

На правах рукописи

Тимошенко Ольга Владимировна

**БЕЛОК КЛОТО: КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У МУЖЧИН ЗАПАДНОЙ
СИБИРИ**

3.1.20. Кардиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
Член-корреспондент РАН

Рагино Юлия Игоревна

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН

Никитин Юрий Петрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент

Кашталап Василий Васильевич

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», заведующий отделом клинической кардиологии)

доктор медицинских наук

Лифшиц Галина Израилевна

(Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской академии наук, заведующая лабораторией персонализированной медицины)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (г. Москва)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2022 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.239.02 созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН (630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1, <https://iimed.ru>)

Автореферат разослан « ____ » _____ года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

С. В. Мустафина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы.

Несмотря на значительный прогресс профилактических, лечебных и реабилитационных мер в медицине распространенность и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и их осложнений в России остаются высокими [Бойцов С. А., 2017]. Среди причин, способствующих развитию ССЗ, выделяют модифицируемые и немодифицируемые факторы риска. К немодифицируемым относятся возраст, пол, отягощенная наследственность по ССЗ, к модифицируемым – дислипидемия, артериальная гипертензия (АГ), курение, сахарный диабет (СД), а также компоненты нездорового образа жизни (ожирение, гиподинамия, питание с избыточным потреблением насыщенных жиров и рафинированных углеводов) [Ежов М. В. и соавт., 2017].

В 1997 году профессор Куро-о М идентифицировал новый ген, который был назван Клото в честь древнегреческой богини, продлевающей нить жизни [Kurosu H. et al., 2005]. Белок Клото в основном продуцируется в почках, непосредственно выделяется во внеклеточное пространство и присутствует в биологических жидкостях, таких как кровь, ликвор и моча [Kuro-o M. et al., 1997]. Белок Клото относят к классу гормональных белков, он определяет функции и состояние многих обменных процессов и некоторых ионных каналов, функционирование ряда органов — паращитовидной железы, печени, сердца, поджелудочной железы [Kurosu H. et al., 2005].

Ассоциации полиморфизмов гена Клото и его белка с сердечно-сосудистой патологией в настоящее время представляют большой научный интерес и активно исследуются [Olejnik A. et al., 2018, Zewu Zhu et al., 2019]. Ряд экспериментальных публикаций дали основание предполагать, что белок Клото способен подавлять окислительный стресс [Wei Cui et al., 2018; Ungvari Z. et al., 2019; Yu S. et al., 2021], воспаление [Papaconstantinou J., 2019] и кальцификацию [Lim K. et al., 2019; Yu L. et al., 2020] – центральные процессы, которые прочно закрепились в развитии сосудистой дисфункции и атеросклероза. Участие белка Клото в регулировании продукции оксида азота и ингибирование множества белков, включая ангиотензиноген, ренин, ангиотензинпревращающий фермент и рецепторы ангиотензина II, могут оказывать существенное влияние на артериальное давление (АД) [Freundlich M. et al., 2020]. Белок Клото рассматривается как важный гуморальный фактор в системном метаболизме глюкозы *in vitro* и *in vivo* [Ohnishi M. et al., 2011; Hasannejad M. et al., 2019]. После экспериментальных и клинических исследований было установлено, что низкий уровень белка Клото ассоциирован с увеличением риска ССЗ при сахарном диабете, и возможно, может являться биомаркером сердечно-сосудистого риска [Pan H. C. et al., 2018].

Современные молекулярно-генетические исследования, дающие возможность выявить влияние некоторых полиморфизмов генов на прогрессирование атеросклеротического процесса, становятся все более актуальными. Полиморфизм rs9536314 вместе с полиморфизмом rs9527025 гена Клото ко-сегрегируется в гаплотип KL-VS, который увеличивает секрецию белка Клото и может изменять его функции. Аллель KL-VS возможно связан с сокращением продолжительности жизни [Ian J. et al., 2005; Marchelek-Myśliwiec M. et al., 2016] и может быть маркером повышенного риска развития ССЗ [Dan E. et al., 2005]. Исследователи подчеркивают важность этого полиморфизма в отношении возникновения

ишемической болезни сердца (ИБС) с ранним началом [Dan E. et al., 2003]. Однако по данным метаанализов получены довольно противоречивые ассоциации гена Клото с ССЗ в различных этнических группах [Zhang H. et al., 2017]. Выявление модифицируемых факторов сердечно-сосудистого риска, связанных с гаплотипом KL-VS, представляет особый интерес, поскольку это возможно поможет объяснить механизм, с помощью которого белок Клото оказывает воздействие на развитие ИБС.

Вышеизложенное позволяет считать актуальным изучение белка Клото в крови и полиморфизма rs9536314 гена Клото с целью поиска его ассоциаций с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с ИБС, АГ и СД.

Степень разработанности темы

Работ, изучающих связь белка Клото в крови и полиморфизма rs9536314 гена Клото с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с ИБС, АГ и СД, как в зарубежной, так и в отечественной литературе недостаточно. Имеются данные о том, что низкие уровни белка Клото сопряжены как с повышенной заболеваемостью ИБС, так и с выраженностью атеросклеротического поражения артерий [Semba R.D. et al., 2011; Olejnik A. et al., 2018; Olejnik A. et al., 2020]. Показано, что высокий уровень белка Клото может вносить существенный вклад в протекцию эндотелия, повышая синтез оксида азота и артериальную вазодилатацию [Chung S.P. et al., 2017; Donato A.J. et al., 2018]. Имеются данные о том, что сосудистая кальцификация может быть блокирована сверхэкспрессией белка Клото [Yu L. et al., 2020; Hu M.C. et al., 2013; Shiraki-Iida T. et al., 2000]. Непосредственная или опосредованная связь белка Клото с липидным обменом и атерогенезом остается малоизученной. В экспериментальных работах введение белка Клото было связано с повышением уровня общего холестерина (ОХС) в крови и уменьшением уровня триглицеридов (ТГ) [Kamari Y. et al., 2016].

Известно, что уровень АД напрямую ассоциирован с риском ССЗ [Чазова И.Е. и соавт., 2019]. По данным некоторых исследователей снижение белка Клото способствует развитию жесткости артериальной стенки [Ferrucci L. et al., 2002] и повышению АД [Diansa Gao et al., 2016].

В литературе имеется достаточно широкий спектр исследований, в том числе и в отечественной, о том, что низкий уровень белка Клото связан с хронической болезнью почек, и его дефицит ассоциирован с повышением риска развития ССЗ при патологии почек [Javier A., 2017; Di Zou et al., 2018; Милованова Л.Ю. и соавт., 2020]. Важно отметить, что эти ассоциации остаются и среди обследованных с сохранной функцией почек [Navarro-González J.F. et al., 2014].

При изучении участия белка Клото в метаболизме глюкозы, было установлено, что белок Клото экспрессируется в островках поджелудочной железы и оказывает ингибирующее влияние на активность инсулина, препятствуя аутофосфорилированию рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1. Таким образом, развивается резистентность к инсулину в жировой ткани [Kurosu H. et al., 2005]. В ряде зарубежных исследований было предположено, что снижение уровня белка Клото в крови может отражать прогрессирование СД [Zhang L. et al., 2018; Donate-Correa J. et al., 2019],

увеличивать риск ССЗ при диабете, и может быть использовано в качестве биомаркера микро- и макрососудистых осложнений при СД [Pan H.C. et al., 2018].

В мировой литературе имеются данные о взаимосвязи факторов риска ССЗ и белка Клото. Так, Francisco J Amaro-Gahete с соавторами в исследовании FIT-AGEING показали, что уровни физической активности и физической подготовки связаны с концентрацией белка Клото в крови у людей среднего возраста. Уровень белка Клото в крови обратно пропорционально связан с кардиометаболическим риском и инсулинорезистентностью как у мужчин, так и у женщин независимо от возраста, физической подготовки и питания [Amaro-Gahete F.J. et al., 2020].

Во многих работах подчеркивается возможность использования белка Клото в качестве потенциальной терапевтической мишени для лечения различных заболеваний, в том числе кардиоваскулярных [Saito Y. et al., 2000; Xie J. et al., 2015], артериальной гипертензии [Navarro-González J.F. et al., 2015], сахарного диабета [Gu H. et al., 2020] и патологии почек [Милованова Л.Ю. и соавт., 2020].

