

*На правах рукописи*

**ЮРЧЕНКО ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА**

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
РАЗВИТИЯ МИКРОСОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ  
У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА**

14.00.09 - педиатрия

03.00.15 - генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук



**ТОМСК-2004**

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете  
и в НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Кравец Елена Борисовна

кандидат биологических наук, Фрейдин Максим Борисович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Филиппов Геннадий Пантелеевич

кандидат медицинских наук, с.н.с., Салюкова Ольга Александровна

Ведущая организация:

Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Новосибирск.

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2004 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного  
совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу:  
634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского  
государственного медицинского университета ( 634050, г. Томск, пр. Ленина, 107 ).

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » декабря 2003г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор



Тюкалова Л.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Сахарный диабет (СД) остается одной из важных медико-социальных проблем здравоохранения практически всех стран мира в связи с прогрессивным ростом заболеваемости и инвалидизации среди больных, что определяет актуальность изучения данной патологии и поиск новейших технологий для выделения групп риска и реабилитации больных диабетом [Tuomilehto J.A. et al., 1996; Newfield R.I et al, 1997; Дедов И.И., 1998; Балаболкин М.И., 2000]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в терапии сахарного диабета 1 типа (СД 1), продолжительность жизни таких больных ниже среднепопуляционной и значительно выше смертность среди лиц молодого возраста. Статистику заболеваемости и смертности при диабете определяют сосудистые осложнения. Среди поздних осложнений СД первое место по частоте занимают сосудистые ангиопатии, являющиеся наиболее частой причиной инвалидности и летальности при диабете [Krolewski A.N., 1996; Matsushima M. G.et al. 1997; Касаткина Э.П., 1997; Воронцова А.В., 1997; Дедов И.И., 1998; Tuomilehto J.A., 1999; Балаболкин М.И., 2000].

Основной целью современного обследования, лечения и диспансерного наблюдения детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа, является предупреждение развития поздних сосудистых осложнений, приводящих к ранней инвалидизации и к летальным исходам в молодом возрасте. Микрососудистые осложнения при СД 1 – являются клинически гетерогенной и этиологически многофакторной патологией. Убедительно доказано, что основным патогенетическим звеном в развитии осложнений сахарного диабета является хроническая гипергликемия и патологические метаболические изменения, которые сопутствуют гипергликемии: энергетический голод, гиперлипидемия, усиление процессов перекисного окисления липидов, снижение синтеза гликозаминоглианов, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и др. [Bouten A.Y et al., 1996; Касаткина Э.П., 1996; Festa A.N. et al., 1998; Дедов И.И., 2000; Шестакова М.В., 2001].

Учитывая факт, что не всегда качественный метаболический контроль позволяет предотвратить развитие диабетических осложнений, остается актуальным поиск потенциальных факторов риска развития микроангиопатий у больных сахарным диабетом 1 типа. Исследования ангиопатий на популяционном и семейном уровне указали на наличие генетического компонента в развитии этих осложнений [Doria A.A., 1997; Ruiz J.J., 1997; Демуров Л.М., 1997; Fujisawa T.W. et al. 1998; Чистяков Д.А., 1999; Миросердова О.В., 2001; Шахмалова М.Ш. и соавт., 2001].

Современные достижения в области молекулярной генетики открыли новые перспективы в изучении патогенеза болезней: появилась возможность идентифицировать гены, продукты экспрессии которых принимают участие в развитии патологических состояний. Наиболее перспективным подходом к изучению генетических факторов риска при МФЗ является концепция молекулярной генетики об ассоциации полиморфных генетических маркеров с предрасположенностью или устойчивостью к развитию патологии. Методами молекулярной медицины было установлено, что у человека гены многих ферментов, рецепторов и других белков характеризуются наличием одного или нескольких структурных полиморфизмов, которые не приводят к значимым изменениям первичной структуры белка и, соответственно, очевидным патологическим последствиям, но оказывают влияние на функциональную активность кодируемых белков. Эти специфичные для конкретной патологии маркеры могут быть выявлены задолго до ее клинической манифестации, что позволит определить группы риска, организовать их мониторинг, а в случае необходимости, назначить превентивную терапию [Tarnov T.F. et al., 1996; Akerblom H.S., 1997; Преображенский Д.В., 1998; Сергеева Т.В. и соавт., 2000; Шляхто Е.В., 2002].

