

# Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента при сахарном диабете 1 типа у детей Сибири

Е.И. Кондратьева, В.П. Пузырев, Е.Б. Кравец,  
Т.В. Косянкова, Е.В. Вылегжанина,  
М.Б. Фрейдин, А.П. Деменкова

*Сибирский медицинский университет  
(ректор – член-корр. РАМН, проф. В.В. Новицкий),  
Научно-исследовательский институт медицинской генетики  
(дир. – член-корр. РАМН, проф. В.П. Пузырев) ТНЦ СО РАМН, Томск*

Эпидемиологические исследования при сахарном диабете 1 типа (СД 1) свидетельствуют об увеличении заболеваемости среди всех возрастных групп. Доля больных СД 1 составляет 7-15 % от всех больных диабетом, и смертность в этой группе превышает таковую у лиц с другими типами СД [2]. Специфические осложнения СД 1 зарегистрированы у 82,7 % больных, из них ретинопатия у 61,1 %, нейропатия – у 50,5 % и нефропатия – у 28,2 %. Диабетическая триопатия (ретинопатия, нейропатия, нефропатия) встречается у 8,2-19,2 % больных [2].

Клинические проявления и быстрое прогрессирование микроангиопатий при СД не всегда коррелируют с уровнем компенсации углеводного обмена, длительностью заболевания и лечением. Особый интерес представляет изучение генов-кандидатов, если продукт их экспрессии (фермент, гормон, рецептор) прямо или косвенно участвует в развитии патологического процесса при СД 1 [2, 4].

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) играет важную роль в регуляции давления и электролитного баланса крови, он вызывает гидролиз ангиотензина I и его превращение в ангиотензин II [11]. Ген АПФ заслуживает особого внимания не только в связи с его функцией в организме и ассоциацией его полиморфных маркеров с уровнем фермента, но и с растущей потребностью в использовании ингибиторов АПФ для реабилитации больных с диабетической нефропатией [1, 2, 8, 17-19].

Ген, кодирующий АПФ-АСЕ, локализован на хромосоме 17q23 [15], состоит из 26 экзонов общей длиной 4,3 т.п.о. и кодирует белок, состоящий из 1306 аминокислотных остатков, включая сигнальный пептид из 29 аминокислот. Среди различных полиморфных вариантов гена наиболее интенсивно изучается инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм, характеризующийся наличием или отсутствием фрагмента длиной 287 п.о. (копия Alu-повтора) в 16-м интроне. Появляется все больше данных о том, что I/D полиморфизм гена АСЕ связан с сердечно-сосудистыми нарушениями: атеросклерозом [6, 7], инфарктом миокарда [9], гипертрофией левого желудочка [6]. Во всех исследованиях, где ассоци-

ации были установлены, аллель D (генотип DD) был связан с болезнью. Однако некоторые авторы [9, 12] ассоциаций генотипа DD с сердечно-сосудистой патологией не выявили. В этиологии диабетической нефропатии среди генетических факторов риска обсуждается роль полиморфизма гена АСЕ. Первые сообщения об ассоциации двух полиморфных маркеров гена АСЕ с диабетической нефропатией были описаны в 1994 г. [11, 15].

Целью настоящей работы был поиск ассоциаций инсерционно-делеционного полиморфизма гена АСЕ с СД 1 типа, его клиническими особенностями и количественными показателями иммунитета и липидного обмена.

## Объем и методы исследования

Обследованы 113 детей с СД 1 типа в возрасте  $13,1 \pm 0,3$  лет, (мальчиков 53,1 %, девочек 46,9 %). Дети находились под наблюдением в клинике НИИ медицинской генетики Томского научно-го центра РАМН и эндокринологическом отделении детской больницы № 1 Томска.

Больные находились в состоянии клинической компенсации заболевания и (или) компенсации (субкомпенсации) углеводного обмена. Средний уровень гликированного гемоглобина составил  $11,2 \pm 0,4$  %. Давность СД до 3 лет была у 41 ребенка (36,1 %), от 3 до 7 лет – у 39 больных (34,5 %), более 7 – лет у 33 (29,2 %). Все дети получали базисно-болюсную инсулинотерапию. Потребность в инсулине в среднем составила  $0,6 \pm 0,02$  ЕД на 1 кг массы тела (различий в потребности инсулина в зависимости от пола ребенка не выявлено). В зависимости от потребности в инсулине дети были разделены на группы. Потребность в инсулине до 0,5 ЕД на 1 кг массы тела имела место у 8,6 % детей, в дозе 0,5-0,7 ЕД на 1 кг массы – у 26,7 % больных; суточная доза инсулина более 0,7 ЕД на 1 кг массы тела была у 64,8 % пациентов.