Ряд исследований указывают на значительную связь между полиморфизмом KL-VS (rs9536314) гена Клото и риском развития ССЗ, в том числе ИБС с ранним началом. Гаплотип KL-VS ассоциирован с повышенным уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВ) в крови и высоким систолическим АД. В работе Arking D.E. и соавторов индивидуумы с гомозиготным вариантом KL-VS имели наибольший риск атеросклероз ассоциированных заболеваний [Dan E. et al., 2003; Dan E. et al., 2005]. Имеются и противоположные данные, так среди корейского населения не было выявлено взаимосвязи полиморфизма rs9536314 гена Клото с атеросклерозом коронарных артерий [Rhee E.J. et al., 2006]. Предполагается, что полиморфизм KL-VS гена Клото может увеличить риск скрытой ИБС, по крайней мере, частично, из-за снижения производства оксида азота и развития эндотелиальной дисфункции [Saito Y. et al., 2000; Fukino K. et al., 2002]. В литературе не встречаются данные о связях полиморфизмов rs9536314 гена Клото с уровнем белка Клото в крови у мужчин с ИБС и АГ.

Цель исследования

Изучить содержание и ассоциации белка Клото в крови и полиморфизм rs9536314 гена Клото у мужчин разного возраста с ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и сахарным диабетом, а также с кардиометаболическими факторами риска.

Задачи исследования

1. Исследовать особенности уровней белка Клото в крови и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с ишемической болезнью сердца.
2. Определить количественное содержание белка Клото в крови и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с артериальной гипертензией.
3. Изучить содержание белка Клото в крови и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с сахарным диабетом.
4. Определить частоту аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото у мужчин в клинической группе и в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири. Выполнить анализ ассоциации аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото с уровнем белка Клото в крови и рядом биохимических и клинических показателей.

Научная новизна

Проведено исследование белка Клото в крови и полиморфизма rs9536314 гена Клото с целью выявления их ассоциаций с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией и сахарным диабетом.

Впервые в России показано, что у мужчин с ИБС уровни белка Клото в крови ниже при сниженной физической активности, ожирении, сахарном диабете и повышенном коэффициенте атерогенности в 2,2; 1,3; 1,2 и 1,3 раза соответственно. Обнаружено, что у мужчин с ИБС белок Клото имеет положительные корреляционные связи с возрастом и наличием регулярной физической активности; отрицательные корреляционные связи с систолическим артериальным давлением, сахарным диабетом, индексом массы тела и соотношением окружности талии к окружности бедер.

Впервые в России определены такие особенности ассоциаций белка Клото в крови у мужчин с ИБС и липидными нарушениями, как положительная корреляционная связь с ХС ЛВП и отрицательная связь с коэффициентом атерогенности, которые могут предполагать наличие антиатерогенных свойств у белка Клото у мужчин.

Изучены ранее не исследованные аспекты значений и изменений белка Клото при артериальной гипертензии. Выявлено, что белок Клото в крови мужчин с АГ значительно ниже при наличии ожирения, у лиц с низкой физической активностью и при сочетании с сахарным диабетом в 1,3; 2,2 и 1,4 раза соответственно. Обнаружено, что белок Клото у мужчин с АГ имеет положительную корреляцию с регулярной физической нагрузкой и обратные корреляции с сахарным диабетом и ожирением.

В России ранее не исследовалось содержание белка Клото у лиц с сахарным диабетом. Мы выявили, что содержание белка Клото у мужчин с сахарным диабетом 2 типа ниже в 1,4 раза, чем у мужчин без СД. У мужчин с СД белок Клото в крови значительно ниже у лиц среднего возраста или при скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73м² в 1,4 и в 4 раза соответственно. Обнаружено, что у мужчин с СД белок Клото имеет отрицательную корреляцию с наличием абдоминального ожирения.

Определена положительная ассоциация белка Клото с регулярной физической нагрузкой и обратные ассоциации с СД и ИМТ более или равно 30 кг/м², вне зависимости от других факторов риска. При наличии в модели СД была установлена обратная ассоциация со СКФ менее 60 мл/мин/1,73м², при исключении из модели ИБС определялась прямая ассоциация с коэффициентом атерогенности более 3,5 ммоль/л.

Ранее в России не выполнялись исследования полиморфизмов гена Клото. Нами выполнен анализ частоты аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири. Впервые показано, что частота генотипов (ТТ, ТG и GG) и аллелей (Т и G) полиморфизма rs9536314 гена Клото у мужчин клинической группы (с ИБС и с АГ) статистически значимо не отличается по распространенности генотипов (ТТ, ТG и GG) и аллелей (Т и G) полиморфизма rs9536314 гена Клото от популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири, популяций Западной и Восточной Европы. Уровни белка Клото в крови у мужчин с ИБС и АГ не различаются в аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделях для генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты изучения содержания белка Клото в крови позволили прийти к выводу, что у мужчин с ИБС и со сниженной физической активностью или с ожирением, или с сахарным диабетом 2 типа, или с повышенным уровнем коэффициента атерогенности содержание белка Клото в крови снижено.

Также показано, что уровень белка Клото в крови ниже у мужчин с артериальной гипертонией в сочетании со сниженной физической активностью или с ожирением, или с сахарным диабетом 2 типа.

Определено, что у мужчин с сахарным диабетом 2 типа содержание белка Клото в крови значительно ниже, чем у мужчин без сахарного диабета. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у мужчин с сахарным диабетом 2 типа содержание белка Клото в крови снижено в 4 раза и ассоциировано со скоростью клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73м². Что является неблагоприятным фактором в отношении функции почек.

Практической значимостью исследования являются результаты, указывающие, на важность измерения уровня в крови белка Клото у мужчин с СД 2 типа, так как его значение менее или равно 118 пг/мл ассоциировано со сниженной СКФ. Кроме того, мужчинам с ишемической болезнью сердца и с артериальной гипертонией рекомендуется соблюдать регулярный режим физической активности, контролировать массу тела и содержание глюкозы в крови для предотвращения снижения уровня белка Клото.

Положения, выносимые на защиту

1. У мужчин с ИБС и у мужчин с АГ уровни в крови белка Клото более низкие при наличии у них сниженной физической активности или сахарного диабета или ожирения.
2. У мужчин с СД уровни белка Клото в крови ниже, особенно у лиц со снижением скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73м², чем у мужчин без СД.
3. Уровни белка Клото прямо ассоциированы с наличием регулярной физической нагрузки и обратно ассоциированы с наличием ожирения, сахарного диабета и со снижением СКФ менее 60 мл/мин/1,73м².
4. Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото у мужчин с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией не отличается по распространенности аллелей и генотипов от популяции Западной Сибири, популяций Западной и Восточной Европы.

Степень достоверности и апробации результатов

Материалы, представленные в диссертации, основаны на обследовании 98 пациентов (с ИБС). Объем выборки рассчитывался при помощи формулы:

$$N = 2 * (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / (SD/d)^2, \quad (1)$$

где: N – рассчитываемый объем выборки;

$Z_{\alpha/2}$ и Z_{β} – значения распределения при вероятности $\alpha/2$ и β соответственно;

d – клинически значимая разность групповых средних значений;

SD – среднеквадратическое отклонение.

Клинически значимая разность групповых значений и среднеквадратичное отклонение были взяты из имеющихся данных литературы по исследованиям белка Клото [Keles N. et al., 2015; Bergmark B.A. et al., 2019]. По этой формуле минимальный объем выборки пациентов с ишемической болезнью сердца составил 90 человек.

Для изучения частоты распространенности аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото в европеоидной популяции Западной Сибири сформирована выборка методом случайных чисел из 219 человек. Объем выборки рассчитывался с использованием формулы [Bland M., 2000]:

$$N_{\min} = 15.4 * (p * (1-p)) / W^2, \quad (2)$$

где: p – ожидаемое значение вероятности случайного события – 15 % (0,15) по базе данных gnomAD [URL: https://gnomad.broadinstitute.org/variant/13-33628138-T-G?dataset=gnomad_r2_1];

W – ширина доверительного интервала для значения вероятности (0,1).

По этой формуле минимальный необходимый объем выборки для проведения молекулярно-генетического анализа популяции взрослого населения г. Новосибирска составил 196 человек.

Достоверность результатов диссертации обусловлена адекватно поставленными задачами в соответствии с целью работы, использовании современных клинических и лабораторных методик. Проведена статистическая обработка результатов.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ: 6 статей в центральных российских журналах, рекомендованных Перечнем Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации, из них 1 статья в журнале, входящем в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 155 страницах машинописного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 7 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, главы результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы и списка иллюстративного материала. Список цитируемой литературы включает 235 источника, в том числе 28 российских и 207 зарубежных.

