

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА БЕТА-ЦЕПИ ЦИТОХРОМА b-245 НАДФН-ОКСИДАЗЫ: СВЯЗЬ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА И РИСКОМ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

© 2020 г. Ю. Э. Азарова^{1, *}, Е. Ю. Клёсова¹, И. И. Коломоец¹, В. А. Азарова²,
В. Е. Ивакин^{1, 2}, А. И. Конопля¹, А. В. Полоников¹

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, 305041 Россия

²Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Курск, 305016 Россия

*e-mail: azzzzar@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.2019 г.

После доработки 26.09.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

Изучена ассоциация SNPs rs5917471, rs5963327 и rs6610650 гена, кодирующего бета-цепь цитохрома b-245 (CYBB) НАДФН-оксидазы, с показателями редокс-гомеостаза плазмы крови и риском развития сахарного диабета 2-го типа (СД2). В исследование было включено 2086 неродственных индивидов славянского происхождения (1022 пациента с СД2 и 1064 здоровых добровольца). Генотипирование SNPs выполнено на геномном масс-спектрометре MassArray Analyzer 4. В связи с локализацией гена CYBB на X-хромосоме анализ влияния его однонуклеотидных вариантов на предрасположенность к СД2 и показатели редокс-статуса плазмы крови проводили отдельно у мужчин и женщин методом линейного регрессионного анализа, с поправкой на возраст и индекс массы тела. У мужчин установлена ассоциация аллеля T rs5963327 (OR 1.7, 95% CI 1.06–2.75, $P = 0.028$) и аллеля A rs6610650 (OR 1.71, 95% CI 1.05–2.78, $P = 0.029$) с повышенным риском развития СД2. Генотип T/T rs5963327 (OR 1.35, 95% CI 1.05–1.73, $P = 0.017$) и генотип A/A rs6610650 (OR 1.34, 95% CI 1.05–1.72, $P = 0.020$) были также ассоциированы с риском развития СД2 у женщин. Гаплотип T-T-A, включающий минорные аллели изучаемых вариантов rs5917471–rs5963327–rs6610650, ассоциировался с повышенным риском развития СД2 как у мужчин (OR 1.29, 95% CI 1.04–1.58, $P = 0.022$), так и у женщин (OR 1.27, 95% CI 1.02–1.58, $P = 0.034$). Больные СД2 имели значительно более высокое содержание перекиси водорода в плазме крови по сравнению с контрольной группой ($P < 0.05$) вне зависимости от пола, однако взаимосвязь rs5963327 и rs6610650 с повышенным содержанием окисленного глутатиона GSSG была обнаружена только у женщин. Таким образом, нами впервые выявлены ассоциации rs5963327 и rs6610650 гена CYBB с развитием СД2 и редокс-статусом больных. Исследованные полиморфные варианты гена бета-цепи цитохрома b-245 НАДФН-оксидазы могут способствовать смещению баланса в системе редокс-гомеостаза в сторону проокислительного статуса – характерной черты СД2.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, НАДФН-оксидаза, бета-цепь цитохрома b-245, глутатион, перекись кислорода, однонуклеотидный полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675820070012

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) представляет собой тяжелое хроническое заболевание, связанное с развитием гипергликемии вследствие нарушения секреции и/или действия инсулина [1]. За последние 10 лет число больных диабетом в мире увеличилось в 2 раза: с 200 млн в 2005 г. до 425 млн в 2017 г. [2]. Согласно Российскому диабетическому регистру, в нашей стране число больных СД2 превышает 4.24 млн человек и продолжает расти [3, 4].

Генетическая основа СД2 не вызывает сомнений и была подтверждена множеством крупных полногеномных и клинических исследований [5–9]. Важной составляющей патогенеза заболева-

ния служит окислительный стресс, развивающийся в результате избыточного образования активных форм кислорода (АФК) и снижения антиоксидантной защиты. В отечественных и зарубежных работах последних лет показано, что гены окислительных и антиоксидантных ферментов, обеспечивающих контроль клеточного редокс-гомеостаза, являются важными детерминантами развития СД2 и его осложнений [10–13]. Цитохром b-245, каталитическая субъединица НАДФН-оксидазы, непосредственно вовлечен в регуляцию продукции O_2^- в клетке и кодируется геном CYBB [14, 15]. В литературе описано участие CYBB в патогенезе сахарного диабета 1-го типа [16, 17], тогда как в