В число генов-кандидатов, продукты которых могут участвовать в развитии диабетических ангиопатий, входят гены, кодирующие компоненты ренин – ангиотензиновой системы (РАС). РАС играет первостепенную роль в обеспечении нормальной физиологии сосудов, оптимальной гемодинамики и, как следствие, питания тканей и органов. Важная роль РАС в патогенезе диабетических ангиопатий подтверждается клиническим опытом успешного использования

ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в лечении диабетических ангиопатий. Функционирование системы РАС определяется четырьмя основными белками: ренином, ангиотензиногеном, АПФ и сосудистым рецептором к ангиотензину II. Функциональная значимость РАС в процессах ремоделирования с позиций молекулярной генетики может определяться уровнем продукции ангиотензина II, которая зависит от генов ангиотензиногена и АПФ [Chowdhury T.A., 1997; Freire M.Y. et al., 1998; Kunz R.R., 1998; Brands M.R., 2001; Юшков П.В., 2001].

Изучение генетической предрасположенности к диабетической нефропатии и диабетической ретинопатии затруднено многими обстоятельствами, что находит отражение в противоречивых данных об ассоциации полиморфизмов генов ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) и ангиотензиногена (AGT) с данными ангиопатиями при СД 1. Вклад генетического компонента в развитие диабетических микроангиопатий перекрывается влиянием экзогенных факторов риска и является малоизученной проблемой.

### **Цель работы**

Оценить роль генов-кандидатов ренин-ангиотензиновой системы в развитии микроангиопатий у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа. Обосновать оптимальные подходы к профилактике формирования микроангиопатий у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа.

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать клинические особенности диабетических микроангиопатий у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа с учетом данных генеалогического анамнеза, возраста, пола, возраста дебюта и давности заболевания, уровня компенсации углеводного, жирового обмена и активности АПФ.
2. Уточнить роль нарушений липидного обмена в развитии микроангиопатий с учетом особенностей питания.
3. Провести анализ ассоциаций I/D полиморфизма гена ангиотензинконвертирующего фермента и T174M полиморфизма гена ангиотензиногена с сахарным диабетом 1 типа, количественными показателями липидного обмена и уровнем активности ангиотензинпревращающего фермента у пробандов с сахарным диабетом 1 типа.
4. Провести анализ ассоциаций I/D полиморфизма гена ангиотензинконвертирующего фермента и T174M полиморфизма гена ангиотензиногена с сахарным диабетом 1 типа и его клиническими проявлениями на семейном уровне.
5. На основании изучения особенностей патогенеза диабетических микроангиопатий установить риск развития осложнений сахарного диабета 1 типа у детей и дать патогенетическое обоснование методам профилактики и коррекции выявленных нарушений.

### **Научная новизна работы**

Впервые на семейном материале с помощью теста на неравновесие по сцеплению установлена ассоциация I/D полиморфизма гена АСЕ и T174M полиморфизма гена AGT с сахарным диабетом 1 типа. Впервые на семейном материале с помощью теста на неравновесие по сцеплению проведен поиск ассоциаций вышеуказанных полиморфизмов с диабетическими микроангиопатиями. Подтверждена ассоциация аллеля D исследуемого полиморфизма гена АСЕ с диабетической нефропатией, найдена ассоциация данного аллеля с диабетической ретинопатией. Обнаружена ассоциация аллеля T174 гена AGT с диабетической нефропатией. На основании полученных данных предложен алгоритм прогнозирования развития диабетических микроангиопатий у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа.

### **Практическая значимость работы**

Оценка генетического вклада в развитие диабетических микроангиопатий способствовала систематизировать по значимости факторы развития диабетической нефропатии и ретинопатии у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа Сибирского климатогеографического региона, что позволило определить приоритетность терапевтической тактики для профилактики прогрессирования диабетических микроангиопатий.