Личный вклад автора

Автором лично набраны и клинически обследованы пациенты для исследования. Подготовлены образцы крови для биохимических, иммуноферментных и молекулярно-генетических исследований. Автором создана база данных на основании протоколов и полученных результатов, проведены статистическая обработка материала, анализ и научная интерпретация полученных результатов. В соавторстве были написаны и опубликованы все печатные работы в журналах, рекомендованных перечнем Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации, в которых отражены полученные результаты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайном диссертационной работы является одномоментное клиническое наблюдательное исследование. Все пациенты заполняли форму Информированного согласия на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Исследование проведено в НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО и ГБУЗ НСО Госпитале ветеранов войн № 3. Исследование было одобрено Этическими комитетами обоих учреждений.

Всего отобрано 178 человек, находящихся на лечении в вышеуказанных учреждениях. Критериями включения были: мужчины в возрасте 50-65 лет (I возрастная группа) и старше 80 лет (II возрастная группа), наличие диагноза ИБС и/или АГ и/или СД 2 типа. Возрастные группы выбраны в интересах сопоставимости наших результатов в Сибири с работами, которые проводились в европейской части России [Милованова Л.Ю., 2017] и за рубежом: в Италии [Semba R.D. et al., 2012], Испании [Amaro-Gahete F.J., 2020], США [Saghiv M. et al., 2016] и других. Группу сравнения составили мужчины без ИБС в возрасте 50-65 лет и старше 80 лет, у которых могли присутствовать или отсутствовать АГ и/или СД 2 типа.

Критерии исключения: возраст менее 50 лет и 66-79 лет; женский пол; клинически значимая тяжелая сопутствующая патология в острой или стадии обострения; нарушения мозгового кровообращения в анамнезе, известные активные онкологические заболевания; патологии паращитовидной и щитовидной желез; снижение СКФ менее 30 мл/мин/1,73м²; прием витамина D, глюкокортикостероидов, препаратов кальция, злоупотребление алкоголем (употребление 168 г и более чистого этанола в неделю).

Из 178 пациентов, включенных в исследование, диагноз ИБС был констатирован у 98 мужчин, средний возраст ($64,1 \pm 11,4$) лет. I возрастная группа состояла из 74 мужчин 50–65 лет, средний возраст ($58,0 \pm 4,1$) лет; во II возрастную группу (старше 80 лет) включены 24 мужчины, средний возраст ($82,8 \pm 2,9$) лет. Диагноз ИБС был установлен ранее в соответствии с российскими клиническими рекомендациями (Стабильная ишемическая болезнь сердца. 2020 г.) Группу сравнения составили 80 человек, которые не имели ИБС, средний возраст ($68,1 \pm 14,4$) лет. I возрастная группа состояла из 41 мужчины 50–65 лет, средний возраст ($54,6 \pm 4,7$) лет; во II возрастную группу (старше 80 лет) включены 39 мужчин, средний возраст ($82,3 \pm 2,8$) лет.

Среди всех 178 пациентов диагноз АГ выявлен у 134 мужчин, средний возраст ($66,8 \pm 12,9$) лет. В I возрастную группу вошли 84 мужчины, средний возраст ($57,3 \pm 4,6$) лет; во II возрастную группу – 50 мужчин, средний возраст ($82,6 \pm 3,0$) лет. Диагноз АГ был установлен ранее в соответствии с российскими клиническими рекомендациями (Артериальная гипертензия у взрослых. 2020 г.). В группе сравнения оказались 44 человека из общего числа 178 обследованных, у которых не было артериальной гипертонии – средний возраст ($63,3 \pm 12,8$) лет. I возрастная группа состояла из 31 мужчины, средний возраст ($55,5 \pm 4,5$) лет; во II возрастную группу включены 13 мужчин, средний возраст ($82,0 \pm 2,0$) лет.

Сахарный диабет 2 типа констатирован у 37 мужчин из 178 лиц, прошедших скрининг, средний возраст ($62,9 \pm 10,3$) лет. I возрастная группа состояла из 30 мужчин, средний возраст ($58,5 \pm 4,5$) лет; во II возрастную группу включены 7 мужчин, средний возраст ($82,1 \pm 2,5$) лет. Диагноз СД 2 типа не являлся впервые выявленным и был установлен ранее в соответствии с российскими клиническими рекомендациями (Сахарный диабет 2 типа у взрослых. 2019 г.). Группу сравнения составили 144 человека, у которых не было СД 2 типа, средний возраст ($66,7 \pm 13,5$) лет. I возрастная группа состояла из 85 мужчин, средний возраст ($56,2 \pm 4,5$) лет; во II возрастную группу включены 56 мужчин, средний возраст ($82,5 \pm 2,9$) лет. Распределение обследованных мужчин по клиническим группам представлено на рисунке 1.

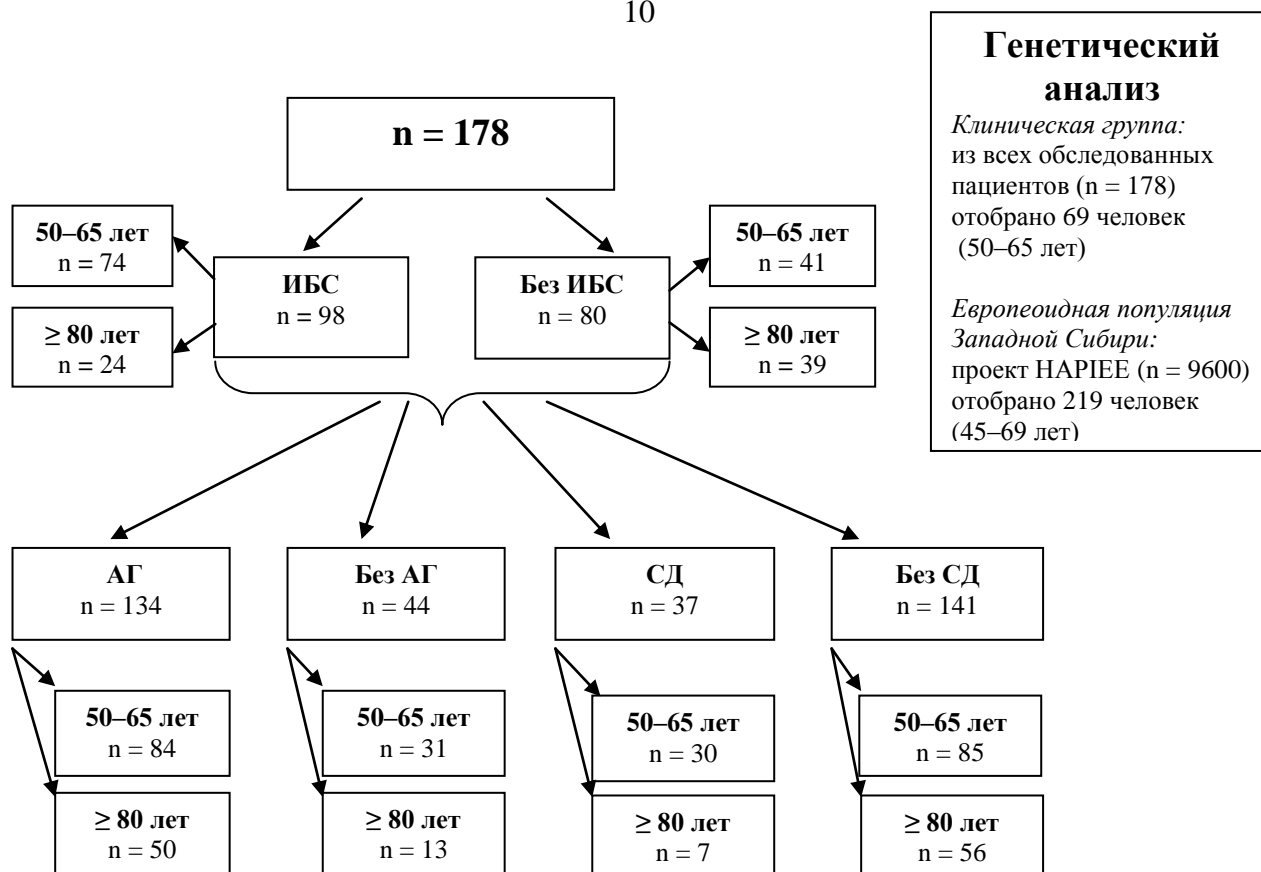


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Клиническое и лабораторное обследование пациентов

Обследование всех включенных в исследование выполнялось по единому протоколу, согласно которому собраны анамнестические и демографические данные, информация о семейном анамнезе, медикаментозном лечении, употреблении алкоголя и курении, физической нагрузке, проведен физикальный осмотр, клиничко-инструментальное обследование, осуществлен забор крови для клиничко-биохимических анализов.