отношении СД2 роль этого цитохрома в основном рассматривалась с позиций влияния уровня экспрессии гена на прогрессирование заболевания и эффективность лечения [18–20]. В этой связи целью настоящего исследования стало изучение ассоциаций однонуклеотидных вариантов rs5917471, rs5963327 и rs6610650 гена *CYBB*, кодирующего бета-цепь цитохрома b-245 НАДН-оксидазы, с показателями редокс-гомеостаза плазмы крови и риском развития сахарного диабета 2-го типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования одобрен Региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете. В исследование было включено 2086 неродственных индивидов славянского происхождения, в том числе 1022 пациента с подтвержденным диагнозом СД2 (358 мужчин и 664 женщины, средний возраст 61.6 ± 5.3 года) и 1064 относительно здоровых добровольца (392 мужчин и 672 женщины, средний возраст 60.9 ± 5.7 года). Группы больных СД2 и контроля были сопоставимы по полу ($P = 0.12$) и возрасту ($P = 0.17$). В исследование приглашали больных СД2, получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи в период с ноября 2015 г. по декабрь 2018 г. Критериями включения в группу больных служили: наличие верифицированного врачом диагноза болезни, подтвержденного клинически и лабораторно-инструментально, возраст старше 35 лет, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения больных из основной выборки: выраженная степень декомпенсации СД2 или кома, наличие иммуноопосредованного или идиопатического СД 1-го типа, наличие гестационного СД, наличие специфических типов СД, таких как MODY, заболевания экзокринной части поджелудочной железы — панкреатит, травма или панкреатэктомия, опухоли поджелудочной железы, муковисцидоз, гемохроматоз, фиброкалькулезная панкреатопатия, эндокринопатии (акромегалия, синдром Кушинга, глюкагонома, феохромоцитомы, гипертиреоз, соматостатинома, альдостерома), генетические синдромы, сочетающиеся с СД (синдром Дауна, атаксия Фридрейха, хорей Гентингтона, синдром Клайнфельтера, синдром Лоренса—Муна—Бидля, миотоническая дистрофия, порфирия, синдром Прадера—Вилли, синдром Тернера), а также возраст младше 35 лет и отсутствие письменного информированного согласия на участие в проекте.

В группу здоровых индивидов приглашали доноров областной станции переливания крови, а также использовали материал наших предыдущих исследований [21]. Критериями включения

лиц в группу контроля служили: возраст старше 35 лет, нормальные значения гликемии согласно ВОЗ, 1999–2013, отсутствие тяжелых хронических заболеваний, наличие письменного информированного согласия. Критерии исключения из группы контроля: возраст младше 35 лет, гипергликемии в анамнезе, наличие тяжелых хронических заболеваний, отсутствие письменного информированного согласия.

Для проведения генетических исследований у всех больных и здоровых проводили забор 5 мл венозной крови натощак в вакуумные пробирки Vacuette с ЭДТА. Геномную ДНК выделяли колонным методом с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) на автоматической станции для экстракции белков и нуклеиновых кислот QiaCube (Qiagen). Качество выделенной ДНК оценивали по степени чистоты и концентрации раствора на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Для молекулярно-генетического анализа были отобраны три однонуклеотидных полиморфизма интронов гена *CYBB* с выраженным регуляторным потенциалом и частотой минорного аллеля не менее 5%, а именно rs5917471 ($C > T$), rs5963327 ($G > T$) и rs6610650 ($G > A$). Генотипирование вариантов гена *CYBB* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (Agena Bioscience). Дизайн мультиплекса SNPs и подбор праймеров для ПЦР и iPLEX реакций осуществляли с помощью онлайн программы MassARRAY Assay Design Suite (<https://agenacx.com>). Праймеры были синтезированы компанией Evrogen (Москва).

Для измерения содержания перекиси водорода и глутатиона проводили забор 5 мл венозной крови в вакуумные пробирки с гепарином лития, центрифугировали их 15 мин при 3500 об./мин и $t = 4^\circ\text{C}$, полученную плазму для детекции H_2O_2 аликвотировали и замораживали при -80°C . Образцы, предназначенные для измерения уровня GSH и GSSG, предварительно подвергали депротенинизации раствором трихлоруксусной кислоты, центрифугировали 5 мин при 12000 об./мин, надосадочную жидкость аликвотировали и замораживали при -80°C . Концентрации H_2O_2 и GSH/GSSG определяли флуориметрическим методом с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay kit (Cell Biolabs) и GSH/GSSG Assay kit (Abcam), соответственно, на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific).

