

© Ж.В.Шуцкая, Е.Б.Башнина, Н.Д.Савенкова, 2008
УДК 616.379-008.64:616.61]-02:575

Ж.В. Шуцкая, Е.Б. Башнина, Н.Д. Савенкова

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У БОЛЬНЫХ С АЛЛЕЛЬНЫМИ ВАРИАНТАМИ С677Т ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА МТГФР ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 7-ЛЕТНЕГО КАТАМНЕЗА

Zh.V. Shutskaya, E.V. Bashnina, N.D. Savenkova

PREVALENCE OF DIABETIC NEPHROPATHY IN PATIENTS WITH ALLELE VARIANTS OF C677T POLYMORPHISM OF METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE BY THE RESULTS OF 7-YEARS CATAMNESIS

Городской диабетологический центр для детей и подростков, кафедра факультетской педиатрии Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ являлось 7-летнее катamnестическое наблюдение больных с сахарным диабетом 1 типа с различными аллельными вариантами гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР). **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** В исследовании были включены 98 пациентов с различными генотипами. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Полученные данные показали частоту развития диабетической нефропатии (ДН) у лиц с ТТ генотипом (0,30) выше по сравнению с пациентами, имеющими генотип СС (0,11) и СТ (0,09) ($p < 0,05$). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты исследования подтверждают, что у пациентов с сахарным диабетом 1 типа определение ТТ генотипа может быть использовано в качестве одного из критериев прогноза развития ДН в клинической практике.

Ключевые слова: диабетическая нефропатия, генетика диабетической нефропатии, С677Т полиморфизм МТГФР.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was a 7-years catamnestic observation of patients with I type diabetes with different allele variants of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. **PATIENTS AND METHODS.** The investigation included 96 patients with different genotypes. **RESULTS.** The data obtained have shown the frequency of the development of diabetic nephropathy (DN) in patients with TT genotype (0.30) to be higher than in patients having genotype CC (0.11) and CT (0.09) ($p < 0.05$). **CONCLUSION.** The results of the investigation have confirmed that the genotype TT determination in patients with I type diabetes mellitus can be used as one of criteria of prediction of the development of DN in clinical practice.

Key words: diabetic nephropathy, diabetic nephropathy genetics, C677T MTHFR polymorphism.

ВВЕДЕНИЕ

Диабетическая нефропатия (ДН) продолжает занимать ведущее место среди причин ранней инвалидизации и смертности больных с сахарным диабетом 1 типа (СД). Современная тактика ведения ДН предполагает максимально раннюю диагностику, профилактику и лечение [1, 2]. Учитывая доказанную роль наследственных факторов в формировании нефропатии [3, 4], большой интерес при обследовании пациентов с СД представляют методы молекулярно-генетического анализа.

Выявление конкретных генетических маркеров может позволить идентифицировать группу повышенного риска развития в диабетической популяции. С позиций практической медицины интерес представляет полиморфизмы генов, являющихся, с одной стороны, диагностическими маркерами

предрасположенности к ДН, а с другой – фенотипическая экспрессия которых доступна фармакологической коррекции. Выявление таких ДНК-полиморфизмов у больных СД даст возможность своевременно проводить превентивную патогенетическую коррекцию биохимических нарушений, обусловленных генетическими факторами, проявить повышенное внимание к проблеме компенсации углеводного обмена у лиц «группы наследственного риска» и тем самым улучшить прогноз заболевания [5].

С этой точки зрения научно-практический интерес представляет С677Т полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР), ассоциированный с повышением в плазме эндотелиотоксичного вещества гомоцистеина (Нсу). Ген МТГФР локализован на 21 хромосоме и кодирует образование фермента 5,10-метилентетрагидрофо-

латредуктазы. Замена в молекуле ДНК цимитидина на тимидин приводит к замещению аланина на валин в кодируемой белковой молекуле и, как следствие, к продукции т.н. термолабильной формы менее активного фермента. В связи с этим у гомозигот (ТТ) при этом наблюдается снижение активности данного фермента до 30%, а у гетерозигот (СТ) – до 65% от обычного уровня. Наличие ТТ-генотипа ведет к закономерному повышению уровня эндотелиотоксичного вещества гомоцистеина (см. рисунок) примерно в 2 раза по сравнению с СС-субъектами. При этом уровень гомоцистеина у гетерозигот (СТ) не повышен [6].

