### STRESZCZENIE

**Wprowadzenie:** Cukrzyca zaliczana jest do chorób cywilizacyjnych; może ona nie tylko znacznie obniżać jakość życia, ale także prowadzić do poważnych powikłań. Jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy jest cukrzycowa choroba nerek, która często prowadzi do konieczności wykonania przeszczepu nerki. Coraz częściej w progresji tych chorób podkreśla się nie tylko rolę czynników środowiskowych, ale też genetycznych, w tym polimorfizmów genów kodujących białka i enzymy istotne w patofizjologii tych zaburzeń. W ich grono zalicza się między innymi izoformy syntazy tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*), a także enzym konwertujący angiotensynę (ACE, ang. *angiotensyn-converting enzyme*).

W przebiegu chorób przewlekłych, w tym cukrzycowej choroby nerek, występuje zwiększona produkcja wolnych rodników. Chociaż są one niezbędne do przeprowadzenia pewnych procesów fizjologicznych, to ich nadmierna ilość może powodować stres oksydacyjny i/lub nitrozacyjny oraz uszkodzenie komórek. Cząsteczką powiązaną z tymi zjawiskami jest tlenek azotu (NO), który jest prekursorem reaktywnych form azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*). Za syntezę tego związku odpowiadają izoformy NOS – NOS1, NOS2, NOS3. W przebiegu cukrzycy oraz jej powikłań obserwujemy zwiększoną produkcję angiotensyny II (Ang II), za którą odpowiada ACE. W leczeniu cukrzycowej choroby nerek często stosuje się leki hipotensyjne, w tym środki z grupy inhibitorów ACE (ACEi), do których zaliczamy benazepryl, enalapryl, lizynopryl czy ramipryl. Dlatego też polimorfizmy w genie

*ACE* mogą być związane ze skutecznością stosowania tego rodzaju terapii.

**Cel pracy:** Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wybranych polimorfizmów: rs4343 i rs4646994 (w genie *ACE*); rs3782218 (w genie *NOS1*); rs1137933 (w genie *NOS2*); rs1799983, rs2070744 i rs61722009 (w genie *NOS3*) w kontekście zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycowej choroby nerek i/lub zwiększonego prawdopodobieństwa konieczności wdrożenia terapii nerkozastępczej. Istotnym było także zbadanie wpływu tych polimorfizmów na stężenie i aktywność ACE, stężenie izoform NOS (NOS1, NOS2, NOS3), a także stężenia wybranych parametrów istotnych w patogenezie cukrzycowej choroby nerek (stężenie glukozy, kreatyniny, CRP, wartość eGFR) oraz stężenia pierwiastków śladowych (cynk i miedź). Ważne było również wykonanie analizy *in silico* w celu zbadania interakcji pomiędzy dwiema domenami ACE – domeną N i C – a lekami z grupy ACEi wykorzystywanymi w terapii cukrzycowej choroby nerek: benazeprylem, enalaprylem, lizynoprylem oraz ramiprylem.

**Materiały i metody:** W celu przygotowania rozprawy doktorskiej najpierw dokonano przeglądu najnowszej literatury dotyczącej roli izoform NOS w patogenezie wybranych chorób

przewlekłych, w tym cukrzycy oraz cukrzycowej choroby nerek. Analizie zostały poddane także prace poświęcone znaczeniu polimorfizmów genów kodujących te izoformy.