Размер выборки рассчитывали с помощью онлайн калькулятора Genetic Association Study Power Calculator (http://csg.sph.umich.edu/abecasis/gas_power_calculator/) с учетом частоты минорных аллелей изучаемых SNPs и заболеваемости СД2 в Курской области. Для достижения статистической силы исследования 85% при по-

роговом уровне значимости ассоциаций $P = 0.05$ минимальный размер выборки больных и здоровых должен составлять не менее 1000 человек. Статистическую обработку полученных данных проводили методом логистической регрессии с поправками на возраст и индекс массы тела, с помощью онлайн программы SNPStats (<https://www.snpsstats.net/>). Тестировали пять генетических моделей: кодоминантную, доминантную, рецессивную, сверхдоминантную и log-аддитивную. Ассоциация считалась значимой при $P < 0.05$. Для анализа соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга и сравнения частот аллелей и генотипов между группами применяли точный тест Фишера. Для проверки нормальности распределения количественных биохимических показателей использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Переменные, имеющие нормальное распределение, были описаны с использованием среднего значения (Mean) и стандартного отклонения (St.Dv.) в виде $\text{Mean} \pm \text{St.Dv.}$ В качестве теста статистической значимости использовали тест Стьюдента. Показатели с ненормальным распределением описывали с использованием медианы (Median), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей, в виде: Median [Q1; Q3]. В качестве теста статистической значимости в таких случаях применяли критерий Манна–Уитни. Обнаруженные отличия групп принимались за статистически значимые при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все исследованные SNPs находились в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга ($P > 0.05$). Частоты аллелей изучаемых вариантов гена *CYBB* были сопоставимы с европейскими популяциями согласно данным проекта “1000 Genomes”, депонированных в Ensembl (<https://www.ensembl.org/>). В связи с локализацией гена *CYBB* на X-хромосоме анализ влияния его однонуклеотидных вариантов на предрасположенность к СД2 и показатели редокс-статуса плазмы крови проводили отдельно у мужчин и женщин. Результаты стратифицированного по полу анализа частот аллелей и генотипов изучаемых вариантов гена *CYBB* представлены в табл. 1.

У мужчин установлена ассоциация аллеля *T* rs5963327 (OR 1.7, 95% CI 1.06–2.75, $P = 0.028$) и аллеля *A* rs6610650 (OR 1.71, 95% CI 1.05–2.78, $P = 0.029$) с повышенным риском развития СД2. Генотипы *G/T–T/T* rs5963327 (OR 1.35, 95% CI 1.05–1.73, $P = 0.017$) и генотипы *G/A–A/A* rs6610650 (OR 1.34, 95% CI 1.05–1.72, $P = 0.020$) были также ассоциированы с риском развития СД2 у женщин (доминантная модель). Статистически значимых различий в частотах генотипов rs5917471 между группами больных СД2 и здоровых не установлено ($P > 0.05$).

Анализ гаметического неравновесия по сцеплению показал, что rs5917471, rs5963327 и rs6610650 сцеплены между собой ($D' = 0.999$, $P < 0.0001$). Результаты анализа частот гаплотипов у больных и здоровых представлены в табл. 2. Гаплотип *T–T–A*, включающий минорные аллели изучаемых вариантов rs5917471–rs5963327–rs6610650, ассоциировался с повышенным риском развития СД2 как у мужчин (OR 1.29, 95% CI 1.04–1.58, $P = 0.022$), так и у женщин (OR 1.27, 95% CI 1.02–1.58, $P = 0.034$) независимо от возраста и индекса массы тела (ИМТ) пациентов.

Оценка редокс-статуса 636 участников исследования (табл. 3) показала, что уровень перекиси водорода в плазме 128 больных СД2 мужчин (3.33 ± 1.31 мкмоль/л) был значительно выше такового в плазме 87 здоровых (2.78 ± 1.15 мкмоль/л, $P = 0.046$). У 299 пациенток с СД2 концентрация H_2O_2 в плазме (3.72 ± 1.43 мкмоль/л) значимо превышала таковую 122 здоровых женщин (2.83 ± 1.16 мкмоль/л, $P = 0.02$). Значимых различий по концентрации восстановленного, окисленного и общего глутатиона между больными и здоровыми установлено не было ($P > 0.05$).

Однако при анализе взаимосвязей между генотипами *CYBB* и биохимическими показателями редокс-статуса больных СД2 было обнаружено, что генотипы *G/T–T/T* rs5963327, а также генотипы *G/A–A/A* rs6610650 ассоциированы с повышением уровня окисленного глутатиона GSSG в плазме на 2.54 мкмоль/л (95% CI 0.12–4.97, $P = 0.047$) исключительно у больных СД2 женщин.

