

Стратегия поиска маркеров генетической предрасположенности к сосудистым осложнениям сахарного диабета на примере диабетической нефропатии

Я.Ю. Кондратьев¹, М.В. Шестакова, Л.А. Чугунова, М.Ш. Шамхалова, *Л.М. Демуров, *Д.А. Чистяков, *Р.А. Туракулов, О.К. Викулова, *В.В. Носиков, И.И. Дедов

Эндокринологический научный центр РАМН
(дир.-акад. И.И.Дедов), Москва

*Государственный научный центр РФ "Гос НИИ Генетика".
(дир.-член-корр. РАН В.Г.Дебабов), Москва

Сосудистые осложнения сахарного диабета, как и основное заболевание, являются клинически гетерогенными и этиологически многофакторными патологиями, развитие которых находится под полигенным контролем. Можно выделить несколько групп факторов, взаимодействие которых в конечном счете приводит к клинической манифестации ангиопатий: гормонально-метаболические, генетические, экологические, а также ментальные и социально-поведенческие. Основной вклад в этиопатогенез диабетических ангиопатий вносят гормонально-метаболические факторы и, прежде всего, обусловленные гипергликемией, неферментативное гликирование белков, активация сорбитолового пути обмена глюкозы, усиление "окислительного" стресса и снижение антиоксидантной защиты. Кроме метаболических нарушений, в развитии диабетических ангиопатий участвуют и генетические факторы, рост интереса к которым со стороны врачей-диабетологов напоминает неконтролируемую цепную реакцию. Отчасти это объясняется эйфорией и неоправданно большими надеждами, возникающими у клиницистов под влиянием многочисленных сообщений об успехах молекулярной генетики сахарного диабета (при отсутствии ясных представлений о реальных возможностях и ограничениях этого нового для диабетологии направления). Поэтому для лучшего понимания обсуждаемой проблемы напомним некоторые понятия молекулярной и популяционной генетики.

Полиморфизм гена – эволюционно закрепленная многовариантность одного и того же гена (варианты гена – аллели). Иногда может проявляться в качественных или количественных свойствах своего белкового продукта – в структуре фермента, его специфич-

ности, сродстве к субстрату, активности, концентрации и т.д.

Полиморфный генетический маркер – вариабельный участок ДНК, в различной степени сцепленный (ассоциированный) с каким-либо признаком. Может быть как анонимным, так и "адресным" (находиться вблизи или внутри конкретного гена).

Ген-кандидат – ген, продукт экспрессии которого (фермент, гормон, рецептор, структурный или транспортный белок) может прямо или косвенно участвовать в развитии изучаемой патологии. Поиск полиморфных маркеров различных генов-кандидатов и их использование в изучении генетической предрасположенности к болезни основано на знании механизмов ее развития и предположении, что данный полиморфный маркер может быть выражен фенотипически (биохимически).

Генотип – парный набор аллелей гена или его маркера, поскольку большинство генов картировано не на половых, а на соматических хромосомах, которые у человека имеются в двух копиях – по одной от каждого из родителей. Генотип дискретен и постоянен на протяжении всей жизни своего носителя, его определение объективно и однозначно, а распространенность в популяции может быть точно установлена.

Фенотип болезни – совокупность внешних (биохимических и симптоматических) проявлений клинически гетерогенной патологии. В популяции фенотип болезни по степени выраженности распределен непрерывно и может изменяться во времени как необратимо (прогрессировать в направлении "здоровье – болезнь"), так и циклически. В последнем случае изменения фенотипа могут повлиять на оценку распространенности патологии. Так, даже относительно неболь-

шие колебания артериального давления в летне-зимний период в зависимости от используемых диагностических критериев приводят к весьма существенным (до 30%) сезонным вариациям частоты встречаемости гипертонической болезни.

Ассоциация фенотипа с генотипом (генетическим маркером) – достоверно неодинаковое распределение частоты встречаемости маркера среди индивидуумов с различными фенотипами. Более высокая распространенность маркера среди лиц с определенной патологией по сравнению со здоровыми указывает на предрасположенность (повышенный риск), а более низкая – на устойчивость к заболеванию (пониженный риск). В ассоциативных исследованиях генетической предрасположенности на популяционном уровне обычно используют методический подход “случай – контроль”, где группа “случай” состоит из лиц с четко выраженным фенотипом болезни, тогда как группа “контроль” – из лиц с не менее выраженным отсутствием такого фенотипа.