Критерием диагностики диабетической нефропатии у детей служила классификация С. Mogensen с соавт. (1983). Стадию микроальбуминурии диагностировали при альбуминурии от 30 до 300 мг в сутки, стадию протеинурии – при альбуминурии более 300 мг в сутки. В группе обследуемых не было пациентов с нарушенной азотовыделительной функцией почек, отсутствовали пороки развития и воспалительные заболевания мочевыводящей системы.

Контрольную группу составляли 122 человека, принадлежащих к русскому населению Томска и не имеющих по данным клинического и инструментального обследования СД и признаков сердечно-сосудистых нарушений.

Гликированный гемоглобин определяли колориметрическим методом. Уровень микроальбуминурии определяли с помощью наборов фирмы "Rondox" (Англия) на лазерном нефелометре "Boehring" (Австрия).

Исследовали иммунный статус 1-го уровня с определением уровня IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, FNO- $\alpha$  с помощью иммуоферментного метода реактивами фирмы "ООО" Протеиновый контур", С.-Петербург.

С помощью наборов фирмы "Bioson" (Франция) исследовали содержание общего холестерина (ХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов (ТГ). Определение изучаемых показателей проводили на биохимическом автоанализаторе FP-900 (Labsystems, Финляндия). Содержание холестерина липопротеидов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП); холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП); коэффициента атерогенности (ИА) рассчитывали по общепринятой методике [3].

У всех пациентов определяли показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию малонового диальдегида [5]; о состоянии антиоксидантной защиты судили по уровню каталазы [5]; активность 5'-нуклеотидазы оценивали по методу D.Lesso, E.Marinetti.

ДНК выделяли из образцов цельной крови с помощью неэнзиматического метода с некоторыми модификациями [13]. Для генотипирования I/D полиморфизма гена ACE ДНК амплифицировали в соответствующем участке путем полимеразной цепной реакции с использованием структуры праймеров и параметров температуры циклов. Применяли следующую номенклатуру аллелей: аллель I соответствовал длине 490 п.н. – наличие (инсерция) Alu-повтора, аллель D (190 п.н.) – его отсутствие. В работе были использованы реактивы фирм Медиген и СибЭнзим (Новосибирск).

Тестирование распределения генотипов на равновесие Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность, а в случае малых объемов групп – с помощью теста Фишера [25]. Для оценки ассоциаций полиморфизма с патологическими фенотипами рассчитывали относительный риск (RR) по формуле:  $RR=ad/bc$ , где a – частота анализируемого аллеля у больных; b – частота анализируемого аллеля в контрольной выборке; c и d – суммарная частота альтернативного аллеля у больных и в контроле соответственно [7].

Для поиска ассоциации частоты патологии с генетическими маркерами был использован тест на неравновесие по сцеплению – Transmission/Disequilibrium Test (TDT) [7]  $TDT=(b-c)2/(b+c)$ , где b и c – наследуемые аллели от гетерозиготных родителей.

Все расчеты по приведенным формулам выполняли в компьютерных пакетах прикладных программ STATISTICA 5.0, Microsoft Excel-97.

## Результаты и их обсуждение

Проведен анализ особенностей клинического течения СД I типа у детей, проживающих в Сибирском регионе. Средний возраст больных во время

дебюта СД составил  $9,1 \pm 0,3$  г. Манифестация заболевания у 20,4 % пациентов наступила в возрасте до 7 лет, у 59,2 % – от 7 до 11 лет и у 20,4 % – в период пубертата. Инфекционный фактор был провоцирующим у 17,7 % больных, стресс – у 44,2 %, лекарственная терапия (лечение описторхоза) спровоцировала манифестацию заболевания у 1,8 % детей. Провоцирующий фактор отсутствовал в анамнезе у 31 % детей с диабетом. Стресс как провоцирующий фактор дебюта заболевания преобладал у мальчиков (53,3 % против 34 % у девочек).

В коматозном состоянии при манифестации заболевания поступили 22 (19,4 %) пациента. Ремиссия СД ("медовый месяц") отмечалась в анамнезе у 23 % больных, чаще регистрировалась у мальчиков (30 %), в 15,1 % у девочек. Ремиссия более 3 мес. зарегистрирована у 16 детей (10 мальчиков и 6 девочек). На 1-м году заболевания потребность в инсулине до 0,5 ЕД на 1 кг массы тела чаще отмечалась у мальчиков (у 9 мальчиков и 1 девочки).