Исследование белка Клото проводили методом иммуноферментного анализа с использованием тест систем ELISAs предназначенных для научных исследований (ELISA Kit for Human Klotho, «Cloud-Clone Corp.», США; Human Klotho ELISA Kit, «WuhanFineBiotechCo. Ltd», Китай) на анализаторе Multiscan EX (Финляндия).

В сыворотке крови определяли ОХС, ХС ЛВП, ТГ, глюкозу, креатинин, кальций и фосфор. Оценены расчетные параметры: уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП), уровень холестерина липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛОНП), уровень ХС неЛВП, коэффициент атерогенности. Уровень липопротеина (а) определяли иммуноферментным методом с использованием набора Assay Max Human Lp(a) ELISA Assay Pro, USA. СКФ рассчитывалась по формуле СКД-ЕРІ.

Генетические методы исследования

На первом этапе была определена частота аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири. Из основной выборки взрослого населения г. Новосибирска (9360 человек) в рамках одномоментного эпидемиологического обследования НАРИЕЕ методом случайных чисел были отобраны 288 человек. Для проведения молекулярно-генетического исследования

оказались доступны 219 человек (2,3%). На втором этапе мы сопоставили данные по частоте выявления аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото в клинической группе из нашего исследования с данными по распространенности аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото в популяции взрослого населения г. Новосибирска. Из общего числа включенных в исследование лиц, у которых были определены уровни белка Клото, для молекулярно-генетического исследования полиморфизма rs9536314 гена Клото были доступны 69 образцов ДНК, что составило 38,8%.

Для выделения ДНК из крови использовали метод фенол-хлороформной экстракции. Полиморфизм rs9536314 (F325V) гена Клото анализировали по стандартной методике (использованные праймеры: 5'-accg-acca-cagc-atca-aaga-3' и 5'-atga-actt-tttc-tcag-attc-agtc-g-3'). Геномную ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции в стандартной реакционной смеси и далее гидролизовали рестриктазой TaqI В. Визуализацию продуктов рестрикции проводили методом гель-электрофореза в 5% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и сканирования геля с помощью системы компьютерной видеосъемки.

Статистическая обработка

Полученные результаты статистически обработаны с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics (версия 20.0). Для описания показателей, представленных в виде альтернативных переменных, приведены число наблюдений и доля пациентов (в процентах). Характер распределения количественных признаков определяли методом Колмогорова-Смирнова. При ненормальном распределении признаков независимые переменные в двух группах сравнивали при помощи непараметрического U-критерия Mann-Whitney. Полученные результаты показаны в виде медианы (Me) с указанием межквартильного размаха – 25-й и 75-й процентиля. Сравнения групп с нормальным распределением проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для описания показателей, представленных в виде количественных переменных, использовали среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для анализа зависимости количественных признаков выборочных данных из совокупностей применяли ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Значимость различий в частотах аллелей между исследуемыми подгруппами и соответствие равновесию Харди – Вайнберга определяли с помощью критерия χ^2 . Оценка ассоциаций признаков проведена с помощью множественного линейного регрессионного анализа. Различия данных считали статистически значимыми при ($p \leq 0,05$).

Клиническая характеристика групп пациентов

Проанализированы клиничко-anamnestические данные пациентов с ИБС и без ИБС. У мужчин с ИБС было оценено количество и давность инфарктов миокарда, наличие стенокардии напряжения и её функциональный класс, наличие артериальной гипертензии, ее степень и стадия. Пациенты основной группы и группы сравнения не имели различий по возрасту; по частоте употребления алкоголя; по доли лиц, занимающихся регулярными физическими нагрузками; по частоте мужчин с отягощенной наследственностью по ССЗ; по количеству лиц с абдоминальным ожирением, СД и хронической сердечной недостаточностью. В группе с ИБС выявлено больше курящих, лиц с ожирением, артериальной гипертензией и дислипидемией, чем в группе без ИБС (таблица 1).

Клинико-anamнестические данные пациентов

Параметры	Группа с ИБС, n = 98	Группа без ИБС, n = 80	p
Возраст, лет; (M ± SD/Me [25; 75])	64,1 ± 11,4 60,0 [55,8; 68,8]	68,1 ± 14,4 64,5 [54,0; 81,0]	0,447
Курение (в настоящее время), n (%)	31 (32 %)	7 (9 %)	0,001
Употребление алкоголя, n (%)	38 (39 %)	29 (36 %)	0,730
Отягощенная наследственность по ССЗ, n (%)	27 (28 %)	14 (18 %)	0,114
Регулярная физическая нагрузка, n (%)	26 (27 %)	28 (35 %)	0,296
ОТ, см; (M ± SD/Me [25; 75])	95,5 ± 11,6 94,0 [86,0; 105,0]	91,4 ± 11,9 90,0 [82,0; 99,0]	0,023
ОБ, см; (M ± SD/Me [25; 75])	95,8 ± 10,6 94,0 [89,0; 105,0]	93,9 ± 7,9 93,0 [88,3;100,0]	0,183
ОТ/ОБ, (M ± SD/Me [25; 75])	1,04 ± 0,15 1,02 [0,95; 1,07]	0,97 ± 0,09 0,97 [0,92; 1,03]	0,0001
ОТ > 94 см; n (%)	46 (47 %)	31 (39 %)	0,273
ОТ/ОБ > 0,94; n (%)	79 (81 %)	50 (63 %)	0,061
ИМТ, кг/м ² ; (M ± SD/Me [25; 75])	27,5 ± 4,5	25,7 ± 3,8	0,018
Избыточный вес (ИМТ 25–29,9 кг/м ²), n (%)	38 (39 %)	39 (49 %)	0,182
Ожирение (ИМТ ≥ 30) кг/м ² ; n (%)	29 (30 %)	10 (13 %)	0,007
1 степень (ИМТ = 30–34,9) кг/м ² ; n (%)	23 (23 %)	10 (13 %)	0,062
2 степень (ИМТ = 35–39,9) г/м ² ; n (%)	5 (5 %)	—	—
3 степень (ИМТ ≥ 40) кг/м ² ; n (%)	1 (1 %)	—	—
Инфаркт миокарда в анамнезе	73 (74 %)	0	—
Количество инфарктов миокарда в анамнезе:			
Один инфаркт миокарда, n (%)	62 (85 %)	0	—
Два инфаркт миокарда и более, n (%)	11 (15 %)	0	—
Давность инфаркта миокарда:			
менее 5 лет, n (%)	25 (34 %)	0	—
5–10 лет, n (%)	28 (38 %)	0	—
более 10 лет, n (%)	20 (28 %)	0	—
Стабильная стенокардия напряжения:			
I функциональный класс, n (%)	89 (91 %)	0	—
II функциональный класс, n (%)	47 (53 %)	0	—
III функциональный класс, n (%)	40 (45 %)	0	—
IV функциональный класс, n (%)	2 (2 %)	0	—
IV функциональный класс, n (%)	0	0	—
Давность развития стенокардии:			
менее 5 лет, n (%)	24 (27 %)	0	—
5–10 лет, n (%)	41 (46 %)	0	—