### **Внедрение результатов исследования**

Стратегия выделения групп риска развития сахарного диабета 1 типа, его специфических осложнений на основании исследования липидного статуса, уровня активности АПФ, генетического обследования семей внедрена на базе эндокринологического отделения Детской больницы №1 г. Томска, Областного Эндокринологического диспансера и генетической клиники НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Материалы диссертации, ее выводы и рекомендации используются в лекционных и семинарских занятиях для студентов педиатрического факультета, интернов – педиатров на кафедрах Сиб ГМУ.

### **Апробация материалов диссертации**

Основные результаты представлены на заседаниях кафедр поликлинической педиатрии, эндокринологии, региональных и российских конференциях: I Российский диабетологический конгресс (Москва, 1998); VI Российский национальный конгресс «Человек и лекарства» (Москва 1999); Первый конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2000); Второй конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2001); Первая российская школа-семинар детского эндокринолога (Томск, 2003).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 в центральной печати.

### **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 125 страницах, иллюстрирована 72 таблицами и 16 рисунками. Библиография включает 194 литературных источников, из которых 63 отечественных и 131 иностранных.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Аллельные варианты гена ангиотензинконвертирующего фермента (I/D полиморфизм) и гена ангиотензиногена (T174M полиморфизм) являются составной частью в структуре наследственной подверженности к сахарному диабету 1 типа.
2. Развитие хронических осложнений (микроангиопатии) при сахарном диабете 1 типа определяется сочетанием генетических факторов (полиморфизмом генов ангиотензинконвертирующего фермента и ангиотензиногена), средовой компоненты (давность диабета, возраст дебюта заболевания), нарушением липидного обмена (атерогенные сдвиги липопротеинов) и повышенным уровнем активности АПФ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе было обследовано 138 детей (73 мальчика, 65 девочек), больных СД 1 и проживающих в Томске и Томской области. Средний возраст обследуемых составил  $13,2 \pm 0,3$  лет, пациенты различались по давности заболевания, характеру специфических осложнений, потребности в инсулине, наследственности. Также обследовано 129 семей, в которых один или два ребенка больны сахарным диабетом 1 типа, из них 70 полных семей. Группу контроля для пробандов составили 57 sibсов, не болеющих сахарным диабетом 1 типа. Использование в качестве контрольной группы здоровых sibсов позволило лучше оценить влияние средовых факторов (одинаковые условия проживания, питания) и вклад генетических факторов на развитие изучаемой патологии. Исследование включало следующие блоки: клинический, биохимический, генетический. Этапы исследования состояли из комплексного обследования больного с сахарным диабетом 1 типа (пробанда), родителей и здоровых братьев и сестер (sibсов), изучения родословных. На последнем этапе оценивался вклад семейных случаев заболеваний в клинические проявления диабета, проводилась поиск ассоциации потенциальных маркеров генов-кандидатов с заболеванием, его осложнениями и количественными признаками. Подробная характеристика обследованных детей и подростков представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа

Сахарный диабет 1 типа, n=138, возраст от 6 до 18 лет			
Мальчики, n=74, средний возраст - 13,0±0,4 лет		Девочки, n=65, средний возраст - 13,5±0,4 лет	
Длительность заболевания			
До 3 лет, n=49(38%)	От 3 до 5 лет, n=26(20%)		Более 5 лет, n=54(42%)
Потребность в инсулине (ЕД/кг массы тела)			
До 0,5, n=35(28%)	От 0,5 до 0,7, n=66(53%)		Более 0,8, n=24(19%)
Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c, %)			
До 9%, n=10 (17%)	От 9% до 11%, n=12 (21%)		Более 11%, n=36 (62%)
Наличие диабетических микроангиопатий			
С осложнениями, n=64(46%)			Без осложнений, n=74(54%)
Ретинопатия, n=19(14%)	Нефропатия, n=16(11%)	Ретино- и нефропатия, n=29(21%)	
Возраст дебюта (в среднем 9,1±0,3лет)			
До 6 лет, n=42 (43%)	С 7 до 11 лет, n=37(28%)		После 12 лет, n=51(39%)

В соответствии с целью и задачами исследования группа больных с СД 1 была разделена на две подгруппы: с наличием диабетических микроангиопатий и без них.