Коматозные состояния в анамнезе отсутствовали у 69,9 % детей. Гипергликемическая кетоацидотическая кома имела место у 25,7 % больных.

Диабетическая нефропатия зарегистрирована у 19,6 % больных, из них – у 16 девочек и 6 мальчиков. Стадия микроальбуминурии диагностирована у 13 детей, стадия протеинурии с сохранной азотовыделительной функцией почек – у 9. Таким образом, нефропатия чаще наблюдалась у девочек (30,2 % от общего количества девочек и 10,2 % от общего числа мальчиков).

Частоты аллелей, распределение генотипов гена ACE, а также оценка их соответствия равновесию Харди-Вайнберга в группе контроля и у больных СД представлены в табл. 1. Анализ распределения генотипов II, ID и DD I/D полиморфизма гена ACE в группе больных не выявил достоверного отклонения от равновесия Харди-Вайнберга ( $p < 0,05$ ). Гетерозиготность среди больных СД соответствовала ожидаемой (0,47 и 0,49 соответственно). Частоты аллелей

Таблица 1

Распределение генотипов и частот аллелей I/D полиморфизма гена ACE у больных СД I типа и здоровых лиц

Группа	Генотип	n	$\chi^2$ d.f. = 1	H.o. $\pm$ s.e. Y.e. $\pm$ s.e.
Больные СД I n = 123	II	27	0.2990 p>0,05	H.o. = 0,4715 $\pm$ 0,0450 H.e. = 0,4960 $\pm$ 0,0063
	ID	58		
	DD	38		
Контроль n = 123	II	24	0.000011 p>0.05	H.o. = 0.4878 $\pm$ 0.0451 H.e. = 0,4926 $\pm$ 0,0082
	ID	60		
	DD	39		

Примечание: n – наблюдаемая численность генотипов;  $\chi^2$  – критерий использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга; H.o. и H.e. – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность с ошибкой; d.f. – число степеней свободы.

I и D соответственно составили 45,5 % и 54,5 %. Полученные данные согласуются с показателями распределения частот аллелей I/D полиморфизма гена ACE в других популяциях (табл. 2). Так, частота аллеля D в различных популяциях варьирует от 36 % (японская популяция) до 67 % (Московская популяция) [2, 22, 24]. Анализ материала методом "случай-контроль" (больные СД – здоровые лица) показал наличие ассоциации I/D полиморфизма гена ACE с заболеванием (RR=1,1), однако взаимосвязь не является достоверной (табл. 3).

Таблица 2

Распределение маркерных аллелей I и D гена ACE среди больных СД I типа и здоровых лиц

Группа	n	Частота аллелей, %		$\chi^2$	p	RR
		I	D			
Больные СД I	123	46	54	0,299	0,786	1,1
Контроль	122	44	56			

Таблица 3

Распределение генотипов и частот аллелей I/D полиморфизма гена ACE в зависимости от наличия нефропатии у детей с СД

Диабетическая нефропатия	II	ID	DD	$\chi^2/p$	I	D	$\chi^2/p$
+	5	9	8	0,299/	43,2	56,8	0,041/
-	20	47	27	0,861	46,3	53,7	0,839

Результаты теста на неравновесие по сцеплению показали ассоциацию аллеля D с диабетической нефропатией (TDT=3,6,  $p<0,05$ ). Таким образом, нами впервые с помощью анализа семейного материала была получена данная ассоциация. Наличие ассоциации I/D полиморфизма гена ACE с диабетической нефропатией не случайно. Оно основано на роли АПФ в регуляции тонуса сосудов, а в рассматриваемом случае – сосудов почек [1, 12].

Исследования роли аллеля D и DD генотипа в развитии диабетической нефропатии строились на основании достоверности различий частот аллелей и генотипов полиморфных локусов в группах сравнения с последующим расчетом относительного риска [2, 4, 11, 15]. В популяциях ряда европейских стран было показано, что у больных с генотипом DD быстро прогрессировали нарушения со стороны почек [21]. В Московской популяции наличие аллеля I препятствовало развитию нефропатии полиморфизма гена ACE с нефропатией, что связывается с неоднородностью сравниваемых групп, расовыми и этническими вариациями в распределении частот встречаемости генетического маркера, а также с распространенностью диабетической нефропатии и особенностями ее течения [4, 16, 20].

В настоящем исследовании обнаружена зависимость потребности в инсулине у больных СД I от I/D полиморфизма гена ACE. Дети со II генотипом имели более низкую потребность в инсулине ( $p<0,045$ ) в отличие от больных с генотипом DD (табл. 4). Ассоциации генотипов I/D полиморфизма гена ACE (ИМТ) не было.