Целым рядом исследований продемонстрирована связь С677Т полиморфизма, ассоциированного с гомоцистеинемией с венозными тромбозами, поражением периферических, церебральных и коронарных сосудов, инфарктом миокарда [7], а также нефро- и ретинопатией при сахарном диабете 2 типа [8].

Целью настоящего исследования являлось наблюдение в катамнезе детей и подростков с СД 1 типа для изучения частоты развития ДН в группах с различными аллельными вариантами С677Т полиморфизма гена МТГФР.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В ходе нашего исследования под наблюдением находилось 98 больных СД 1 типа (50 лиц мужского и 48 женского пола). Дети и подростки, включенные в исследование, являлись жителями Санкт-Петербурга и не были связаны узами родства. Возраст пациентов составлял от 11 до 17 лет ($13,2 \pm 2,2$). Длительность заболевания на момент проведения молекулярно-генетического обследования составляла от 1 до 8 лет ($5,1 \pm 2,5$). Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) составлял $7,9 \pm 0,8\%$.

ДНК обследуемых больных выделена фенол-хлороформным методом. С677Т полиморфизм гена МТГФР определяли путем ПЦР с последующим рестрикционным анализом. В 1999 г. нами была установлена связь С677Т полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) с ДН при СД 1 типа [8]. Исследования были проведены на базе Лаборатории молекулярной генетики СПбГПМА (научный руководитель – д.м.н., проф. Шварц Е.И.) [9]. Полученные результаты явились основой для настоящей работы.

Длительность катамнестического наблюдения за пациентами в условиях специализированного диабетологического центра составила 7 лет. В комплекс обязательных обследований включен тест на наличие микроальбуминурии (МАУ) с исполь-

зованием тест-полосок «Micral-test» (Boeinger Mannheim). Критерием диагностики начинающейся ДН служила микроальбуминурия (МАУ) в пределах 30-300 мг/сут (классификация С.Е. Mogensen и соавт., 1983). Обязательным условием для установления диагноза ДН являлся повторный положительный тест МАУ, проведение подтверждения в стадии компенсации или субкомпенсации углеводного обмена при отсутствии активного воспалительного процесса в мочевыделительной системе.

Статистическая обработка данных проведена с применением пакета статистики SPSS в версии 10.0. Использован тест Левена на гомогенность дисперсий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

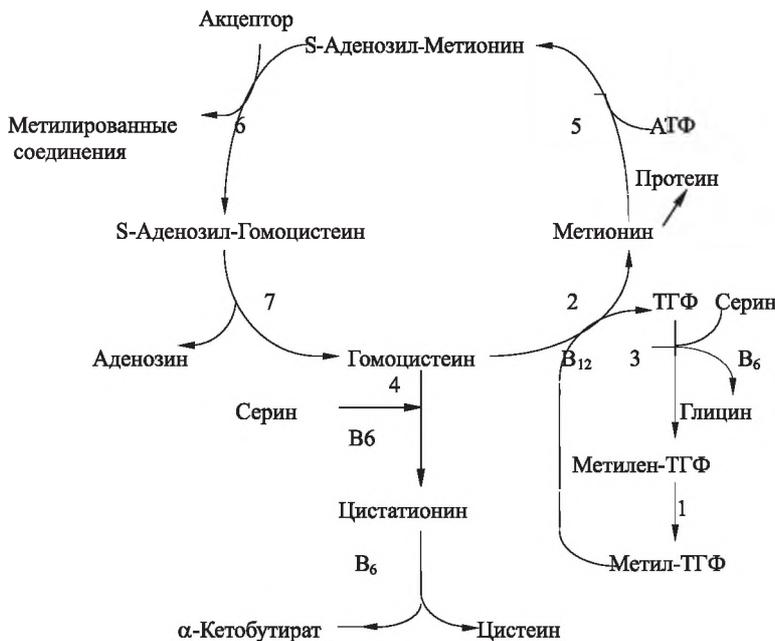
В результате катамнестического наблюдения детей и подростков с СД 1 типа с различными аллельными вариантами С677Т полиморфизма гена МТГФР. В начале исследования 98 пациентам было проведено генотипирование, по результатам которого больные были разделены на три группы – гомозиготные носители нормального аллеля – СС-генотип (36), гетерозиготы СТ-генотип (41) и гомозиготные носители полиморфного аллеля (21) соответственно. Больные с ТТ-генотипом представляли собой «группу наследственного риска» по развитию ДН.