Изучение генетической предрасположенности к патологии с использованием полиморфных маркеров различных генов-кандидатов заключается в проверке предположения о том, что наличие маркера связано с ранним развитием и/или быстрым прогрессированием заболевания. Другими словами, это поиск ответа на вопросы, существуют ли вообще для данной патологии в данной популяции предрасполагающие или защитные генетические факторы (маркеры) и можно ли с помощью этих генетических маркеров предсказать развитие болезни задолго до проявления ее симптомов, т.е. прогнозировать.

Диабетическая нефропатия (ДН) была выбрана нами в качестве модели сосудистых осложнений сахарного диабета по нескольким причинам. Во-первых, ДН имеет общие с другими ангиопатиями факторы риска и ассоциируется с ними клинически. Во-вторых, для этой микроангиопатии выработаны достаточно четкие диагностические критерии [7], хорошо стандартизованные и поддающиеся количественной оценке [5], что особенно важно для объективной характеристики клинического фенотипа ДН. В-третьих, именно при ДН факторы генетической предрасположенности исследуются наиболее интенсивно [2], хотя результаты изучения ассоциации этой микроангиопатии с различными полиморфными маркерами достаточно противоречивы [3, 4, 6, 9]. Последнее объясняется не только и не столько расово-этническими вариациями в распространенности маркеров и самой ДН, сколько различными подходами к формированию групп “случай” и “контроль”.

Сопоставление клинического фенотипа диабетической ангиопатии и конкретного генетического маркера (генотипа) и поиск соответствия между ними (т.е. ассоциации) осложняются следующими обстоятельствами. Генотип, как уже упоминалось, всегда дискретен и

неизменен на протяжении всей жизни носителя. В отличие от фенотипа патологии его определение более однозначно и объективно, а распространенность в популяции может быть установлена весьма точно. Фенотип же патологии по степени выраженности в популяции распределен непрерывно, относительно неустойчив и может изменяться во времени. Определение фенотипа субъективно, поскольку зависит от таких плохо контролируемых и трудно воспроизводимых факторов, как квалификация, личный опыт, научные пристрастия исследователя и используемые им диагностические критерии. Это может приводить к формированию гетерогенных и нерепрезентативных групп сравнения (групп “случай” и “контроль”) и невозможности идентифицировать маркеры генетической предрасположенности к ДН.

Выявление относительно небольшого вклада генетических факторов в формирование клинического фенотипа ДН существенно затруднено не только субъективными, но и объективными обстоятельствами, поскольку генетический компонент маскируется такими метаболическими факторами, как гипергликемия и длительность ее воздействия (т.е. длительность диабета). Поэтому теоретически, в отсутствие модулирующего влияния генетических факторов, развитие ДН в основном должно определяться качеством контроля гликемии и длительностью диабета (рис. 1).

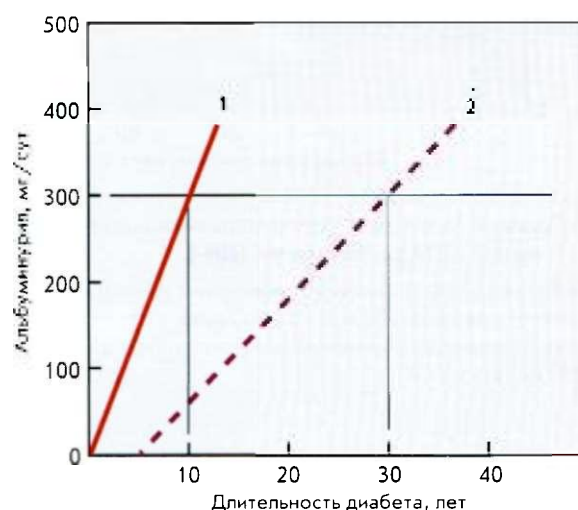


Рис. 1. Гипотетическая схема развития диабетической нефропатии с учетом только метаболических факторов риска.