Таблица 4

Анализ I/D полиморфизма гена ACE в зависимости от ИМТ и потребности в инсулине у больных СД

Генотип	ИМТ	Потребность в инсулине, ЕД на 1 кг массы тела
DD (1)	17,62 ± 0,54 (n = 26)	0,67 ± 0,04 (n = 26)
ID (2)	18,64 ± 0,36 (n = 56)	0,60 ± 0,03 (n = 58)
II (3)	18,98 ± 0,66 (n = 34)	0,56 ± 0,03 (n = 36)
F	1,542	2,076
P	0,218	0,130
p для парных исследований	-	1-3: 0,045

Примечание: p- 1-3 - отличия для групп DD и II.

Проведен анализ зависимости количественных показателей иммунного статуса и липидного обмена от генотипов изучаемого гена. Установлена ассоциация генотипа II у больных СД I с высоким содержанием IL-6, который является защитным фактором эндотелия сосудов.

Уровень IL-6 у детей с генотипом DD составил 3,88±3,71 пг/мл, а с генотипом II – 14,90±6,09 пг/мл ( $p=0,029$ ).

Установлена зависимость показателей липидного обмена от генотипов гена ACE у больных СД I. Уровень ТГ и ХС ЛПОНП у детей с генотипом II достоверно превышал показатели у детей с генотипом DD (табл. 5). Анализ показателей липидного

Таблица 5

Показатели липидного обмена и I/D полиморфизм гена ACE у детей и подростков с СД I типа

Генотипы	Группа	ХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ХС ЛПНП, ммоль/л	ИА	ХС ЛПОНП, ммоль/л
DD n=13	1-я	5,59 ± 0,61	1,17 ± 0,10 $p_{1-3}<0,05$	1,54 ± 0,10	3,27 ± 0,49	3,01 ± 0,30	0,53 ± 0,04 $p_{1-2}<0,01$ $p_{1-3}<0,01$
ID n=35	2-я	5,00 ± 0,18	1,52 ± 0,14	1,40 ± 0,07	3,00 ± 0,13	3,29 ± 0,22	0,66 ± 0,05
II n=13	3-я	5,49 ± 0,41	1,86 ± 0,26	1,28 ± 0,08	3,36 ± 0,40	3,85 ± 0,43	0,91 ± 0,12

Примечание:  $p_{1-2}$ ,  $p_{1-3}$  – достоверность различий показателей между группами.

обмена у больных СД I показал достоверное повышение уровня ХС, ТГ, ХС ЛПНП и индекса атерогенности (ИА) у детей с диабетической нефропатией (табл. 6). Показатели липидов случайной выборки, использовавшейся в эпидемиологическом исследовании факторов риска развития ИБС

Таблица 6

Показатели липидного обмена в сыворотке крови детей с СД 1 типа и нефропатией ( $\bar{X} \pm m$ )

Показатель	Нефропатия			Контроль
	без нефропатии n = 82	стадия микроальбуминурии n = 14	стадия протеинурии n = 14	
ХС, ммоль/л	4,76 ± 0,13 p <sub>1-2</sub> < 0,01 p <sub>1-3</sub> < 0,01	5,60 ± 0,26 p < 0,001	5,96 ± 0,58 p < 0,001	4,51 ± 0,13
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,38 ± 0,04 p < 0,001	1,44 ± 0,11 p < 0,001	1,14 ± 0,13 p < 0,05	1,10 ± 0,03
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,97 ± 0,13 p <sub>1-3</sub> < 0,05	3,29 ± 0,18 p < 0,01	3,70 ± 0,35 p < 0,01	2,78 ± 0,11
ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,56 ± 0,02 p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001	0,85 ± 0,09 p < 0,01	0,80 ± 0,12	0,61 ± 0,05
ТГ, ммоль/л	1,21 ± 0,05 p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001	1,86 ± 0,19 p < 0,01	1,75 ± 0,26	1,37 ± 0,10
ИА	2,61 ± 0,12 p < 0,01 p <sub>1-3</sub> < 0,001	3,04 ± 0,19 p <sub>2-3</sub> < 0,05	5,15 ± 0,92 p < 0,01	3,24 ± 0,20

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем;

p<sub>1-2</sub> - достоверность различия показателей между группами больных без нефропатии и с нефропатией в стадии микроальбуминурии;p<sub>1-3</sub> - достоверность различия показателей между группами больных без нефропатии и с нефропатией в стадии протеинурии;p<sub>2-3</sub> - достоверность различия показателей между группами больных с нефропатией в стадии микроальбуминурии и протеинурии.