ОБСУЖДЕНИЕ

НАДФН-оксидаза — это главный фермент прооксидантной системы, основная функция которого заключается в генерации супероксид-аниона: $\text{НАДФН} + 2\text{O}_2 = 2\text{O}_2^- + \text{НАДФ}^+ + \text{H}^+$. Далее, в ходе реакции дисмутации O_2^- превращается в H_2O_2 . В клетках фагоцитарного ряда активные формы кислорода используются для уничтожения интернализированных микроорганизмов, в то время как в клетках, не способных осуществлять фагоцитоз, АФК работают как важнейшие сигнальные молекулы, регулирующие процессы деления, регенерации, дифференцировки клеток, их апоптоз и организацию цитоскелета [22]. Мультибелковый комплекс НАДФН-оксидазы включает в себя два трансмембранных белка CYBA (легкая цепь цитохрома b-245), CYBB (тяжелая цепь b-245) и четыре цитозольных субъединицы NCF1 (нейтрофильный цитозольный фактор 1), NCF2 (нейтрофильный цитозольный фактор 2), NCF4 (нейтрофильный цитозольный фактор 4), RAC1/RAC2 (субстрат 1/2 родственный Ras ботулинового токсина). Каждый протомер при этом выполняет специфические функции. Так, цито-

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов изучаемых вариантов *CYBB* у больных СД2 и здоровых лиц

SNP	Аллель, генотип	Контроль, <i>n</i> (%)	Больные СД2, <i>n</i> (%)	OR (95% CI)*	<i>P</i> *
Мужчины					
rs5917471	<i>C</i>	202 (57.1)	192 (54.5)	1.00	0.51
	<i>T</i>	152 (42.9)	160 (45.5)	1.12 (0.80–1.55)	
rs5963327	<i>G</i>	338 (89.2)	291 (82.7)	1.00	0.028
	<i>T</i>	41 (10.8)	61 (17.3)	1.70 (1.06–2.75)	
rs6610650	<i>G</i>	337 (89.4)	288 (82.8)	1.00	0.029
	<i>A</i>	40 (10.6)	60 (17.2)	1.71 (1.05–2.78)	
Женщины					
rs5917471	<i>C/C</i>	207 (31.7)	188 (28.2)	1.00	0.13 ^D
	<i>C/T</i>	297 (45.5)	308 (46.2)	1.20 (0.94–1.53) ^D	
	<i>T/T</i>	149 (22.8)	170 (25.5)		
	<i>T</i>	45.6%	48.6%	1.13 (0.97–1.32)	0.11
rs5963327	<i>G/G</i>	495 (75.5)	467 (70)	1.00	0.017 ^D
	<i>G/T</i>	144 (21.9)	181 (27.1)	1.35 (1.05–1.73) ^D	
	<i>T/T</i>	17 (2.6)	19 (2.8)		
	<i>T</i>	13.6%	16.4%	1.25 (1.01–1.55)	0.04
rs6610650	<i>G/G</i>	484 (75.4)	467 (70)	1.00	0.02 ^D
	<i>G/A</i>	142 (22.1)	181 (27.1)	1.34 (1.05–1.72) ^D	
	<i>A/A</i>	16 (2.5)	19 (2.8)		
	<i>A</i>	13.6%	16.4%	1.25 (1.01–1.55)	0.04

Примечание. D – доминантная модель.

* – расчет выполнен с поправкой на возраст и ИМТ.

Таблица 2. Стратифицированный по полу анализ частот гаплотипов у больных СД2 и здоровых лиц

Гаплотипы* CYBB			Контроль	Больные СД2	OR (95% CI)**	P**
rs5917471	rs5963327	rs6610650				
Мужчины						
C	G	G	0.5769	0.5445	1.00	—
T	G	G	0.3125	0.2778	0.97 (0.82–1.15)	0.73
T	T	A	0.1106	0.1748	1.29 (1.04–1.61)	0.022
Общий P: 0.057						
Женщины						
C	G	G	0.5447	0.5147	1.00	—
T	G	G	0.319	0.3209	1.06 (0.89–1.25)	0.52
T	T	A	0.1347	0.1637	1.27 (1.02–1.58)	0.034
Общий P: 0.091						

Примечание. * – редкие гаплотипы с частотой <0.01 не показаны; ** – расчет выполнен с поправкой на возраст и ИМТ.