Z kolei w celu przygotowania prac oryginalnych została zebrana grupa badana składająca się z 232 osób, która została podzielona na następujące podgrupy: pacjenci z cukrzycową chorobą nerek (N=85), pacjenci z cukrzycową chorobą nerek i po przeszczepie nerki (N=97), grupa kontrolna (N=50). W surowicy wszystkich badanych zostały oznaczone następujące parametry: stężenie i aktywność ACE, stężenie NOS1, NOS2, NOS3, a także stężenie cynku i miedzi. Stężenia poszczególnych izoform ACE i NOS były oznaczane przy użyciu testów ELISA, aktywność ACE została oznaczona z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego, a stężenia metali zostały oznaczone przy użyciu metody atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (FAAS, ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*). Dodatkowo pozyskano wyniki stężeń glukozy, kreatyniny i CRP oraz wartości eGFR z Kliniki Nefrologii, Medycyny Transplantacyjnej i Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu. Ponadto zanalizowano wpływ siedmiu polimorfizmów na wyżej wymienione parametry; były to następujące polimorfizmy: rs4343 i rs4646994 (w genie *ACE*); rs3782218 (w genie *NOS1*); rs1137933 (w genie *NOS2*); rs1799983, rs2070744 i rs61722009 (w genie *NOS3*). Do tego celu wykorzystano techniki PCR oraz PCR-RFLP. Wykonano także analizę *in silico* przy użyciu oprogramowania AutoDock Vina. W celu przeprowadzenia analizy statystycznej wykorzystano pakiet SATISTICA 13.3.

**Wyniki:** Artykuł przeglądowy ukazał złożoną rolę NOS w patogenezie chorób wielu narządów i układów. Szczególnie zauważono zależności między polimorfizmami genów *NOS2* i *NOS3* o ryzykiem rozwoju insulinooporności, cukrzycy czy cukrzycowej choroby nerek. Ponadto zwrócono także uwagę na to, iż polimorfizmy w genie NOS1 były związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia tętniczego czy miażdżycy.

Podczas prowadzenia badań na materiale biologicznym zebranym od pacjentów nefrologicznych, wykazano, że polimorfizmy rs4343 i rs4646994 w genie *ACE* nie były powiązane ze zmianami stężeń samego enzymu. Natomiast zaobserwowano spadek aktywności ACE u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek i genotypem A/A polimorfizmu rs4343 w porównaniu do grupy kontrolnej. Odnotowano także niższe stężenia cynku u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei dzięki wykorzystaniu regresji logistycznej zauważono, iż genotyp G/G oraz sam allel G polimorfizmu rs4343 był związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycowej choroby nerek. Podobne wyniki

uzyskano także u pacjentów, u których wykonano przeszczep nerki. Z kolei po wykonaniu analizy *in silico* zauważono, że benazepryl i lizynopryl wykazywały znaczną preferencję w wiązaniu dla domeny C, co ma znaczenie w kontekście polimorfizmu rs4646994 w genie *ACE*. Podobnych zależności nie zaobserwowano w przypadku enalaprylu i ramiprylu.

Nie wykazano wpływu polimorfizmów w genach *NOS1* i *NOS2* (odpowiednio rs3782218 i rs1137933) na zmiany stężeń NOS1 i NOS2. Zauważono jednak, że poszczególne genotypy w obrębie polimorfizmów *NOS3* (rs1799983, rs2070744 i rs61722009) były powiązane z różnicami w stężeniach NOS3 między grupą z cukrzycową chorobą nerek i grupą z cukrzycową chorobą nerek będącą po przeszczepie nerki a grupą kontrolną (w grupie kontrolnej zaobserwowano wyższe stężenia tego parametru). Dodatkowo podobnie jak w przypadku badań nad polimorfizmami *ACE* – zaobserwowano niższe stężenia cynku u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek oraz pacjentów z cukrzycową chorobą nerek i po przeszczepie nerki w porównaniu do grupy kontrolnej. Było to niezależne od podziału ze względu na genotypy w obrębie badanych polimorfizmów. Ponadto wykazano, iż genotyp C/C i sam allel C polimorfizmu rs3782218 w genie *NOS1* były związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycowej choroby nerek oraz zwiększonym prawdopodobieństwem konieczności wykonania przeszczepu nerki. Z kolei obecność allelu G polimorfizmu rs1137933 w genie *NOS2* zmniejszała to prawdopodobieństwo.