в Томске зависели от генотипов гена ACE: отмечено увеличение показателей обмена липидов у больных с аллелем I [6]. Полученные результаты могут служить объяснением отсутствия ассоциации диабетической нефропатии с I/D полиморфизмом гена ACE у больных СД 1 типа с помощью расчета критерия относительного риска в популяции. В целом полученные данные свидетельствуют о многообразии факторов, играющих роль в развитии диабетической нефропатии.

## Выводы

1. В Сибирской популяции сахарный диабет 1 типа у большинства детей манифестируется в возрасте 7-11 лет, чаще встречается среди мальчиков, у которых имеет стабильное течение; чаще достигается ремиссия на первом году заболевания, ниже потребность в инсулине, реже развивается диабетическая нефропатия.

2. Результаты теста на неравновесие по сцеплению на семейном материале показали наличие взаимосвязи аллеля D с диабетической нефропатией.

3. Установлены ассоциации показателей липидного обмена, IL-6 и потребности в экзогенном инсулине с генотипами I/D полиморфизма гена ACE.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РГНФ (грант № 00-06-00162a) и РФФИ (№00-15-97876).*

## Литература

1. Воронцов А.В., Шестакова М.В. // Проблемы эндокринологии. - 1997. - № 4. - С. 37 - 42.
2. Дедов И.И. // Вестник РАМН. - 1998. - № 7. - С. 24-29.
3. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. - СПб: Питер Пресс, 1995.
4. Кондратьев Я.Ю., Чугунова Л.А., Шамхалова М.Ш., Шестакова М.В. с соавт. // Проблемы эндокрин. - 1998. - Т. 44, № 4. - С. 12-15.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И. // Лабораторное дело. - 1998. - № 1. - С. 45-52.
6. Степанов В.А., Пузырев В.П., Карпов Р.С. // Сибирский медицинский журнал. - 1999. - Том. 13, № 3. - 4. - С. 20-25.
7. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. В 3 т. Пер. с англ. - М. «Мир», 1990. - 366 с.
8. Arbustini E., Grasso M., Fasani R. // Brit. Heart J. - 1995. - V. 74. - P. 584-591.
9. Bobn M., Berge K.E., Bakken A. et al. // Clin. Genet. - 1993. - V. 44. - P. 292-297.
10. Cambien F., Piorier O., Lecerf L. et al. // Nature. - 1992. - 359. - P. 641-644.
11. Doria A., Warram J.H., Krolewski A.S. // Diabetes. - 1994. - V. 43. - P. 690-695.
12. Hilgers K.F., Norwood V.F., Gomez R.A. // Semin. Nephrol. - 1997. - Sep; 17(5). - P. 492-501.
13. Lahiri D.K., Bye S., Nunberg J.I. et al. // J. of Biochemical and Biophysical methods. - 1992. - Vol. 25. - P. 193-205.
14. Lesko D.N., Marinetti E.V. // Biochim. et Biophys. Acta. - 1972. - Vol. 266. - P. 511-523.
15. Marre M., Bernadet P., Gallous Y. et al. // Diabetes. - 1994. - V. 43. - P. 384-388.
16. Mattei M.G., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al. // Cytogenet. Cell. Genet. - 1989. - Vol. 51. - P. 1041-1045.
17. Panagiotopoulos S., Smith T.J., Aldred P. et al. // J. Diabet. Compl. - 1995. - V. 9. - P. 272-276.
18. Remuzzi G., Ruggenenti P. // Diabetes Res. Clin. Pract. - 1998. - Apr; 39. - Suppl. - P. 49-53.
19. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al. // J. Clin. Invest. - 1990. - Vol. 86. - P. 1343-1346.
20. Ruggenenti P., Remuzzi G. // Exp. Nephrol. - 1996. - V. 4. - Suppl 1. - P. 53-60.
21. Sbadrina M.I., Slominsky P.A., Perova N.V., Limborska S.A. // Am. J. Hum. Genet. - 1996. - Suppl. - P. 376.
22. Stoneking M., Fontius J., Clifford S. et al. // Genom Research. - 1997. - Vol. 7. - P. 1061-1071.
23. Tarnov L., Gambien F., Rossing P., Nielsen F.S. et al. // Diabetes. - 1996. - V. 45. - N3. - P. 367-369.
24. Yu-Lin Ko., Yu-Shien Ko., Shu-Mei Wang X.L. et al. // Hum. Genet. - 1997. - Vol. 100. - P. 21-214.
25. Zar J.H. Biostatistical Analysis. - New Jersey, Prentice Hall International, Inc., 1999. - P. 750.