

Генетические маркеры и их взаимосвязь с обменом липидов на этапах развития микроангиопатий у детей и подростков

Е.Б. Кравец, Ю.Г. Самойлова, Е.В. Юрченко,
М. Б. Фрейдин, Е.В. Горбатенко, Е.А. Солодилова

*Сибирский Государственный медицинский университет
(ректор — член-корр. РАМН проф. В.В. Новицкий), Томск
НИИ медицинской генетики (дир. — проф. В.П. Пузырев) ТНЦ СО РАМН*

Актуальной проблемой является оценка комбинированного влияния экзогенных и эндогенных факторов риска на развитие микрососудистых осложнений при сахарном диабете типа 1 (СД 1). Доказано, что основным патогенетическим звеном в развитии сосудистых осложнений СД является хроническая гипергликемия. Учитывая, что не всегда качественный метаболический контроль позволяет предотвратить развитие диабетических осложнений, остается актуальным поиск потенциальных факторов риска развития микроангиопатий у больных СД. Результаты исследований свидетельствуют о большом значении нарушений липидного обмена в патогенезе микроангиопатий при СД типа 1 [1, 8, 16].

Для СД наиболее характерными нарушениями обмена липидов являются накопление в сыворотке крови атерогенного холестерина липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) и триглицеридов (ТГ). В последние годы был обнаружен еще один механизм, приводящий к повышению содержания ХС ЛПНП при СД — механизм неферментного гликозилирования липопротеинов низкой плотности. Процесс гликозилирования липидов нарушает их биологическую активность, транспорт в клетки и расщепление. Это способствует тому, что в клетки продолжает поступать ХС ЛПНП, несмотря на перенасыщение клеток холестерином. Кроме того, гликозилированный коллаген сосудов приобретает способность связывать в 3 раза большее количество ХС ЛПНП, чем коллаген здоровых людей. Данные механизмы способствуют резкому ускорению атерогенеза при СД. Большинство авторов признают важную роль гиперлипидемии в развитии и прогрессировании диабетической нефропатии (ДН) [2, 4, 5, 9, 12]. Некоторые исследователи опровергают данное утверждение [15].

Оценка действия нарушений обмена липидов на развитие диабетических микроангиопатий у детей и подростков с СД типа 1 изучена недостаточно. Исследования ангиопатий на популяционном и семейном уровне указывают на наличие генетического компонента в развитии этих осложнений [3, 6, 7, 13]. Наиболее перспективным подходом к оценке генетической предрасположенности к конкретным сосудистым осложнениям СД является изучение их ассоциации с определенными генами-кандидатами.

В число генов-кандидатов, продукты которых

могут участвовать в развитии диабетических ангиопатий, входят гены, кодирующие компоненты ренин-ангиотензиновой системы (РАС). Активность РАС регулируется уровнем продукции ангиотензиногена и активностью ренина и ангиотензинпревращающего фермента (АПФ).

Изучение генетической предрасположенности диабетической нефропатии затруднено многими обстоятельствами, что находит отражение в противоречивых данных об ассоциации полиморфизма генов ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) ангиотензиногена (АГТ) с данными ангиопатий.

Учитывая прогностическую значимость указанных процессов, целью нашего исследования явилось изучение взаимосвязи генетических маркеров с состоянием обмена липидов на этапах развития микроангиопатий у детей и подростков с СД типа 1.

Объем и методы исследования

Обследовано 138 детей (73 мальчика и 65 девочек), больных СД типа 1. Давность заболевания до 3 лет была у 49 пациентов от 3 до 5 лет у 26 и более 5 лет — у 54 больных. Большинство детей находились в фазе декомпенсации ($HbA_{1c} > 9\%$). Микроангиопатии диагностированы у 64 обследуемых, из них ретинопатия — у 19 (14%), нефропатия — у 16 (11%), сочетанная патология — ретинопатия и нефропатия — у 29 (21%) больных.

Давность СД до 6 лет была у 42 (43%) пациентов, от 7 до 12 лет — 37 (38%), после 12 лет — 51 (39%). Контрольную группу составили сибсы (54), что позволило лучше оценить влияние социальных факторов (одинаковые условия проживания, питания) на развитие изучаемой патологии и вклад генетических факторов.

Наряду с общепринятым клинико-инструментальным исследованием для диагностики диабетической ретинопатии использовались критерии Е. Koneg и М. Porta (1992). Скрининг диабетической ретинопатии проводился с помощью исследования глазного дна методом прямой офтальмоскопии после расширения зрачка. Диагностика нефропатии проводилась согласно классификации С. Mogensen и соавт. Из группы обследуемых 27 (30%) детей имели семейные случаи СД типа 1, 38 (42%) детей — СД типа 2, из них отягощенную наследственность по СД типа 1 и имели 11 (12%) детей.