Параметры	Группа с ИБС, n = 98	Группа без ИБС, n = 80	p
более 10 лет, n (%)	24 (27 %)	0	—
Реваскуляризация коронарных артерий, n (%)	78 (80 %)	0	—
Нарушения ритма сердца, n (%)	7 (7 %)	8 (8 %)	0,785
Систолическое АД, мм рт. ст., (M ± SD / Me [25; 75])	131,7 ± 15,3 130,0 [123,0; 142,3]	126,5 ± 15,2 125,0 [115,0; 140,0]	0,024
Диастолическое АД, мм рт. ст., (M ± SD / Me [25; 75])	80,9 ± 10,9 80,0 [70,0; 90,0]	80,1 ± 10,9 68,0 [64,0; 72,0]	0,618
ЧСС, уд/мин, (M ± SD / Me [25; 75])	68,1 ± 8,5 67,0 [64,0; 70,3]	68,8 ± 8,3 68,0 [64,0; 72,0]	0,550
Артериальная гипертония, n (%)	80 (82 %)	54 (68 %)	0,030
1 степень (140–159/90–99 мм рт. ст.); n (%)	9 (11 %)	5 (9 %)	0,471
2 степень (160–179/100–109 мм рт. ст.); n (%)	15 (19 %)	8 (15 %)	0,295
3 степень (≥ 180/≥ 110 мм рт. ст.); n (%)	56 (70 %)	41 (76 %)	0,266
Гипертоническая болезнь			
I стадии, n (%)	—	8 (15 %)	—
II стадии, n (%)	—	46 (85 %)	—
III стадии, n (%)	80 (100 %)	—	—
Хроническая сердечная недостаточность:			
I степень, n (%)	51 (52 %)	31 (57 %)	0,223
II степень, n (%)	47 (48 %)	23 (43 %)	0,289
III степень, n (%)	—	—	—
Функциональный класс хронической сердечной недостаточности (NYHA):			
I функциональный класс, n (%)	51 (52 %)	31 (57 %)	0,223
II функциональный класс, n (%)	47 (48 %)	23 (43 %)	0,289
III функциональный класс, n (%)	—	—	—
Сахарный диабет 2 типа, n (%)	23 (24 %)	14 (18 %)	0,329
СКФ			
≥ 90 мл/мин/1,73м ² ; n (%)	24 (24 %)	15 (19 %)	0,086
60–89 мл/мин/1,73м ² ; n (%)	48 (49 %)	43 (54 %)	0,207
< 60 мл/мин/1,73м ² ; n (%)	11 (11 %)	19 (24 %)	0,188
45–59 мл/мин/1,73м ² ; n (%)	8 (8 %)	18 (22 %)	0,765
30–44 мл/мин/1,73м ² ; n (%)	3 (3 %)	1 (1 %)	0,180
Дислипидемия, n (%)	81 (83 %)	39 (49 %)	0,001
Коэффициент атерогенности > 3,5	46 (47 %)	40 (50 %)	0,920
Статинотерапия	40 (41 %)	18 (23 %)	0,0001

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни белка Клото в крови и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с ишемической болезнью сердца

В рамках данной работы был проведен анализ уровней белка Клото в группах мужчин с ИБС и без ИБС. Обнаружено, что у мужчин с ИБС уровни белка Клото в крови были в 1,2 раза ниже по сравнению группой мужчин без ИБС, но различия были статистически не значимые – 444 пг/мл [229; 683] и 524 пг/мл [259; 1064], ($p = 0,243$).

Полученные нами результаты относительно более низких значений белка Клото в крови у пациентов с ИБС не противоречат данным других исследователей. Так, в популяционном исследовании Semba et al. определили, что частота ИБС выше при более низких уровнях белка Клото, но также получили статистически не значимые различия. Вероятность ССЗ в совокупности, таких как ИБС, сердечная недостаточность, инсульт, атеросклероз периферических артерий и АГ, была независимо связана с более низкими уровнями белка Клото в крови [Semba R. D. et al., 2011].

Среди обследованных мужчин с ИБС, у которых отсутствовали регулярные физические нагрузки, содержание белка Клото в крови было в 2,2 раза ниже, чем у лиц, указавших на присутствие регулярных физических нагрузок – 415 пг/мл [158; 535] и 921 пг/мл [430; 1269], ($p < 0,0001$). У мужчин с ИМТ ≥ 30 кг/м² белок Клото был в 1,3 раза ниже, чем у мужчин без ожирения – 374 пг/мл [118; 508] и 501 пг/мл [345; 825], ($p = 0,005$). У мужчин при сочетании ИБС с СД уровни белка Клото были ниже в 1,2 раза, чем у обследованных с ИБС и без диабета – 379 пг/мл [150; 516] и 471 пг/мл [312; 844], ($p = 0,049$). Отмечено, что содержание белка Клото при повышенном коэффициенте атерогенности у лиц с ИБС ниже в 1,3 раза, чем у лиц с нормальным показателем коэффициента атерогенности – 399 пг/мл [150; 572] и 508 пг/мл [357; 723], ($p = 0,046$).

В группе без ИБС уровни белка Клото у лиц без регулярных физических нагрузок, были в 2,5 раза ниже, чем у лиц, указавших на присутствие регулярных физических нагрузок – 400 пг/мл [199; 716] и 988 пг/мл [609; 1590], ($p = 0,001$). При наличии СД белок Клото был в 1,3 раза ниже, чем у мужчин без СД – 240 пг/мл [106; 464] и 676 пг/мл [322; 1180], ($p = 0,004$). Выявлено более низкое содержание белка Клото при нормальном коэффициенте атерогенности, чем у лиц с повышенным показателем коэффициента атерогенности – 471 пг/мл [153; 778] и 705 пг/мл [358; 1389], ($p = 0,027$). При СКФ < 60 мл/мин/1,73м² концентрация белка Клото оказалась в 1,9 раз ниже, чем у мужчин при СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73м² – 358 пг/мл [108; 730] и 677 пг/мл [338; 1180], ($p = 0,05$).

В группе мужчин с ИБС были установлены значимые положительные корреляционные связи между белком Клото и возрастом (0,215; $p = 0,033$); наличием регулярной физической активности (0,425; $p < 0,0001$); ХС ЛВП (0,238, $p = 0,019$). Отрицательные корреляционные связи выявлены между белком Клото и систолическим АД (-0,196; $p = 0,050$); СД (-0,200; $p = 0,048$), ИМТ (-0,235; $p = 0,020$); ОТ/ОБ (-0,274; $p = 0,006$) и коэффициентом атерогенности (-0,229; $p = 0,025$). В группе сравнения (мужчины без ИБС) установлена положительная корреляционная связь уровней белка Клото с регулярной физической активностью (0,381; $p < 0,0001$); ХС не-ЛВП (0,232; $p = 0,042$); коэффициентом атерогенности (0,249; $p = 0,029$) и СКФ (0,320; $p = 0,005$). Отрицательные корреляционные

связи обнаружены между белом Клото и возрастом ($-0,284$; $p = 0,011$); креатинином ($-0,231$; $p = 0,043$) и СД ($-0,324$; $p = 0,003$).

Таким образом, определены такие особенности содержания белка Клото в крови у мужчин с ИБС и его ассоциации с липидными показателями, как более низкий уровень белка Клото при ХС не-ЛВП $> 3,8$ ммоль/л и коэффициенте атерогенности $> 3,5$, а также положительная корреляционная связь с ХС ЛВП и отрицательная связь с коэффициентом атерогенности, которые могут предполагать наличие антиатерогенных свойств у белка Клото. Как и в исследовании InCHIANTI [Semba R.D. et al., 2011] нами выявлена достоверная позитивная корреляционная зависимость между содержанием белка Клото и ХС ЛВП. Точный механизм, лежащий в основе этой взаимосвязи, неизвестен. Однако по данным литературы ХС ЛВП и белок Клото модулируют сходные сигнальные пути [Nofer J.R. et al., 2002; Kuro-o M., 2008; Unger R.H. et al., 2006]. На сегодняшний день в литературе имеются противоречивые данные о характере связи белка Клото с липидными параметрами, и каких-либо убедительных доказательств наличия связи белка Клото с липидными показателями у мужчин с ИБС нет [Semba R.D. et al., 2011; Paula R. S. et al., 2016].

Содержание белка Клото в крови и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с артериальной гипертонией

В рамках диссертационной работы был проведен анализ уровней белка Клото у мужчин с АГ и без АГ. У мужчин с АГ и в группе сравнения медианные значения белка Клото не различались – 464 пг/мл [287; 849] и 458 пг/мл [128; 1121] соответственно, ($p = 0,919$).

Несмотря на предыдущие экспериментальные данные [Wang X. et al., 2010; Chen. K. et al., 2019], роль белка Клото в регуляции АД у человека и патогенезе АГ остается в значительной степени неизвестной. По данным литературы связь между уровнем белка Клото и АГ была обнаружена только в небольших клинических исследованиях. Так, в одном из исследований белок Клото был ниже примерно на 45% среди лиц с АГ по сравнению со здоровыми участниками [Guo X. et al., 2020; Lin Yi et al., 2016]. Работы по изучению белка Клото при АГ на уровне популяции единичны. В Китае исследовали связь между белком Клото, уровнями АД и жесткостью артериальной стенки. Результаты авторов не подтверждают связь между концентрацией белка Клото в крови и уровнями АД в популяции Китая [Liang W.Y. et al., 2021]. Эти данные согласуются с результатами более крупного популяционного исследования InCHIANTI, по результатам которого частота АГ не различалась при различных уровнях белка Клото [Semba R.D. et al., 2011].

В нашем исследовании значимые различия уровней белка Клото между мужчинами с АГ и без АГ выявлены только в отношении трех факторов риска: сниженная физическая активность, ожирение и наличие СД.