Таблица 3. Показатели редокс-гомеостаза у больных СД2 и здоровых лиц

Показатель	Больные СД2		Контроль		
	концентрация метаболита, мкмоль/л	<i>n</i>	концентрация метаболита, мкмоль/л	<i>n</i>	<i>P</i>
Мужчины					
H ₂ O ₂ , Mean ± St.Dv.	3.33 ± 1.31	128	2.78 ± 1.15	87	0.046
GSSG, Me[Q1; Q3]	10.22 [3.88; 11.46]	42	8.65 [6.48; 10.91]	32	0.81
GSSG/GSH, Me[Q1; Q3]	11.05 [4, 26, 12, 31]	42	9.26 [7.04; 11.64]	32	0.81
Женщины					
H ₂ O ₂ , Mean ± St.Dv.	3.72 ± 1.61	299	2.83 ± 1.16	122	0.02
GSSG, Me[Q1; Q3]	5.09 [3.00; 9.25]	33	10.18 [10.15; 10.21]	30	0.11
GSSG/GSH, Me[Q1; Q3]	4.78 [2.43; 10.03]	35	10.96 [10.93; 10.99]	32	0.09

Примечание. GSSG – окисленный глутатион; GSSG/GSH – общий глутатион.

зольные домены отвечают за ассоциацию с мембранным цитохромом b-245 и его переход из латентного в активное состояние [23], в то время как альфа- и бета-субъединицы цитохрома формируют так называемое каталитическое ядро комплекса [24]. Примечательно, что из всех субъединиц НАДФН-оксидазы только CYBB содержит домены для связывания кофакторов НАДФН, ФАД и двух молекул гема, а значит непосредственно вовлечен в перенос неспаренных электронов от молекулы НАДФН на молекулу кислорода с образованием супероксид-аниона на наружной поверхности цитоплазматической мембраны. Биоинформатический инструмент STRING (<https://string-db.org/>) позволил визуализировать белковую сеть, образуемую компонентами НАДФН-оксидазы (рис. 1).

Как видно из рис. 1, функциональными партнерами CYBB также являются DECR1 (2,4-диеноил-KoA редуктаза), ITGB2 (интегрин бета-2), ITGAM (интегрин альфа-M) и CD53 (лейкоцитарный поверхностный антиген), которые по данным ресурса Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) вместе с белками НАДФН-оксидазы участвуют в реализации иммунного ответа ($FDR = 1.02 \times 10^{-6}$) и регуляции метаболизма перекиси водорода ($FDR = 3.12 \times 10^{-6}$).

Loss-of-function мутации в гене *CYBB* приводят к развитию X-сцепленной хронической гранулематозной болезни [25–27] – первичного иммунодефицита, характеризующегося несостоятельностью реакций врожденного иммунитета. Полиморфные варианты, обладающие эффектом *gain-of-function* (в частности, rs5917471 и rs6610650), напротив, сопровождаются гиперпродукцией агрессивных свободнорадикальных частиц и снижают риск развития туберкулеза [28]. Данные о связи SNPs *CYBB* с предрасположенностью к СД2 в литературе отсутствуют. Выполненное нами исследование впервые выявило взаимосвязь rs5963327 и rs6610650 в интронах гена *CYBB* с повышенным риском разви-

тия СД2, тем самым демонстрируя потенциальную вовлеченность гена цитохрома b-245 в патогенез этого заболевания.

Проведенные в последние годы функциональные исследования свидетельствуют о том, что генетически детерминированная гиперактивность гена *CYBB* может являться важнейшим механизмом раз-