**Wnioski:** Zmiany genetyczne związane z izoformami NOS, ale również i ACE mają wpływ na rozwój cukrzycy oraz jej powikłań. Ich badanie, a zatem też lepsze zrozumienie, może przyczynić się do opracowania nowych parametrów diagnostycznych lub skuteczniejszych metod leczenia.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano wpływ wybranych polimorfizmów genów *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* i *ACE* na ryzyko rozwoju cukrzycowej choroby nerek, a także na zmiany w prawdopodobieństwie konieczności zastosowania terapii nerkozastępczej. Szczególnie interesującymi i wartymi uwagi wydają się być polimorfizmy rs4343 w genie *ACE*, rs3782218 w genie *NOS1* oraz rs1137933 w genie *NOS2*. Aby potwierdzić wyniki tych badań, konieczne jest jednak prowadzenie dalszych analiz, które uwzględniłyby większą populację. A choć rola polimorfizmów *NOS3* w ryzyku wystąpienia powikłań cukrzycy nie została zaobserwowana, to niższe stężenia NOS3 obserwowano u pacjentów z tymi powikłaniami.

Ponadto badania te podkreśliły znaczenie wyboru leków z grupy ACEi w kontekście zmienności genetycznej występującej u pacjentów. Istnienie zależności między skutecznością tych preparatów a polimorfizmem rs4646994 w genie *ACE* wskazuje na to, iż prowadzenie

dalszych badań w tej tematyce mogłoby się przyczynić do indywidualizacji terapii, a tym samym skuteczniejszego leczenia chorych.

### ABSTRACT

**Introduction:** Diabetes is classified as a disease of civilization; it can not only significantly reduce quality of life, but also lead to serious complications. One of the most common complications of diabetes is diabetic nephropathy, which often leads to the need for a kidney transplant. Increasingly, the role of not only environmental factors, but also genetic factors, including polymorphisms of genes encoding proteins and enzymes important in the pathophysiology of these disorders, is being emphasized in the progression of these diseases. They include nitric oxide synthase (NOS) isoforms, as well as angiotensin-converting enzyme (ACE).

In the course of chronic diseases, including diabetic nephropathy, there is an increased production of free radicals. Although they are essential for certain physiological processes, excessive amounts can cause oxidative and/or nitrosative stress and cell damage. A molecule associated with these phenomena is nitric oxide (NO), which is a precursor of reactive nitrogen species (RNS). NOS isoforms – NOS1, NOS2, NOS3 – are responsible for the synthesis of this compound.

In the course of diabetes and its complications, we observe increased production of angiotensin II (Ang II), for which ACE is responsible. The treatment of diabetic nephropathy often involves the use of hypotensive drugs, including agents from the ACE inhibitor group (ACEi), which include benazepril, enalapril, lisinopril or ramipril. Therefore, polymorphisms in *ACE* may be associated with the efficacy of this type of therapy.

**Objective of the study:** The purpose of this dissertation was to evaluate selected polymorphisms: rs4343 and rs4646994 (in *ACE*); rs3782218 (in *NOS1*); rs1137933 (in *NOS2*); rs1799983, rs2070744 and rs61722009 (in *NOS3*) in the context of increased risk of developing diabetic kidney disease and/or increased likelihood of needing to implement renal replacement therapy. It was also important to examine the effects of these polymorphisms on the concentration and activity of ACE, the concentrations of NOS isoforms (NOS1, NOS2, NOS3), as well as the concentrations of selected parameters relevant to the pathogenesis of diabetic nephropathy (glucose, creatinine, CRP, eGFR value) and trace element concentrations (zinc and copper). It was also important to perform an in silico analysis to study the interaction between two ACE domains – the N and C domains – and the ACEi drugs used in the treatment of diabetic kidney disease: benazepril, enalapril, lisinopril and ramipril.

**Materials and Methods:** To prepare the dissertation, the recent literature on the role of NOS isoforms in the pathogenesis of selected chronic diseases, including diabetes and diabetic

nephropathy, was first reviewed. Works on the significance of polymorphisms of genes encoding these isoforms were also analyzed.