Обследование здоровых сибсов включало подробный анали

Таблица 1

Показатель	Контроль n=26	Сахарный диабет типа 1			p*
		общая группа, n= 67	мальчики, n= 36	девочки, n=31	
ХС, ммоль/л	4,66±0,23	5,17±0,16	5,01±0,16	5,37±0,29	0,049
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,29±0,55	1,34±0,05	1,32±0,07	1,37±0,06	0,27
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,87±0,21	3,12±0,13	3,08±0,15	3,19±0,23	0,20
ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,50±0,25	0,67±0,04	0,66±0,06	0,69±0,06	0,005
ТГ, ммоль/л	1,10±0,11	1,49±0,09	1,45±0,14	1,55±0,11	0,003
ИА	3,58±0,26	3,66±0,22	3,83±0,34	3,47±0,29	0,89

* Достигнутый уровень значимости различий общей группы по сравнению с контролем.

анамнестических сведений, данные о перенесенных заболеваниях, наличии хронических очагов инфекций, аллергических реакций. Средний возраст здоровых sibсов равнялся 15,1±1,2 лет.

Проводили исследование липидного спектра крови, определение активности ангиотензинпревращающего фермента сыворотки крови и молекулярно-генетические исследования крови.

Исследование липидного спектра крови включало определение уровня общего холестерина (ХС), триглицеридов ферментативным методом с помощью наборов «Bioscop» (Германия). Содержание вычисляли по формуле: ХС ЛПОНП=ТГ/2,18; холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) вычисляли по формуле: ХС ЛПНП=ХС – (ХС ЛПВП + ХС ЛПОНП); коэффициент атерогенности (ИА) ТГ/2,18 – рассчитывали следующим образом: ИА=(ХС – ХС ЛПВП)/ХС ЛПВП. Для определения активности ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) сыворотки крови использовали метод G. Maguire и C. Price (1985), модифицированный П.П. Голиковым и Н.Ю. Николаевой (1998).

Выделение тотальной ДНК проводили с помощью неэнзиматического метода [13]. Для генотипирования I/D полиморфизма гена ангиотензинконвертирующего фермента (ACE) разделение продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. Применяли следующую номенклатуру аллелей гена ACE: аллель I (490 п.н.) – наличие (инсерция) Alu-повтора, аллель D – его отсутствие (делеция). Для анализа рестрикционно-го полиморфизма T174M гена ангиотензиногена (AGT) продукты амплификации подвергали гидролизу рестриктазой Bsp191 («Сибэнзим», Россия). При электрофоретическом разделении продуктов рестрикции выявляются 2 аллельных варианта: аллель T (отсутствие сайта рестрикции) – один фрагмент длиной 303 п.н.; аллель M (присутствие сайта) – два фрагмента 211 п.н. и 92 п.н.

Методы статистического анализа включали: дисперсионный анализ, линейный регрессионный, корреляционный анализ с определением ранговой корреляции, сравнение групп по критерию Стьюдента. Сравнение распределения генотипов и частот аллелей проводили с помощью критерия Х² с поправкой Йетса на непрерывность. Оценку связи изменчивости количественных признаков с генетическим полиморфизмом проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Манна-Уитни. Изучение ассоциации полиморфизма исследованных генов с патологией проводили с использованием теста на неравновесие при исследовании Transmission/Disequilibrium Test (TDT) [11]. Взаимоотношения между результатами диагностического теста и реальным наличием или отсутствием заболевания вычисляли с по-

мощью расчета чувствительности теста Se, специфичности теста Sp, распространенности заболевания P, прогностической ценности отрицательного результата -PV, прогностической ценности положительного результата +PV. Все расчеты по приведенным формулам выполняли с помощью программ Statistica 5.5., Microsoft Excel 97. Общая характеристика обмена липидов у обследуемых пациентов представлена в табл. 1.

Содержание ХС, ТГ, ХС ЛПОНП у детей с СД было повышенным по сравнению со здоровыми sibсами (контрольная группа) и зависело от наличия осложнений. Была отдельно выделена группа больных, у которых имелось сочетание диабетической нефро- и ретинопатии; согласно имеющимся данным, нарушения липидного обмена носят различный характер не только при наличии диабетической нефро- и ретинопатии, но и при их сочетании [10, 16].

Как видно из табл. 2 характеристика липидного спектра у данной группы больных имела свои особенности: статистически значимо повышался уровень ХС, ТГ, ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП. При формировании групп больных, имеющих только диабетическую нефро- или ретинопатию, не получено статистически значимых различий показателей липидного обмена по сравнению с группой без осложнений.