- 1 - плохая компенсация углеводного обмена: прогрессивно нарастает альбуминурия;
- 2 - хорошая компенсация углеводного обмена - более позднее появление альбуминурии и медленное ее прогрессирование (развития клинической протеинурии может и не наступить).

В действительности же у больных с относительно хорошей компенсацией диабета иногда наблюдается раннее поражение почек, тогда как у больных с длительно текущим и плохо компенсированным диабетом — отсутствие нефропатии (стойкой альбуминурии более 300 мг/сут). Последнее может свидетельствовать о наличии дополнительных предрасполагающих или защитных генетических факторов. Проверка этого предположения требует уменьшения маскирующего влияния метаболических факторов риска ДН, что достигалось нами с помощью специально разработанных критериев отбора больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) при формировании групп сравнения (рис. 2).

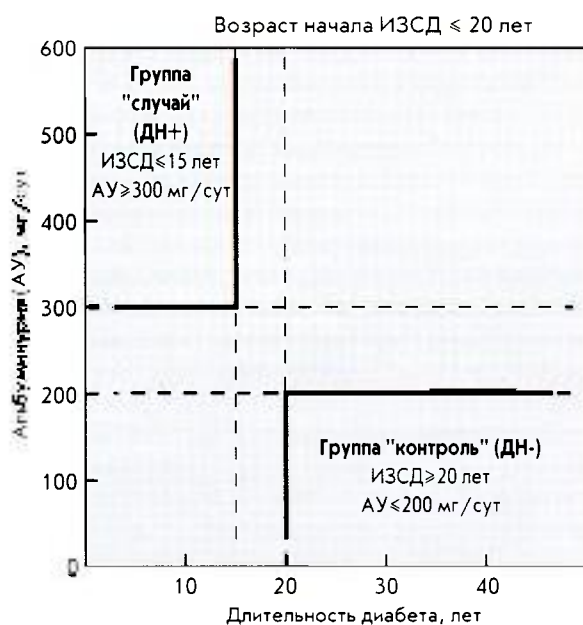


Рис. 2. Принцип "полярных" (неперекрывающихся) фенотипов "случай" (ДН+) и "контроль" (ДН-).

АУ: альбуминурия; нормоальбуминурия: АУ = 0 - 30 г/сут;
микроальбуминурия: АУ = 0 - 30 мг/сут;
макроальбуминурия (клиническая протеинурия):
АУ > 300 мг/сут.

Такой подход и был использован при изучении двух полиморфных маркеров — полиморфизма типа I/D (insertion/deletion) гена ангиотензин 1-превращающего фермента (АСЕ) и динуклеотидного повтора вблизи гена каталазы (САТ) [9] у больных ИЗСД с наличием или отсутствием ДН. Наблюдали 45 больных, которые были разделены на 2 подгруппы (см. рис. 2): с наличием (n=14) и отсутствием ДН (n=31). Для оценки текущего контроля гликемии как метаболического фактора риска ДН у всех больных с помощью ионообменной хроматографии определяли уровень неферментативно гликированного гемоглобина (фракцию

A1). Концентрацию альбумина в моче исследовали нефелометрическим методом. Амплификацию полиморфных участков генов АСЕ и САТ определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и аллельный анализ проводили, как описано ранее [1,9]. Сравнение частоты встречаемости аллелей и генотипов гена АСЕ и САТ в различных группах обследованных проводили с использованием точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p > 0,05$.

Достоверные различия частоты встречаемости генотипов II и DD гена АСЕ в группах "случай" (ДН+) и "контроль" (ДН-) свидетельствуют об ассоциации этого полиморфного маркера с диабетической нефропатией у больных ИЗСД (табл. 1). Важно отметить, что больные с относительно небольшой длительностью диабета и клинической протеинурией (ДН+) по уровню компенсации углеводного обмена существенно не отличались от больных с более длительным диабетом, но без протеинурии (ДН-). У последних наблюдалось существенное преобладание генотипов, содержащих аллель I (генотипы I/D), что свидетельствует скорее о защитной роли аллеля I (особенно в гомозиготном состоянии, генотип II), чем о предрасполагающей аллеля D (см. табл. 1).