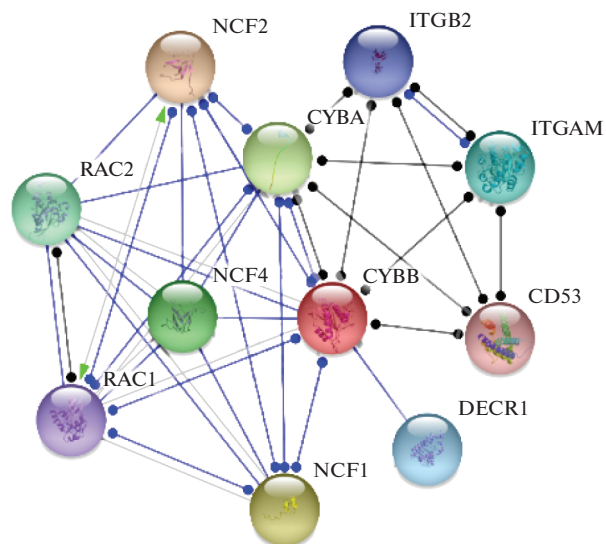


Рис. 1. Функциональные партнеры CYBB. CYBA – легкая цепь цитохрома b-245; CYBB – тяжелая цепь b-245; NCF1 – нейтрофильный цитозольный фактор 1; NCF2 – нейтрофильный цитозольный фактор 2; NCF4 – нейтрофильный цитозольный фактор 4; RAC1 – субстрат 1, родственник Ras ботулинового токсина; RAC2 – субстрат 2, родственник Ras ботулинового токсина; DECR1 – 2,4-диеноил-KoA-редуктаза; ITGB2 – интегрин бета-2; ITGAM – интегрин альфа-M; CD53 – лейкоцитарный поверхностный антиген. Синими линиями обозначено физическое взаимодействие между белками, черными – совместное участие в каталитических реакциях (данные STRING: <https://string-db.org/>).

вития оксидантного стресса. Так, L. Qin и коллеги [29] установили, что нокаут *CYBB* предотвращает чрезмерную генерацию АФК и повреждение микрोगлии по сравнению с животными, экспрессирующими *CYBB*. Последствия гиперактивности *CYBB* имеют особое значение для поджелудочной железы, печени, скелетной мускулатуры, нервной, подкожной и висцеральной жировой ткани, в которых согласно экспериментальным данным GTEx портала (<https://gtexportal.org/>) аллель *T* rs5963327 и аллель *A* rs6610650 активируют экспрессию *CYBB*. Прооксидантный статус способствует повреждению внутриклеточных сигнальных молекул, участвующих в реализации первичных эффектов инсулина в периферических тканях, а также регулирующих синтез и секрецию инсулина в бета-клетках поджелудочной железы [30–32], что в свою очередь приводит к прогрессированию инсулинорезистентности и уменьшению функционирующей массы бета-клеток — ключевых звеньев патогенеза СД2. Кроме того, в экспериментальной работе на мышах E. Pigna и соавт. [33] доказали, что дисбаланс в про- и антиоксидантной системе скорее является результатом избыточной продукции АФК на фоне гиперактивности гена *CYBB*, нежели следствием недостатка антиоксидантов. Действительно, настоящее исследование выявило увеличение содержания перекиси водорода в плазме больных СД2 мужчин и женщин, тогда как концентрация общего глутатиона и его подфракций существенно не отличалась в группе больных и здоровых индивидов. Тем не менее нами впервые была установлена связь локусов rs5963327 и rs6610650 с повышенным содержанием окисленного глутатиона, причем исключительно у женщин. Накопление GSSG само по себе является неблагоприятным фактором, запускающим S-глутатионирование ферментов антиоксидантной системы, что, например, в случае NO синтазы приводит к переключению фермента с синтеза оксида азота(II) на продукцию супероксид-аниона и таким образом провоцирует новый виток генерации АФК (эффект инь—янь) [34].

Таким образом, в проведенном нами исследовании впервые установлена ассоциация вариантов гена бета-цепи цитохрома b-245 с повышенным риском развития СД2. Механизм взаимосвязи данных вариантов с заболеванием объясняется более выраженным синтезом *CYBB* у носителей минорных аллелей rs5963327 и rs6610650, что проявляется увеличением концентрации перекиси водорода в плазме крови. Хотя нами не были выявлены значимые изменения в содержании общего глутатиона и его подфракций у больных СД2, тем не менее была показана взаимосвязь rs5963327 и rs6610650 с более высоким уровнем окисленного глутатиона у женщин. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего изучения генетико-биохимических особенностей редокс-

гомеостаза при СД2 и выяснения роли функциональных субъединиц НАДФН-оксидазы в развитии оксидантного стресса при этом заболевании.

Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Report on Diabetes: Executive Summary (no. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization, 2016.
2. Cho N., Shaw J.E., Karuranga S. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 // *Diabetes Res. Clin. Practice*. 2018. № 138. P. 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
3. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. et al. Diabetes mellitus in Russian Federation: prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the Federal Diabetes Register, status 2017 // *Diabetes Mellitus*. 2018. V. 21. № 3. P. 144–159. <https://doi.org/10.14341/DM9686>
4. Шестакова М.В., Сухарева О.Ю. Диагностика и выбор метода лечения сахарного диабета 2 типа // *Клинич. фармакол. и терапия*. 2018. Т. 27. № 2. С. 1–7.
5. Дедов И.И., Смирнова О.М., Кононенко И.В. Значение результатов полногеномных исследований для первичной профилактики сахарного диабета 2 типа и его осложнений. Персонализированный подход // *Сахарный диабет*. 2014. № 2. С. 10–19.
6. Flannick J., Florez J.C. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research // *Nat. Rev. Genet.* 2016. V. 17. № 9. P. 535.
7. Fuchsberger C., Flannick J., Teslovich T.M. et al. The genetic architecture of type 2 diabetes // *Nature*. 2016. V. 536. № 7614. P. 41.
8. Schmidt A.F., Swerdlow D.I., Holmes M.V. et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study // *The Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017. V. 5. № 2. P. 97–105. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30396-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30396-5)
9. Grarup N., Moltke I., Andersen M.K. et al. Loss-of-function variants in ADCY3 increase risk of obesity and type 2 diabetes // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 2. P. 172.
10. Бутаева С.Г., Аметов А.С., Бугров А.В., Долгов В.В. Вариативность уровня глюкозы в крови и окислительный стресс у больных сахарным диабетом 2-го

- типа на фоне комбинированной сахароснижающей терапии // Терапевт. Архив (архив до 2018 г.). 2017. Т. 89. № 10. С. 36–39.
11. *Tangvarasittichai S.* Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus // *World J. Diabetes.* 2015. V. 6. № 3. P. 456. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>
 12. *Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M. et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome // *J. Clin. Investigation.* 2017. V. 114. № 12. P. 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI121625>
 13. *Okuno Y., Fukuhara A., Hashimoto E. et al.* Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway // *Diabetes.* 2018. V. 67. № 6. P. 1113–1127. <https://doi.org/10.2337/db17-1032>
 14. *Panday A., Sahoo M.K., Osorio D., Batra S.* NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies // *Cell. Mol. Immunol.* 2015. V. 12. № 1. P. 5.
 15. *Magnani F., Nenci S., Fananas E.M. et al.* Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 26. P. 6764–6769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702293114>
 16. *Monteiro M.B., Patente T.A., Mohammedi K. et al.* Sex-specific associations of variants in regulatory regions of NADPH oxidase-2 (CYBB) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) genes with kidney disease in type 1 diabetes // *Free Radical Res.* 2013. V. 47. № 10. P. 804–810. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.828347>
 17. *Hazra S., Jarajapu Y.P.R., Stepps V. et al.* Long-term type 1 diabetes influences haematopoietic stem cells by reducing vascular repair potential and increasing inflammatory monocyte generation in a murine model // *Diabetologia.* 2013. V. 56. № 3. P. 644–653. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2781-0>
 18. *Dong Y.F., Liu L., Kataoka K. et al.* Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes // *Diabetologia.* 2010. V. 53. № 1. P. 180. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1575-5>
 19. *Yoshinari O., Takenake A., Igarashi K.* Trigonelline ameliorates oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats // *J. Med. Food.* 2013. V. 16. № 1. P. 34–41. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2311>
 20. *Takamura T., Misu H., Matsuzawa-Nagata N. et al.* Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients // *Obesity.* 2008. V. 16. № 12. P. 2601–2609. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.419>
 21. *Azarova I., Bushueva O., Konoplya A., Polonikov A.* Glutathione S-transferase genes and the risk of type 2 diabetes mellitus: Role of sexual dimorphism, gene–gene and gene–smoking interactions in disease susceptibility // *J. Diabetes.* 2018. V. 10. № 5. P. 398–407. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12623>
 22. *Manea A.* NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology // *Cell Tissue Res.* 2010. V. 342. № 3. P. 325–339. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1060-y>
 23. *Vignais P.V.* The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism // *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. V. 59. № 9. P. 1428–1459. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8520-9>
 24. *Sahoo S., Meijles D.N., Pagano P.J.* NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? // *Clin. Sci.* 2016. V. 130. № 5. P. 317–335. <https://doi.org/10.1042/CS20150087>
 25. *Bingel S.A.* Pathology of a mouse model of x-linked chronic granulomatous disease // *J. Amer. Assoc. Lab. Animal Sci.* 2002. V. 41. № 5. P. 33–38.
 26. *Barese C.N., Copelli S.B., Matteo E.D. et al.* Molecular characterization of a novel splice site mutation within the CYBB gene leading to X-linked chronic granulomatous disease // *Pediatric Blood & Cancer.* 2005. V. 44. № 4. P. 420–422. <https://doi.org/10.1002/pbc.20204>
 27. *de Boer M., van Leeuwen K., Geissler J. et al.* Primary immunodeficiency caused by an exonized retroposed gene copy inserted in the CYBB gene // *Hum. Mutat.* 2014. V. 35. № 4. P. 486–496. <https://doi.org/10.1002/humu.22519>
 28. *Bustamante J., Arias A.A., Vogt G. et al.* Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. № 3. P. 213.
 29. *Qin L., Liu Y., Hong J.S., Crews F.T.* NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration // *Glia.* 2013. V. 61. № 6. P. 855–868. <https://doi.org/10.1002/glia.22479>
 30. *Drummond G.R., Selemidis S., Griendling K.K., Sobey C.G.* Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2011. V. 10. № 6. P. 453.
 31. *Jones D.P.* Radical-free biology of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. V. 295. № 4. P. C849–C868. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>
 32. *Santos C.X., Tanaka L.Y., Wosniak J., Laurindo F.R.* Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. V. 11. № 10. P. 2409–2427. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2625>
 33. *Pigna E., Greco E., Morozzi G. et al.* Denervation does not induce muscle atrophy through oxidative stress // *Eur. J. Translat. Myology.* 2017. V. 27. № 1. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2017.6406>
 34. *Duan D.D., Kwan C.Y.* A molecular switch of “Yin and Yang”: S-glutathionylation of eNOS turns off NO synthesis and turns on superoxide generation // *Acta Pharmacol. Sinica.* 2011. V. 32. № 4. P. 415. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.21>