Группы больных с осложнениями и без осложнений не отличались по полу и возрасту. Наследственная отягощенность по СД 1, СД 2 и АГ встречалась с одинаковой частотой у пациентов обеих групп. В сравниваемых группах наблюдаются статистически значимые различия по уровню гликированного гемоглобина ( $p=0,04$ ), значительные различия по давности СД 1 и

возрасту дебюта заболевания. Процентное соотношение больных в зависимости от давности заболевания и возраста дебюта представлены на рисунках 1, 2.

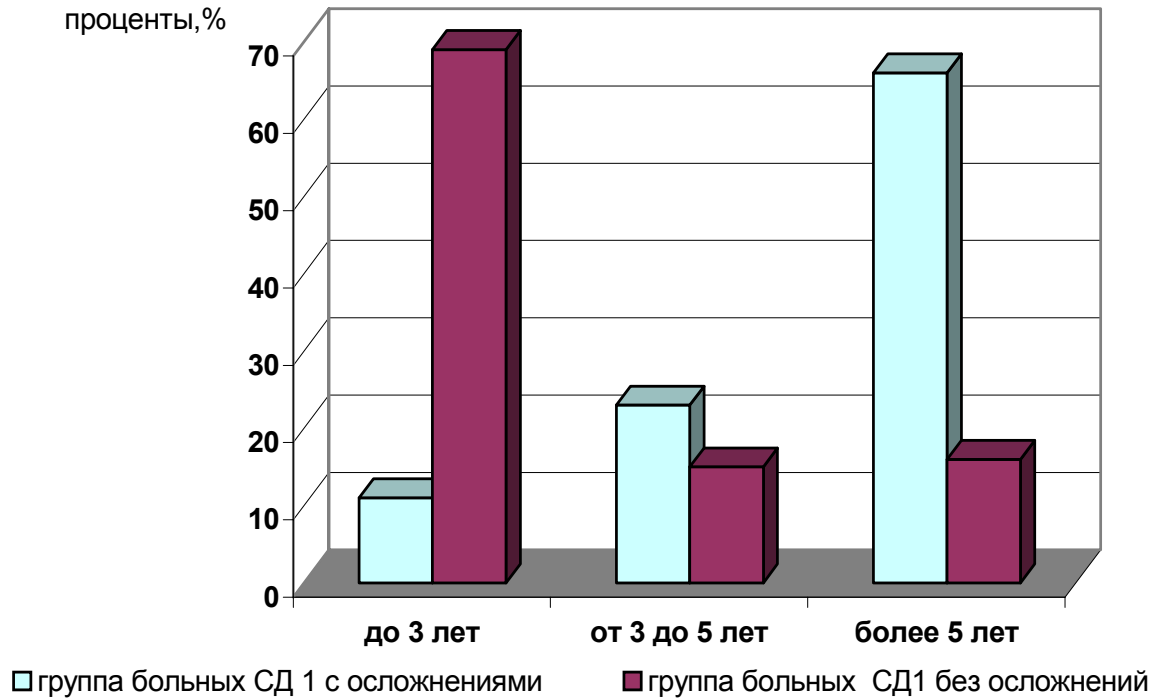


Рис. 1. Доля детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа с осложнениями и без, в зависимости от давности заболевания.