Для верификации достоверности полученных результатов мы провели оценку чувствительности и специфичности теста среди обследуемой группы пациентов (табл. 3). Нарушения липидного обмена у

Таблица 2

Содержание липидов в сыворотке крови детей, больных СД, в зависимости от наличия нефро- и ретинопатии (М±m)			
Показатель	Обследуемые с нефро- и ретинопатией, n=21	Обследуемые без осложнений, n=18	p*
ХС, ммоль/л	5,69±0,23	4,68±0,19	0,003
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,35±0,08	1,37±0,08	0,92
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,35±0,16	2,70±0,17	0,02
ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,81±0,08	0,57±0,08	0,007
ТГ, ммоль/л	1,76±0,18	1,32±0,18	0,01
ИА	4,2±0,53	3,27±0,25	0,27

* Достигнутый уровень значимости различий при сравнении групп больных с осложнениями и без осложнений.

Таблица 3

Характеристики липидного обмена у пациентов с СД типа 1, осложненным сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии, %

Показатель	+PV	-PV	Se	Sp	p
ХС, ммоль/л	67	81	82	65	46
ХС ЛПНП, ммоль/л	67	31	56	42	68
ХС ЛПОНП, ммоль/л	43	56	90	56	27
ТГ, ммоль/л	33	94	88	52	22

детей с сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии носили атерогенный характер и проявлялись в виде повышения уровня ХС, ТГ, ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП. Показатели ХС, ТГ и ХС ЛПОНП обладают наибольшей диагностической ценностью и имеют чувствительность более 80% при специфичности более 50%.

Имеются немногочисленные данные об ассоциации полиморфизма гена ACE с количественными показателями обмена липидов в различных популяциях и при сердечно-сосудистой патологии. В связи с этим особый интерес представляет изучение показателей липидного обмена у пациентов с СД типа 1 в зависимости от генотипов гена ACE. Показатели липидного обмена у пробандов с генотипами II, ID, DD гена ACE представлены в табл. 4.

Различия уровней показателей липидного обмена у детей с СД типа 1 в зависимости от генотипов гена ACE не установлены.

Дополнительно проведена оценка распределения генотипов гена ACE в зависимости от компенсации жирового обмена, сравнивались частоты встречаемости генотипов в группах с удовлетворительной и

Таблица 4

Показатель	Генотип II	Генотип ID	Генотип DD	p
ХС, ммоль/л	5,29±0,29	5,14±0,29	4,81±0,26	0,21
ХС ЛПВП, ммоль/л	5,64±4,29	5,19±3,79	6,20±4,94	0,55
ХС ЛПНП, ммоль/л	7,57±4,21	6,74±3,74	7,88±4,85	0,22
ХС ЛПОНП, ммоль/л	5,07±4,23	4,48±3,82	5,61±4,97	0,17
ТГ, ммоль/л	1,71±0,17	1,50±0,14	1,48±4,19	0,17
ИА	7,74±4,21	7,35±3,71	8,69±4,84	0,84

Таблица 5

Показатели обмена липидов у детей с СД типа 1 в зависимости от генотипов T174M полиморфизма гена AGT (Мет)

Показатель	Генотип ТМ+ММ	Генотип ТТ	p*
ХС, ммоль/л	5,88 0,58	4,93 0,16	0,04
ХС ЛПВП, ммоль/л	12,32 10,96	3,23 1,86	0,69
ХС ЛПНП, ммоль/л	14,75 10,66	4,72 1,84	0,01
ХС ЛПОНП, ммоль/л	11,81 11,02	2,54 1,87	0,23
ТГ, ммоль/л	1,86 0,3	1,47 0,09	0,22
ИА	15,49 10,6	5,21 1,84	0,07

* Уровень значимости различий при сравнении показателей липидного обмена у больных СД типа 1.

неудовлетворительной компенсацией жирового обмена. Статистически значимой разницы частоты встречаемости аллелей исследуемого полиморфизма в сравниваемых группах не найдено.

Анализ ассоциаций методом «случай-контроль» не обнаружил влияния на развитие диабетических микроангиопатий T174M полиморфизма гена AGT. Показатели липидного обмена у пробандов с генотипами ТТ, ТМ, ММ гена AGT представлены в табл. 5. Полученные данные свидетельствуют, что пациенты с СД типа 1, гомозиготные по аллелю Т, имеют статистически значимо более низкий уровень ХС и ХС ЛПНП и более удовлетворительное состояние жирового обмена по сравнению с пациентами с СД типа 1 гетерозиготами.

Сравнение распределения генотипов и частот аллелей T174M полиморфизма гена AGT у больных СД типа 1 в зависимости от компенсации жирового обмена показало, что в группе больных СД типа 1 с удовлетворительной компенсацией жирового обмена преобладает аллель Т (93 против 79%) и реже встречается аллель М (7 против 21%) по сравнению с больными СД типа 1 с неудовлетворительной компенсацией жирового обмена (табл. 6).