Polymorphisms of the Gene Encoding Cytochrome b-245 Beta Chain of NADPH Oxidase: Relationship with Redox Homeostasis Markers and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus

I. E. Azarova^{a, *}, E. Yu. Klyosova^a, I. I. Kolomoets^a, V. A. Azarova^b,
V. E. Ivakin^{a, b}, A. I. Konoplya^a, and A. V. Polonikov^a

^aKursk State Medical University, Kursk, 305041 Russia

^bKursk Emergency Hospital, Kursk, 305016 Russia

*e-mail: azzzzar@yandex.ru

The aim of the study was to investigate the associations of single-nucleotide polymorphisms (SNP) rs5917471, rs5963327 and rs6610650 of the gene encoding the beta chain of cytochrome b-245 of NADPH oxidase (*CYBB* gene) with the redox-homeostasis parameters of blood plasma and the risk of development of type 2 diabetes mellitus (T2D). The study included 2086 unrelated individuals of Slavic origin (1022 patients with T2D and 1064 healthy volunteers). Genotyping of SNPs was performed on a MassArray Analyzer 4 genomic mass spectrometer. Due to the localization of the *CYBB* gene on the X chromosome, the analysis of the effect of its single nucleotide variants on the predisposition to diabetes mellitus and the parameters of the redox status of blood plasma was carried out separately in men and women by the method of linear regression analysis, adjusted for age and body mass index. In men, the association of the allele *T* rs5963327 (OR 1.7, 95% CI 1.06–2.75, $P = 0.028$) and the allele *A* rs6610650 (OR 1.71, 95% CI 1.05–2.78, $P = 0.029$) with an increased risk of T2D development was established. Genotype *T/T* rs5963327 (OR 1.35, 95% CI 1.05–1.73, $P = 0.017$) and genotype *A/A* rs6610650 (OR 1.34, 95% CI 1.05–1.72, $P = 0.020$) were also associated with the risk of T2D development in women. The *T-T-A* haplotype, including minor alleles of the studied rs5917471–rs5963327–rs6610650 polymorphisms, was associated with an increased risk of developing diabetes mellitus in both men (OR 1.29, 95% CI 1.04–1.58, $P = 0.022$) and women (OR 1.27, 95% CI 1.02–1.58, $P = 0.034$). Patients with T2D had a significantly higher content of hydrogen peroxide in plasma compared to the control group ($P < 0.05$) regardless of sex, however, the relationship between rs5963327 and rs6610650 and the increased content of oxidized glutathione GSSG was found only in women. Thus, we detected for the first time the associations of rs5963327 and rs6610650 of the *CYBB* gene with the development of T2D and redox status of patients. The studied polymorphic variants of the gene encoding the beta chain of cytochrome b-245 of NADPH oxidase may contribute to a shift of balance in the redox homeostasis system towards the prooxidant status, characteristic of T2D.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, NADPH oxidase, cytochrome b-245 beta chain, glutathione, hydrogen peroxide, single nucleotide polymorphism.