При отсутствии регулярных физических нагрузок, уровни сывороточного белка Клото оказались значимо ниже, чем при наличии регулярных физических нагрузок. Так, в группе мужчин с АГ без регулярных физических нагрузок исследуемый протеин был в 2,2 раза ниже – 403 пг/мл [514; 1256] и 887 пг/мл [170; 599] соответственно, ($p < 0,0001$), а у лиц без АГ в 2,7 раза ниже – 394 пг/мл [432; 1889] и 1057 пг/мл [122; 523] соответственно, ($p = 0,011$), чем в подгруппах с регулярными нагрузками.

У лиц с ожирением получены более низкие концентрации белка Клото по сравнению с испытуемыми без ожирения. В группе пациентов с АГ исследуемый белок был в 1,3 раза ниже – 401 пг/мл [151; 576] и 515 пг/мл [320; 968] соответственно, ($p = 0,033$), а у мужчин с нормальным АД – в 4,3 раза ниже – 115 пг/мл [82; 519] и 493 пг/мл [306; 1206] соответственно, ($p = 0,033$) при ИМТ ≥ 30 кг/м².

Сочетание гипертонии с СД снижало уровни протеина Клото в 1,4 раза, чем без диабета – 377 пг/мл [114; 528] и 522 пг/мл [318; 972] соответственно, ($p = 0,002$). В группе без АГ значимых различий содержания белка Клото не получено в зависимости от наличия или отсутствия сахарного диабета – 138 пг/мл [117; 398] и 515 пг/мл [286; 1197] соответственно, ($p = 0,002$).

Каких-либо других значимых изменений концентрации в крови белка Клото, зависящих от факторов риска ССЗ между группами мужчин с АГ и без АГ нами не обнаружено.

В группе мужчин с АГ выявлена значимая положительная корреляционная связь между белком Клото и наличием регулярной физической активности (0,428; ($p < 0,0001$)) и отрицательные корреляционные связи между белком Клото и СД (–0,269; $p = 0,002$); ИМТ (–0,185; $p = 0,032$) и ОТ/ОБ (–0,247; $p = 0,004$). В группе сравнения (мужчины без АГ) установлена положительная корреляционная связь уровней белка Клото с наличием регулярной физической активности (0,387; $p = 0,009$) и СКФ (0,372; $p = 0,021$); отрицательные корреляционные связи обнаружены между белком Клото и ИМТ (–0,315; $p = 0,037$) и креатинином (–0,312; $p = 0,050$).

Мы выявили более низкие уровни белка Клото у мужчин в группах с ИБС и АГ без регулярных физических нагрузок. Аналогичные результаты найдены в выполненных ранее проспективных когортных исследованиях и крупномасштабном мета-анализе [Saghiv M.S. et al., 2017]. Saghiv M. и соавторы оценивали влияние аэробных тренировок на протяжении длительного периода времени на уровни белка Клото в крови у пациентов с ИБС. Исследование показало, что у пациентов с ИБС, которые выполняли аэробные упражнения на протяжении 12 месяцев 4-5 раз в неделю, средние уровни белка Клото были значительно выше, по сравнению с нетренированными пациентами как с ИБС, так и без ИБС [Saghiv M. et al., 2016]. В исследовании FIT-AGING уровни физической активности и физической подготовки оказались положительно связаны с содержанием белка Клото в крови у лиц среднего возраста [Amaro-Gahete F.J. et al., 2019]. Белок Клото может быть ключевым фактором во взаимосвязи между физической активностью и улучшением здоровья. Поскольку, у лиц с более высоким уровнем физической подготовки, ожидаемая продолжительность жизни выше, чем у физически неактивных людей, регулярные занятия аэробными упражнениями могут замедлить физиологические изменения, которые происходят во время старения [American College of Sports Medicine et al., 2009].

По нашим данным белок Клото ниже при ожирении у мужчин с ИБС и АГ. Анализ доступных нам литературных данных показывает, что белок Клото может принимать участие в энергетическом обмене. Исследователи определили способность белка Клото в головном мозге увеличивать расход энергии, модулировать активность нейронов. При изучении уровня белка Клото в ликворе у лиц с ожирением, выявлена сильная обратная корреляция белка Клото с ожирением [Landry T. et al., 2021].

Содержание белка Клото в крови и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска у мужчин с сахарным диабетом

Проведено исследование уровней белка Клото в группах мужчин с СД и без СД. Выявлено, что медианные уровни белка Клото у мужчин с диабетом ниже в 1,4 раза – 374 пг/мл [117; 500] и 515 пг/мл [315; 1009], ($p < 0,0001$), чем у мужчин без диабета. В первой возрастной подгруппе у мужчин с СД содержание белка Клото было в 1,4 раза меньше, чем у лиц без СД соответствующего возраста – 362 [124; 492] и 565 пг/мл [315; 1117], ($p = 0,01$). В старшей возрастной подгруппе у мужчин с диабетом уровни белка Клото также были ниже, чем у лиц без диабета, но различия были статистически не значимы – 399 пг/мл [102; 582] и 501 пг/мл [322; 943], ($p = 0,104$).

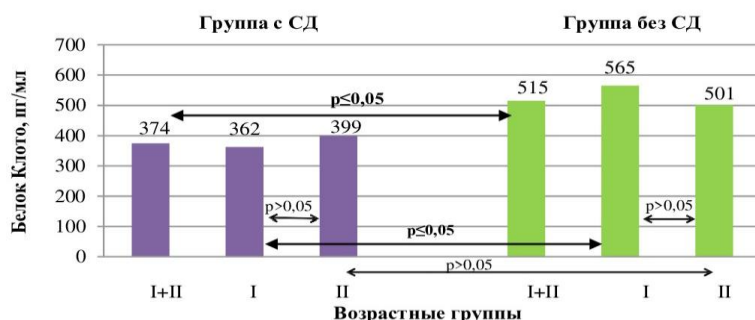


Рисунок 1 – Медианные уровни белка Клото в крови у мужчин с СД и без СД

Полученные результаты не противоречат данным других исследований, посвященных изучению белка Клото при СД. Так, Zhang L. и соавторы определили, что у лиц с СД 2 типа количество белка Клото в крови ниже в 2 раза, чем у пациентов без диабета [Zhang L., 2018].

Среди обследованных мужчин с СД при СКФ < 60 мл/мин/1,73м² концентрация белка Клото оказалась в 4 раз ниже, чем у мужчин с СД при СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73м² (104 пг/мл [93; 118] и 413 пг/мл [147; 535]), ($p = 0,014$). Каких либо других значимых изменений концентрации в крови белка Клото, зависимых от остальных изученных нами факторов риска ССЗ (курение, употребление алкоголя, абдоминальное ожирение, липидные нарушения, гипертония и гипергликемия) не обнаружено.

Подобные результаты найдены и у других исследователей, сообщающих о тесной связи белка Клото с диабетической нефропатией. Существует положительная корреляция между дефицитом белка Клото, прогрессированием почечной недостаточности у пациентов с СД. В эксперименте введение рекомбинантного белка Клото или стимуляция эндогенной выработки белка Клото предотвращали или уменьшали повреждение почек и развитие диабета [Iavru Bob et al., 2018; Turiak M. et al., 2021].

При корреляционном анализе в группе с СД выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнями белка Клото и ОТ/ОБ ($-0,329$; $p = 0,047$). В группе сравнения обнаружена положительная корреляционная связь между белком Клото и наличием регулярной физической нагрузки ($0,429$; $p < 0,0001$), уровнями ТГ ($0,209$; $p = 0,014$), ХС ЛОНП ($0,211$; $p = 0,013$) и СКФ ($0,228$; $p = 0,009$); отрицательные корреляционные связи между белком Клото и ИМТ ($-0,200$; $p = 0,018$), ОТ/ОБ ($-0,182$; $p = 0,027$).

Многофакторный линейный регрессионный анализ ассоциаций белка Клото с факторами риска среди всех обследованных мужчин

На основании приведенных результатов корреляционного анализа для выявления значимых связей белка Клото не только с отдельными факторами, но и их совокупностями проведен многофакторный линейный регрессионный анализ (таблица 2).