На первом году наблюдения микроальбуминурия выявлена у 3 подростков (2 больных с ТТ и 1 с СС генотипом). В дальнейшем частота встречаемости в исследуемой группе увеличивалась с каждым годом наблюдения. Этот факт являлся ожидаемым, учитывая, что длительность гипергликемии безусловно представляет основной фактор развития сосудистых осложнений при СД, в частности, ДН. Однако распространенность нефропатии оказалась различной в группах с различными

Частота встречаемости диабетической нефропатии у больных с различными генотипами МТГФР (результаты 7-летнего катамнеза)

Генотип//наличие ДН	ДН+ (%n)	ДН- (%n)
СС (n)	4 (0,11)	32 (0,88)
СТ(n)	4 (0,09)	37 (0,90)
ТТ(n)	7 (0,30)	14 (0,70)

• $p < 0,05$ (Статистическая обработка данных проведена с применением пакета статистики SPSS в версии 10.0. Использован тест Левена на гомогенность дисперсий). МТГФР – метилентетрагидрофолатредуктаза, СС, СТ, ТТ – различные генотипы МТГФР. ДН(+) – пациенты с диабетической нефропатией; ДН(-) – пациенты без диабетической нефропатией; n – количество пациентов в группе; %n – относительное количество от числа пациентов с отдельным генотипом.



ТГФ – тетрагидрофолат,
 1 – метилтетрагидрофолат редуктаза,
 2 – метионинсинтетаза,
 3 – серингидроксиметилтрансфераза,
 4 – цистотионин β-синтетаза,
 5 – метионинаденозилтрансфераза,
 6 – S-аденозилметилтрансфераза,
 7 – S-аденозилгомоцистеингидролаза.

Пути метаболизма гомоцистеина.

аллельными вариантами С677Т полиморфизма гена МТГФР. Так, через 3 года наблюдения (микроальбуминурическая стадия) выявлена еще у 1 пациента с СС генотипом, составляя на тот момент (0,06) от общего числа больных с данным аллельным вариантом и 2-х пациентов с СТ генотипом – (0,07), соответственно. При этом, начинающаяся ДН диагностирована еще у 2-х пациентов из группы «наследственного риска», в целом составляя (0,30). Аналогичная тенденция в распространенности нефропатии в наблюдаемых группах сохранялась при последующем наблюдении [10]. Результаты 7-летнего катамнестического наблюдения пациентов с СД 1 типа представлены в таблице.

Как видно из представленных в таблице данных, выявлена достоверно более высокая частота ДН у лиц из группы «наследственного риска», по сравнению с больными, имеющими СС и СТ генотип ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные исследования демонстрируют роль метаболических нарушений и длительности диабета как основных факторов риска развития ДН. Однако клинические проявления и быстрота прогрессирования далеко не всегда коррелируют с уровнем компенсации углеводного

обмена, длительностью и(или) проводимым лечением. У ряда больных диабетическое поражение почек развивается достаточно рано на фоне хорошей и удовлетворительной компенсации, у других пациентов почки остаются интактными после 40 лет плохо компенсированного диабета. Изучение на популяционном и семейном уровнях, несомненно, свидетельствует о наличии генетического компонента в этиопатогенезе ДН [4].

Основой молекулярно-генетического подхода к изучению любой патологии, в том числе и ДН, является представление об ассоциации определенных аллелей полиморфных генетических маркеров с предрасположенностью или устойчивостью к патологии. Если продукт экспрессии гена (например, фермент) может прямо или косвенно участвовать в развитии заболевания, то его (ген) принято считать «кандидатным». В связи с этим выбор таких генов осуществляется исходя из представлений о патогенезе заболевания. Известно, что общим «корнем» всех диабетических ангиопатий и самым ранним их проявлением является изменение работы клеток эндотелия сосудов – эндотелиальная дисфункция. Исследования показали, что промежуточный продукт обмена аминокислоты метионина гомоцистеин в повышенной концентрации обладает эндотелиотоксическим эффектом [10] и является независимым фактором риска поражения сосудов различной локализации. Многочисленные исследования показали достоверно более высокую частоту встречаемости ТТ генотипа у больных сосудистой патологией, в том числе при ДН у больных с СД 1 и 2 типа [8, 9].