In turn, for the preparation of original papers, a study group of 232 subjects was collected and divided into the following subgroups: patients with diabetic nephropathy (N=85), patients with diabetic nephropathy and after kidney transplantation (N=97), and a control group (N=50). The following parameters were determined in the serum of all subjects: concentration and activity of ACE, concentrations of NOS1, NOS2, NOS3, as well as concentrations of zinc and copper. Concentrations of individual ACE and NOS isoforms were determined using ELISA, ACE activity was determined using a colorimetric assay, and metal concentrations were determined using Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). In addition, results of glucose, creatinine and CRP concentrations and eGFR values were obtained from the Department of Nephrology, Transplant Medicine and Internal Medicine at the University Clinical Hospital in Wroclaw. In addition, the effects of seven polymorphisms on the aforementioned parameters were analyzed; these were rs4343 and rs4646994 (in *ACE*); rs3782218 (in *NOS1*); rs1137933 (in *NOS2*); rs1799983, rs2070744 and rs61722009 (in *NOS3*).

PCR and PCR-RFLP techniques were used for this purpose. *In silico* analysis was also performed using AutoDock Vina software. The STATISTICA 13.3 package was used to perform the statistical analysis.

**Results:** The review article revealed the complex role of NOS in the pathogenesis of diseases of many organs and systems. In particular, the correlations between *NOS2* and *NOS3* polymorphisms with the risk of developing insulin resistance, diabetes or diabetic nephropathy were noted. In addition, it was also noted that polymorphisms in *NOS1* were associated with an increased risk of cardiovascular disease, including hypertension or atherosclerosis.

When conducting studies on biological material collected from nephrology patients, it was shown that the rs4343 and rs4646994 polymorphisms in *ACE* were not associated with changes in the concentrations of the enzyme itself. In contrast, a decrease in ACE activity was observed in patients with diabetic nephropathy and the A/A genotype of the rs4343 polymorphism compared to controls. There were also lower levels of zinc in patients with diabetic nephropathy compared to controls. In turn, through the use of logistic regression, it was noted that the G/G genotype and the G allele of the rs4343 polymorphism alone were associated with an increased risk of developing diabetic nephropathy. Similar results were also obtained in patients who underwent kidney transplantation. On the other hand, after performing *in silico* analysis, it was noted that benazepril and lisinopril showed a significant preference in

binding to the C domain, which is relevant in the context of the rs4646994 polymorphism in

*ACE*. Similar relationships were not observed for enalapril and ramipril.

The effect of polymorphisms in *NOS1* and *NOS2* (rs3782218 and rs1137933, respectively) on changes in NOS1 and NOS2 concentrations was not demonstrated. However, it was noted that individual genotypes within the *NOS3* polymorphisms (rs1799983, rs2070744 and rs61722009) were associated with differences in NOS3 concentrations between the diabetic nephropathy group and the diabetic kidney transplant group and the control group (higher concentrations of this parameter were observed in the control group). In addition, similar to the study of the *ACE* polymorphisms – lower zinc concentrations were observed in patients with diabetic nephropathy and patients with diabetic nephropathy and kidney transplant patients compared to the control group. This was independent of the division by genotypes within the polymorphisms studied. In addition, it was shown that the C/C genotype and the C allele alone of the rs3782218 polymorphism in *NOS1* were associated with an increased risk of developing diabetic nephropathy and an increased likelihood of needing a kidney transplant. In contrast, the presence of the G allele of the rs1137933 polymorphism in *NOS2* decreased this likelihood.

 **Conclusions:** Genetic changes related to NOS isoforms, but also to ACE, affect the development of diabetes and its complications. Their study, and therefore a better understanding, may contribute to the development of new diagnostic parameters or more effective treatments.

Within the framework of this dissertation, the influence of selected polymorphisms of *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* and *ACE* on the risk of developing diabetic nephropathy, as well as on changes in the likelihood of needing renal replacement therapy, was demonstrated. The rs4343 polymorphisms in *ACE*, rs3782218 in *NOS1* and rs1137933 in *NOS2* seem to be particularly interesting and worthy of attention. However, further analyses that include a larger population are needed to confirm the results of these studies. And while the role of *NOS3* polymorphisms in the risk of diabetes complications has not been observed, lower NOS3 levels were observed in patients with these complications.

In addition, these studies underscored the importance of choosing ACEi drugs in the context of the genetic variability present in patients. The existence of a correlation between the efficacy of these preparations and the rs4646994 polymorphism in *ACE* indicates that conducting further research on this topic could contribute to the individualization of therapy, and thus more effective treatment of patients.