Таблица 2

Ассоциации белка Клото с факторами риска по результатам многофакторного анализа среди всех обследованных мужчин

Показатель для всех обследуемых мужчин n = 178	Модель 1	Модель 2	Модель 3	Модель 4	Модель 5
Регулярная физическая активность, есть/нет	0,362 p < 0,0001	0,371 p < 0,0001	0,423 p < 0,0001	0,393 p < 0,0001	0,391 p < 0,0001
ИБС, есть/нет	-0,054 p = 0,447	—	-0,042 p = 0,557	-0,069 p = 0,342	-0,056 p = 0,436
АГ, есть/нет	-0,043 p = 0,545	-0,052 p = 0,454	-0,073 p = 0,301	-0,054 p = 0,457	-0,071 p = 0,321
СД, есть/нет	-0,174 p = 0,021	-0,170 p = 0,024	—	-0,163 p = 0,037	-0,164 p = 0,035
ИМТ ≥ 30 кг/м ²	-0,177 p = 0,014	-0,182 p = 0,011	-0,172 p = 0,019	—	-0,155 p = 0,035
ОТ/ОБ > 0,94 см	—	—	—	-0,028 p = 0,700	-0,028 p = 0,703
Коэффициент атерогенности > 3,5 ммоль/л	0,153 p = 0,055	0,160 p = 0,042	0,123 p = 0,122	0,138 p = 0,057	0,146 p = 0,065
ТГ $\geq 1,7$ ммоль/л	0,120 p = 0,117	0,116 p = 0,130	0,106 p = 0,173	0,107 p = 0,172	0,118 p = 0,124
СКФ < 60 мл/мин/1,73м ²	-0,139 p = 0,050	-0,136 p = 0,050	-0,132 p = 0,067	-0,138 p = 0,050	-0,140 p = 0,050
R ² модели	56,9 %	56,6 %	54,7 %	54,4 %	58,2 %
Примечание: p – достоверность связи; R ² – коэффициент детерминации.					

Во всех исследуемых моделях вне зависимости от других изучаемых нами факторов риска выявлена положительная ассоциация белка Клото с регулярной физической нагрузкой и обратные ассоциации с СД и ИМТ ≥ 30 кг/м². При наличии в модели СД была установлена обратная ассоциация с СКФ < 60 мл/мин/1,73м², при исключении из модели ИБС определялась прямая ассоциация с коэффициентом атерогенности > 3,5 ммоль/л.

Аллели и генотипы полиморфизма rs9536314 гена Клото, анализ ассоциаций с белком Клото, биохимическими и клиническими показателями

Нами было проведено выделение ДНК и генотипирование полиморфизма rs9536314 гена Клото в клинической группе (n = 69) и в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири (n = 219).

Статистически значимых различий по частоте генотипов (ТТ, ТG и GG) и аллелей (Т и G) в клинической группе по сравнению с популяционной группой европеоидного населения Западной Сибири, а также с литературными данными для европеоидных популяций

Западной и Восточной Европы не получено. Частота аллеля T rs9536314 в клинической группе составила 0,82, частота аллеля G – 0,18. Частота аллеля T rs9536314 у мужчин в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири – 0,78, частота аллеля G – 0,22. По данным gnomAD_exome частота (G = 0,14), (T = 0,86); по данным TOPMED частота (G = 0,15), (T = 0,85) [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. Для rs9536314 в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири распределение частоты генотипов соответствовало равновесию Харди – Вайнберга ($\chi^2 = 1,7483$).

Статистически значимой разницы между уровнями биохимических и клинических показателей в группах с разными генотипами получено не было.

Выполнен анализ медианы белка Клото и средних значений СКФ у мужчин с ИБС и АГ в клинической группе в аутосомно-доминантной (ТТ+ТG) и аутосомно-рецессивной (ТG+GG) моделях для rs9536314 гена Клото. Медианные уровни белка Клото в крови и СКФ, как среди всех обследованных мужчин клинической группы, так и в подгруппах с ИБС и с АГ не зависели от генотипа (таблица 3).

Таблица 3

Медианы белка Клото и средние значения СКФ в аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделях полиморфизма rs9536314 гена Клото среди мужчин клинической группы

Показатель		Все пациенты, n = 69			Ишемическая болезнь сердца, n = 38			Артериальная гипертония, n = 52		
		Белок Клото, пг/мл Me [25; 75]	СКФ, мл/мин/ 1,73м ² (M ± SD)		Белок Клото, пг/мл Me [25; 75]	СКФ, мл/мин/ 1,73м ² (M ± SD)		Белок Клото, пг/мл Me [25; 75]	СКФ, мл/мин/ 1,73м ² (M ± SD)	
Ауто- сомно- доминантная модель	ТТ+ ТG	n = 66	641 [389; 1130]	83,6 ± 15,8	n = 37	544 [408; 976]	85,1 ± 15,1	n = 51	673 [428; 1045]	83,3 ± 16,8
	GG	n = 3	400 [169; —]	63,3 ± 15,9	n = 1	169 [169; —]	81,0	n = 1	169 [169; —]	81,0
	p	0,145		0,056	0,316		0,622	0,269		0,846
Ауто- сомно- рецессивная модель	ТТ	n = 47	705 [428; 1245]	82,4 ± 16,1	n = 22	566 [418; 1255]	84,4 ± 15,1	n = 37	694 [409; 1057]	82,3 ± 17,1
	ТG+ GG	n = 22	471 [350; 974]	83,3 ± 16,7	n = 16	504 [334; 909]	85,8 ± 15,0	n = 15	603 [315; 978]	85,9 ± 15,9
	p	0,121		0,797	0,388		0,872	0,473		0,479

Нами выявлена тенденция к снижению СКФ у носителей гомозиготного генотипа GG варианта rs9536314 гена Клото среди всех мужчин клинической группы в аутосомно-

доминантной модели ($63,3 \pm 15,9$) и ($83,6 \pm 15,8$) мл/мин/1,73м², ($p = 0,056$) соответственно. Согласно данным Joanna Pazik с соавторов, оценка наличия полиморфизма rs9536314 гена Клото может позволить спрогнозировать раннее поражение и снижение функции клубочков почечного трансплантата. Анализы были выполнены для модели с доминированием аллеля G (GG + GT против TT). Исследователи обнаружили, что через 3 месяца после приживления трансплантата гломерулопатия обнаруживалась в 12,2% случаев при генотипе GG + GT и у 3,2% носителей генотипа TT ($p = 0,023$). У носителей аллеля G значения СКФ были значительно ниже, чем у носителей генотипа TT – 35,0 (20,4–76,6) и 46,3 (15,5–96,8) мл/мин/1,73м², ($p = 0,001$) [Pazik J. et al., 2020].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате выполненного исследования мы определили уровни белка Клото в крови у мужчин в возрасте 50–65 и старше 80 лет в зависимости от наличия ИБС, АГ и СД и кардиометаболических факторов риска.

Мы не получили ожидаемых статистически значимых низких уровней белка Клото у пациентов с ИБС и с АГ. Учитывая то, что атеросклероз и артериальная гипертензия являются многофакторными заболеваниями, в патогенезе которых важную роль играют такие факторы, как эндотелиальная дисфункция, дислипидемия, ускоренные процессы тромбообразования и окисления, воспалительно-деструктивные изменения в артериальной стенке, изменения нейрогуморальной регуляции, наследственная отягощенность, психо-эмоциональное перенапряжение, изменения функциональной активности плазматических мембран, изучение белка Клото в аспекте сердечно-сосудистой патологии требует комплексного подхода. Поскольку в задачи нашей работы не входило изучение влияния других факторов риска ССЗ таких как, воспаление и окисление, этот вопрос требует дальнейшего исследования в проспективных эпидемиологических исследованиях.

У мужчин с ИБС нами впервые выявлены более низкие уровни белка Клото при ХС нелВП более 3,8 ммоль/л и коэффициенте атерогенности более 3,5, положительная корреляция белка Клото с ХС ЛВП и отрицательная связь с коэффициентом атерогенности. Данные особенности содержания белка Клото в крови и его ассоциации с липидными показателями могут предполагать наличие антиатерогенных свойств у белка Клото. Это может оказать значительный вклад в развитие кардиологической науки. В нашем исследовании мы можем констатировать факт ассоциаций, но это не позволяет сделать вывод о причинно-следственных связях. Необходимо продолжить изучение данного направления в наблюдательных исследованиях.

Нами получены ожидаемые более низкие уровни белка Клото у лиц с сахарным диабетом 2 типа, которые были подтверждены в других клинических исследованиях. Выявленные особенности белка Клото у лиц с СД 2 типа в сочетании с другими кардиометаболическими факторами риска могут быть использованы в практическом здравоохранении.

Определено, что белок Клото в крови ниже у лиц, которые не занимаются регулярными физическими нагрузками, с ожирением и со снижением СКФ менее 60 мл/мин/1,73м². Белок Клото имеет положительную корреляцию с наличием регулярной физической активности; отрицательные корреляционные связи с систолическим АД и ожирением. При

многофакторном линейном регрессионном анализе (со стандартизацией по возрасту) среди всех обследованных мужчин, вне зависимости от других изучаемых нами факторов риска, подтверждены положительная ассоциация белка Клото с регулярной физической нагрузкой и обратные ассоциации с СД, ИМТ более или равно 30 кг/м^2 и СКФ менее $60 \text{ мл/мин/1,73м}^2$.