Таблица 1

Распределение частоты встречаемости аллелей и генотипов гена АСЕ у больных ИЗСД с наличием (ДН+) и отсутствием (ДН-) диабетической нефропатии

Аллель, генотип	ДН+, % (n=14)	ДН-, % (n=31)	p
НbA1, %	12,0±2,2	11,4±2,6	>0,05
Аллель I	25	53,2	0,011
Аллель D	75	46,8	0,011
Генотип II	0	25,8	0,037
Генотип ID	50	54,8	>0,05
Генотип DD	50	19,4	0,043

При анализе распределения частот встречаемости аллелей гена САТ у больных с длительным ИЗСД без нефропатии была выявлена тенденция к накоплению аллеля 167 нуклеотидных пар (табл. 2), одного из защитных в отношении сахарного диабета обоих типов аллелей [7]. Достоверность различий в распределении 7 аллелей гена САТ (число возможных аллельных пар, т.е. генотипов, равно 28) может быть достигнута с увеличением объема исследуемых выборок.

Проведенные исследования позволяют сделать следующее заключение. Степень компенсации углеводного обмена и длительность сахарного диабета являются важнейшими, но не единственными факторами риска диабетических ангиопатий.

Таблица 2

Распределение частот встречаемости аллелей гена САТ у больных ИЗСД с наличием (ДН+) и отсутствием (ДН-) диабетической нефропатии

Аллель	ДН+, % (n=14)	ДН-, % (n=28)
161 н.п.	10,7	3,6
163 н.п.	14,3	3,6
165 н.п.	25	28,8
167 н.п.	14,3	26,7
169 н.п.	25	21,4
171 н.п.	10,7	12,5
173 н.п.	0	3,6

В этиологии диабетической нефропатии существуют генетические факторы риска, один из которых в московской популяции больных ИЗСД четко идентифицирован как полиморфизм гена ангиотензин-1-превращающего фермента. Другим модулятором генетической предрасположенности или устойчивости к ДН при ИЗСД может быть ген каталазы и его полиморфный маркер.

Предлагаемая нами общая стратегия поиска маркеров генетической предрасположенности к диабетическим ангиопатиям основана на использовании крайних ("полярных") вариантов клинического фенотипа патологии. Это позволяет снижать маскирующее влияние основных негенетических факторов, выявлять и идентифицировать генетические факторы, что продемонстрировано на модели диабетической нефропатии и уже используется при других поздних осложнениях диабета.

Наш опыт изучения ассоциации полиморфных маркеров различных генов-кандидатов с диабетическими ангиопатиями на примере ДН показал важность четкого определения фенотипов патологии и ее отсутствия.

Литература

1. Демуров Л.М., Чистяков Д.А., Чугунова Л.А. и др. // Молекул. биол. - 1997. - Т. 31. - № 1. - С. 59 - 62.
2. Кондратьев Я.Ю., Носиков В.В., Дедов И.И. // Пробл. эндокринол. - 1998. - Т. 44. - № 1. - С. 43 - 51.
3. Чистяков Д.А., Туракулов Р.И., Горашко Н.М. и др. // Молекул. биол. - 1997. - Т. 31. - № 5. - С. 778 - 783.
4. Fuisawa T., Ikegami H., Kawaguchi Y. et al. // Diabetologia. - 1998. - Vol. 41. - P. 47 - 53.
5. Jones S., Viberti G. // In: Research Methodologies in Human Diabetes. Part I. (Eds.: C. Mogensen, E. Standl). Walter de Gruyter, Berlin, — New York. - 1994. - P. 359 - 385.
6. Kondratiev Y., Demurov L., Chistyakov D. et al. // Endocrinol. 9 - 13 May. - 1998. - Sevilla, Spain. Abstract N. P. 1 — 77
7. Mogensen C. // Kidney International. - 1987. - Vol. 31. - P. 673 - 689.
8. Nosikov V., Gavrilov D., Chumakov I. // In book of Abstracts of the 27th Annual Meeting of European Society of Human Genetics. - 1995. - Berlin, Germany. - P. 245.
9. Tarnjv L., Cambien F., Rossing P. et al. // Diabetes. - 1995. - Vol. 44. - P. 489 - 494.