocysteinemia: Myth or Hidden Threat? *Doktor.ru*. 2014;1:89:7–14. (in Russian)
9. Lu X., Huang R., Li S. Associations between serum betaine, methyl-metabolizing genetic polymorphisms and risk of incident type 2 diabetes: a prospective cohort study in community-dwelling Chinese adults. *Nutrients*. 2022;14(362):1–13. doi: 10.3390/nu14020362
10. Ivanov A.M., Gil'manov A.Z.H., Malyutina N.N. Polymorphism of folate cycle genes as a risk factor of hyperhomocysteinemia. *Health Risk Analysis*. 2020;4:137–146. doi: 10.21668/health.risk/2020.4.16. (in Russian)
11. Davydchik E.H.V., Snezhitskii V.A., Stepuro T.L. The level of homocysteine and polymorphisms of genes of folate exchange in patients with coronary heart disease and diabetes mellitus type 2. *Emergency cardiology and cardiovascular risks*. 2019;3(2):690–696. (in Russian)
12. Obuhovich A.R., Iaskevich N.N. Pathophysiological role of osteoprotegerin in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Journal of Grodno State Medical University*. 2022;20(2):129–136. doi: 10.25298/2221-8785-2022-20-2-129-136. (in Russian)
13. Demer L.L. Cholesterol in vascular and valvular calcification. *Circulation*. 2001;104(16):1881–1883. doi: 10.1161/circ.104.16.1881

14. Demkova K., Kozarova M., Malachovska Z. Osteoprotegerin concentration is associated with the presence and severity of peripheral arterial disease in type 2 diabetes mellitus. *Vasa*. 2018;47(2):131–135. doi: 10.1024/0301-1526/a000682
15. Shui X., Dong R., Wu Z. Association of serum sclerostin and osteoprotegerin levels with the presence, severity and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2022;11(22(1)):213. doi: 10.1186/s12872-022-02654-1
16. Daniele G., Winnier D., Mari A. The potential role of the osteopontin–osteocalcin–osteoprotegerin triad in the pathogenesis of prediabetes in humans. *Acta Diabetologica*. 2018; 55:139–148. doi: 10.1007/s00592-017-1065-z
17. Giovannini S., Tinelli G., Biscetti F. Serum high mobility group box-1 and osteoprotegerin levels are associated with peripheral arterial disease and critical limb ischemia in type 2 diabetic subjects. *Cardiovascular Diabetology*. 2017;8;16(1):99. doi: 10.1186/s12933-017-0581-z
18. Wang Y., Wang Y., Liu T. Association between endothelin-1, nitric oxid, and Gensini score in chronic coronary syndrome. *BMC Cardiovascular disorders*. 2023;23:602. doi: 10.1186/s12872-023-03625-w
19. Parshakov A.A., Zubareva N.A., Mizeva I.A. Microcirculation and biochemical markers of endothelial dysfunction after medical and surgical treatment in patients with peripheral arterial disease. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2020;19(1):35–46. doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-1-35-46. (in Russian)
20. Guseinova N.T., Mamedova R.F. Mechanisms of heredity and the role of genes in the human body. *German International Journal of Modern Science*. 2021;6:4–7. (in Russian)
21. Maksimenko L.V. Epigenetics as an evidence base of the impact of lifestyle on health and disease. *Russian Journal of Preventive Medicine*. 2019;22(2):115–120. doi: 10.17116/profmed201922021115. (in Russian)
22. Wu J., Li X., Gao F. Osteoprotegein SNP associations with coronary artery disease and ischemic stroke risk: a meta-analysis. *Bioscience reports*. 2020;40(10):BSR20202156. doi: 10.1042/BSR20202156
23. Davydchik E.H.V., Snezhitskii V.A., Stepuro T.L. The interrelation of the endothelin-1 and the polymorphism of Lys198Asn of the gene of endothelin-1 with clinical outcomes in the patients with coronary heart disease and the diabetes mellitus type 2. *Meditsinskie novosti*. 2019;6:56–59. (in Russian)
24. Siregar J., Ganie R.A., Lindarto D. Association of endothelial nitric oxide synthase gene (G894T) polymorphism and hypertension in diabetic Batakese patients. *Medicinski Glasnik*. 2020;17(2):316–319. doi: 10.17392/1088-20