По данным литературы, некоторые кардиометаболические факторы риска ССЗ могут быть связаны с гаплотипом KL-VS гена Клото (rs9536314 и rs9527025), что представляет особый научный и практический интерес. Мы определили, что частота аллелей и генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото у мужчин с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией статистически значимо не отличается по распространенности аллелей и генотипов от популяции Западной Сибири и популяций Западной и Восточной Европы. Содержание белка Клото в крови и некоторые клинико-биохимические параметры не были ассоциированы с генотипами полиморфизма rs9536314 гена Клото. Однако мы выявили тенденцию к снижению СКФ у носителей гомозиготного генотипа GG rs9536314 гена Клото среди мужчин клинической группы. По результатам предыдущих исследований, оценка наличия полиморфизма rs9536314 гена Клото может позволить спрогнозировать раннее поражение и снижение функции почек.

Поскольку наша работа была проведена на небольшой выборке пациентов, и в будущем полученные результаты могут быть использованы в более крупных исследованиях. Возможно, углубленное изучение гена и белка Клото поможет объяснить механизмы, с помощью которых белок Клото участвует в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим могут быть предложены продуктивные стратегии терапевтического вмешательства.

ВЫВОДЫ

1. У мужчин с ИБС уровни белка Клото в крови ниже у лиц со сниженной физической активностью, у лиц с ожирением, у лиц с СД и у лиц с повышенным уровнем коэффициента атерогенности в 2,2; 1,3; 1,2 и 1,3 раза соответственно. У мужчин с ИБС белок Клото имеет положительные корреляционные связи с наличием регулярной физической активности и уровнем ХС ЛВП; отрицательные корреляционные связи с систолическим АД, СД, ИМТ, ОТ/ОБ и коэффициентом атерогенности. У мужчин с ИБС выявлена прямая корреляционная связь содержания в крови белка Клото с возрастом.

2. Белок Клото в крови мужчин с АГ значительно ниже у лиц при наличии ожирения, у лиц с низкой физической активностью и у лиц сахарным диабетом в 1,3; 2,2 и 1,4 раза соответственно. Белок Клото у мужчин с АГ имеет положительную корреляцию с наличием регулярной физической нагрузки и обратную корреляцию с сахарным диабетом и ожирением.

3. Содержание белка Клото у мужчин с сахарным диабетом 2 типа ниже в 1,4 раза ($p < 0,0001$), чем у мужчин без СД. У мужчин с СД белок Клото в крови значительно ниже у мужчин среднего возраста и у лиц со снижением СКФ менее $60 \text{ мл/мин/1,73м}^2$ в 1,4 и в 4 раза соответственно. У мужчин с СД белок Клото имеет отрицательную корреляцию с наличием абдоминального ожирения.

4. При многофакторном линейном регрессионном анализе (со стандартизацией по возрасту) связей белка Клото с сердечно-сосудистыми заболеваниями и

кардиометаболическими факторами риска выявлены следующие ассоциации: положительная с регулярной физической нагрузкой и отрицательные с сахарным диабетом, ИМТ более или равно 30 кг/м² и со СКФ менее 60 мл/мин/1,73м².

5. Частота генотипов (ТТ, ТG и GG) и аллелей (Т и G) полиморфизма rs9536314 гена Клото у мужчин с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией статистически значимо не отличается по распространенности генотипов (ТТ, ТG и GG) и аллелей (Т и G) полиморфизма rs9536314 гена Клото от популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири, а также, по литературным данным, от европеоидных популяций Западной и Восточной Европы. Статистически значимых различий в средних значениях изученных клинико-биохимических параметрах в зависимости от генотипов rs9536314 гена Клото в клинической группе не выявлено. Уровни белка Клото в крови у мужчин с ИБС и АГ не различаются в аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделях для генотипов полиморфизма rs9536314 гена Клото.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У мужчин с сахарным диабетом 2 типа рекомендовано измерять уровни в крови белка Клото, поскольку его значение менее или равно 118 пг/мл при этом заболевании ассоциировано со сниженной СКФ.

2. Мужчинам с ишемической болезнью сердца и с артериальной гипертонией необходимо соблюдать регулярный режим физической активности, контролировать массу тела и уровень гликемии для предотвращения снижения уровня белка Клото в крови, как раннего маркера снижения функции почек.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Белок Клото и сердечно-сосудистая система / Тимощенко О.В. // Аспирант. – 2016. – №7. – С. 16-18.
2. Белок Клото и атеросклероз / Тимощенко О.В., Никитин Ю.П. // Атеросклероз. – 2017. – Т. 13, №4. – С. 38-41. (РИНЦ)
3. Содержание белка Клото и липидный профиль крови в возрастном аспекте у мужчин 20-65 лет / Тимощенко О.В., Рагино Ю.И., Стахнёва Е.М., Щепина Ю.В., Каштанова Е.В., Латынцева Л.Д. // Атеросклероз. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 45-50. (РИНЦ)
4. Особенности содержания белка Клото в крови у мужчин с артериальной гипертонией и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска / Тимощенко О.В., Стахнева Е.М., Рагино Ю.И., Никитин Ю.П. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020. – Т. 9, №4. – С 21-31. (РИНЦ, Scopus, Q4)
5. Белок Клото в крови у мужчин с ишемической болезнью сердца и его ассоциации с липидным профилем / Тимощенко О.В., Рагино Ю.И., Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Никитин Ю.П. // Атеросклероз. – 2020. – Т. 16, № 1. – С. 5-8. (РИНЦ)
6. Анализ ассоциации rs9536314 гена KL с антропометрическими и биохимическими показателями у мужчин г. Новосибирска (Западная Сибирь) / Тимощенко О.В.,

Семаев С.Е., Иванощук Д.Е., Стахнева Е.М., Никитин Ю.П., Шахтшнейдер Е.В., Рагино Ю.И. // Атеросклероз. – 2020. – Т. 16, № 4. – С. 61-69. (РИНЦ)

7. Белок Клото в крови у мужчин с сахарным диабетом 2 типа и его ассоциации с кардиометаболическими факторами риска / Тимощенко О.В., Стахнева Е.М., Рагино Ю.И., Никитин Ю.П. // Сибирский научный медицинский журнал. – 2021. – Т. 41, №2. – С. 21–27. (РИНЦ)

8. Уровень сывороточного белка Клото в возрастном аспекте / Тимощенко О.В., Щепина Ю.В., Рагино Ю.И., Никитин Ю.П. // Тезисы с Российского национального конгресса кардиологов 2018. – 2018. – С. 302. (РИНЦ)

9. Новый белок Клото в крови у мужчин с сахарным диабетом 2 типа и его ассоциации с сердечно-сосудистыми факторами риска / Тимощенко О.В., Стахнева Е.М., Никитин Ю.П. [и др.] // Тезисы с Российского национального конгресса кардиологов. – 2021. – С. 171. (РИНЦ)

10. Content of protein Klotho and lipid profile of the blood in men in age aspect / Timoshchenko O.V., Stakhneva E.M., Ragino Yu.I. // Atherosclerosis. – 2019. – 287, e164 (Web of Science, Q1).

11. Association of Klotho protein in the blood of men with lipid profiles and coronary heart disease / Timoshchenko O.V., Ragino Yu.I., Stakhneva E.M., Nikitin Yu.P. // Atherosclerosis. – 2020. – 315, e228 (Web of Science, Q1).

12. Analysis of variants in the Klotho gene in patients with coronary atherosclerosis / Shakhtshneider E.V., Semaev S.E., Timoshchenko O.V., Ivanoshchuk D., Stakhneva E.M., Nikitin Y., Ragino Y.I. // Atherosclerosis. – 2021. – 331, e96 (Web of Science, Q1).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – Артериальная гипертония

АД – Артериальное давление

ИБС – Ишемическая болезнь сердца

ИМТ – Индекс массы тела

ОБ – Окружность бедер

ОТ – Окружность талии

ОХС – Общий холестерин

СД – Сахарный диабет

СКФ – Скорость клубочковой фильтрации

ССЗ – Сердечно-сосудистые заболевания

ТГ – Триглицериды

ХС ЛВП – Холестерин липопротеинов высокой плотности

ХС ЛНП – Холестерин липопротеинов низкой плотности

ХС ЛОНП – Холестерина липопротеинов очень низкой плотности

ХС не-ЛВП – Холестерин липопротеинов невысокой плотности