Основной целью нашего исследования являлось изучение целесообразности выявления ТТ генотипа МТГФР в клинической практике, как генетического фактора риска развития ДН у детей и подростков с СД. Наблюдение в динамике пациентов СД «группы риска» (ТТ генотип МТГФР) показало, что диабетическое поражение почек у таких пациентов развивалось чаще, чем в группе больных с другими генотипами (СС и СТ). В связи с этим, полученные результаты исследования показывают целесообразность молекулярно-генетического обследования детей и подростков с СД в дебюте основного заболевания для выявления лиц, имеющих наследственный риск развития нефропатии. Прогностическая значимость определения ТТ ге-

нотипа МТГФР обусловлена также возможностью фармакологической коррекции повышенной концентрации гомоцистеина. По данным исследований, применение фолиевой кислоты и ее производных, иногда в сочетании с витаминами В₆ и В₁₂, приводит к нормализации уровня гомоцистеина (см. рисунок) и, следовательно, нивелированию одного из значимых факторов развития сосудистой патологии [12].

Таким образом, наряду с основными факторами риска, такими, как метаболические нарушения, длительность СД, генетические факторы являются значимыми в развитии ДН. Использование методов молекулярно-генетического анализа, в частности определение ТТ генотипа МТГФР, у больных СД является одним из критериев при формировании группы риска по развитию нефропатии, а также показанием к разработке дополнительных к метаболическому контролю методов профилактики и лечения ДН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдение в динамике детей и подростков с СД 1 типа показало более высокую частоту развития ДН у лиц с ТТ генотипом гена МТГФР по сравнению с пациентами, имеющими СТ и СС генотипы. Различия достигли статистической достоверности ($p < 0,05$). Полученные данные показывают влияние гомозиготного носительства С677Т полиморфизма гена МТГФР (ТТ генотип) в формировании предрасположенности к ДН при СД 1 типа. Результаты исследования оправдывают целесообразность определения данного генетического маркера

в клинической практике у пациентов с СД 1 типа, как одного из критериев прогноза развития ДН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дедов ИИ, Кураева ТЛ, Петеркова ВА. Сахарный диабет у детей и подростков. ГЭОТАР Медиа, М., 2007; 96-99
2. Дедов ИИ, Шестакова МВ. *Диабетическая нефропатия*. Универсум Паблишинг, М., 2000; 80-98
3. Папаян АВ, Шуцкая ЖВ. Современные методы профилактики прогрессирования диабетической нефропатии в детском возрасте. *Рос вестн перинат и педиатр* 1998 (4) 34-37
4. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 30-33
5. Шуцкая ЖВ. *Клинико-генетические особенности диабетической нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей*: Дисс. канд.мед.наук...СПб, 2000
6. Fodinger M, Wagner OF, Horl WH, Sun der-Plassmann G. Recent insights into molecular genetics of the homocystein metabolism. *Kidney Int* 2001; 59 (78): 238-242
7. Arruda VR, von Zuben PM, Chiaparrini LC. The mutation Ala-Val in methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Tromb-Haemost* 1997;77: 818-821
8. Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy in NIDDM patients. *Lancet* 1998; 352: 452
9. Schwartz EI, Shcherbak NS, Shutskaya ZV, Sheidina AM et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy in IDDM patients. *Molec Gen Metabol* 1999; 68: 375-78
10. Шуцкая ЖВ, Башнина ЕБ, Савенкова НД. 6-летний катамнез детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа, имеющих ТТ генотип МТГФР. VI Российский конгресс по детской нефрологии (2007):110
11. Wotherspoon F, Laight DV. Homocysteine, endothelial dysfunction and oxidative stress in type diabetes mellitus. *Diabetes Vas Dis* 2003; 3: 334-340
12. Сапега А, Carrea A, Caridi G. Homocystein, folate, vitamin B12 levels and С677Т МТНFR mutation in children with renal failure. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 114-118

Поступила в редакцию 17.12.2007 г.

Принята в печать 19.02.2008 г.