Не установлены значимые различия при сравнении показателей активности АПФ и генотипа полиморфизма гена AGT среди обследуемых с СД типа 1.

Таким образом, нами выявлены атерогенные нарушения липидного обмена в виде повышения уровня ХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПОНП в группе пациентов с сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии. Впервые проведена оценка диагностической ценности и чувствительности обнаруженных изменений показателей липидного обмена при диабетической нефро- и ретинопатии. Известно, что тяжесть гиперлипидемии прямо пропорциональна прогрессированию ДН, а так как в группе пациентов с ДН основную часть составили больные с нефропатией в стадии микроальбуминурии, можно предполагать, что нарушения липидного обмена в данной группе носят минимальный характер. Оценка диагностической ценности и чувствительности обнаруженных изменений уровня активности АПФ

Таблица 6

Распределение генотипов и частот аллелей T174M полиморфизма гена AGT у больных в зависимости от компенсации жирового обмена, p=0,03

Группа обследуемых	Генотипы (n)			Аллели (%)	
	ММ	ТМ	ТТ	М	Т
Пациенты с удовлетворительной компенсацией жирового обмена	0	8	52	7	93
Пациенты с неудовлетворительной компенсацией жирового обмена	0	5	7	21	79

при микроангиопатиях свидетельствовала, что показатели уровня активности АПФ обладают чувствительностью более 70% при специфичности более 50%. Сочетание гиперлипидемии и повышения уровня активности АПФ может служить фактором повышенного риска развития и прогрессирования диабетических микроангиопатий.

Анализ ассоциаций исследуемых полиморфизмов генов ACE и AGT с показателями липидного обмена обнаружил отсутствие ассоциации I/D полиморфизма гена ACE с характеристиками обмена липидов; обнаружена ассоциация T174M полиморфизма гена AGT с уровнем ХС и ХС ЛПНП. Гомозиготы ТТ имели статистически значимо более низкий уровень ХС и ХС ЛПНП по сравнению с группой гетерозигот по ТМ.

Выводы

1. Нарушения липидного обмена в виде атерогенных проявлений, повышения активности АПФ способствуют развитию и прогрессированию диабетических микроангиопатий.

2. Обнаружена зависимость между тяжестью СД типа 1, показателями липидного обмена (ХС и ХС ЛПНП) и T174M полиморфизма гена AGT. Гомозиготы ТТ имели более низкий уровень ХС и ХС ЛПНП.

3. Показатели липидного обмена, уровень АПФ (более 50 мкмоль/мин · л) могут быть использованы в качестве дополнительных критериев риска развития микроангиопатий.

Литература

1. Аметов А.С., Демидова Т.Ю. Дислипидемии при сахарном диабете 2 типа: Метод. пособие. М., 2001 с.32.
2. Дедов И.И. Введение в диабетологию. – М: Из-во Берг, 1998.-200 с.
3. Демуров Л.М. и др.// Молекулярная биология.- 1997.- Т. 31.- с. 59-62.
4. Оганов Р.Г., Александров А.А.// РМЖ.- 2002.-Т. 10., №11.- с. 15-17.
5. Северина А.С., Шестакова М.В.// Сахарный диабет.- 2001.- №3.-с. 59-60.
6. Чистяков Д.А. и др.// Молекулярная биология.- 1999.- Т. 34 №2.- с. 211-213.
7. Шахмалова М.Ш. и др.// Актуальные проблемы современной эндокринологии.- С.-П., 2001.- с. 235-237.
8. Щербакова М.Ю. Дислипопротеидемии.// Лечащий врач.- 1999.- №7.- с. 2-5.
9. Юшков П.В. Морфогенез микроангиопатий при сахарном диабете. //Сахарный диабет.- 2001. №1.- с. 53-56.
10. Coonrod B. et al // Diabetes Care.-1993.-Vol.16, №10. – p. 1376-1383.
11. Ewens F. Disease Association in the Transmission// Genetic Mapping. – 1999.- p.1.12.1-1.12.15.
12. Festa A. et al// Diabetologia. – 1998. – Vol. 41, №3. – p. 350-356.
13. Fujisawa T. et al// Diabetologia. – 1998. – Vol. 41, №1.- p. 47-53.
14. Lahiri D. // Biochem Biophys. Method. – 1992.- Vol. 25.- p. 193-205.
15. Maser R. et al.// Diabetes Care.-1993.-Vol.16, №5.- p. 755-758.
16. Ritter M.// Clin Chim Acta.- 1993.- Vol. 214, № 1.- p. 45-54.