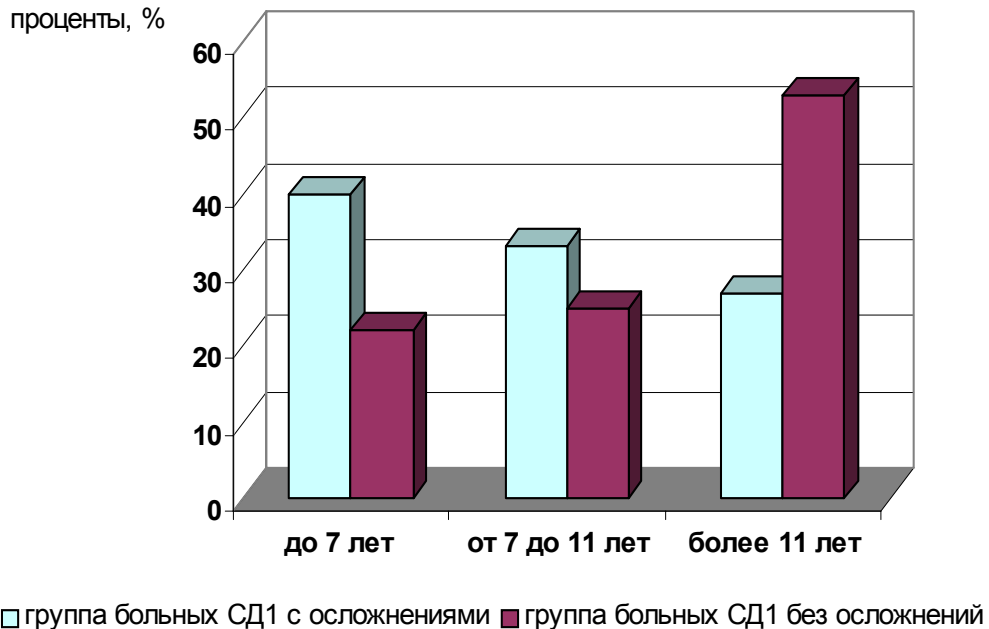


Рис. 2. Доля детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа с осложнениями и без, в зависимости от возраста дебюта заболевания.

В группе пациентов без диабетических микроангиопатий 69% больных имели давность заболевания до 3 лет, в то время как в группе с наличием диабетических микроангиопатий основная часть пациентов имела продолжительность заболевания более 5 лет - 66%. Возраст дебюта СД 1 у 53%

пациентов без микрососудистых осложнений - после 11 лет, в сравниваемой группе - у 27 %, в тоже время 40% пациентов с хроническими осложнениями имели возраст дебюта до 7 лет.

Группа больных с диабетическими осложнениями в свою очередь подразделялась на пациентов с наличием диабетической нефропатии, ретинопатии и с сочетанием нефро- и ретинопатии. Подробная характеристика группы детей и подростков с СД 1 с наличием диабетических микроангиопатий представлена в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от наличия диабетической нефропатии, ретинопатии и сочетания нефро- и ретинопатии

Показатели		Нефропатия n=16 (11,53±0,79)	Нефро- и ретинопатия n=29 (12,17±0,66)	Ретинопатия n=19 (11,80±1,01)
Пол	Мальчики	7	14	11
	Девочки	9	15	8
Гликированный гемоглобин		14,49±0,77	15,65±0,56	13,20±0,63
Давность заболевания	До 3 лет	4	2	1
	От 3 до 5 лет	3	7	5
	Более 5 лет	9	20	13
Возраст дебюта	До 7 лет	3	15	8
	От 7 до 11 лет	6	7	8
	Более 11 лет	7	7	3
Наличие гипергликемических ком в анамнезе		7	7	5
Наследственная отягощенность по СД 1		2	6	3
Наследственная отягощенность по СД 2		4	8	5
Наследственная отягощенность по артериальной гипертензии		11	18	10

Необходимо уточнить, что в группу пациентов с наличием только ДН в основном вошли пациенты с ДН в стадии микроальбуминурии. Общепринято, что в первые 5 лет от начала СД 1 типа диабетическая нефропатия (даже самая ранняя ее стадия - стадия микроальбуминурии) не развивается. Однако в последние годы этот тезис получил опровержение. По данным исследования EURODIAB, в котором изучалась частота развития ДН в 26 различных центрах Европы, микроальбуминурия была выявлена у 18% больных СД 1 типа с длительностью заболевания менее 5 лет [Stephenson J.J. et al., 1995; Donaghue K.D. et al., 1998]. Более выраженная стадия ДН - стадия протеинурии - действительно редко развивается в сроки до 5 лет от начала СД 1 типа.

При сравнении пациентов с СД 1 с наличием различных диабетических осложнений установлено, что пациенты из этих групп не имеют принципиальных различий по уровню гликированного гемоглобина, наличию гипергликемических ком в анамнезе, и наследственной отягощенности по СД 1, СД 2 и АГ. Однако с увеличением давности диабета прямо пропорционально возрастает риск развития как диабетической ретинопатии так и сочетания диабетической нефро- и ретинопатии. Следует заметить, что у больных с сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии возраст дебюта СД 1 чаще приходится на дошкольный период, в то время как процентное количество больных с наличием только нефропатии возрастает



с увеличением возраста дебюта и имеет максимальное значение при дебюте заболевания в период пубертата (рис. 3,4).

проценты, %

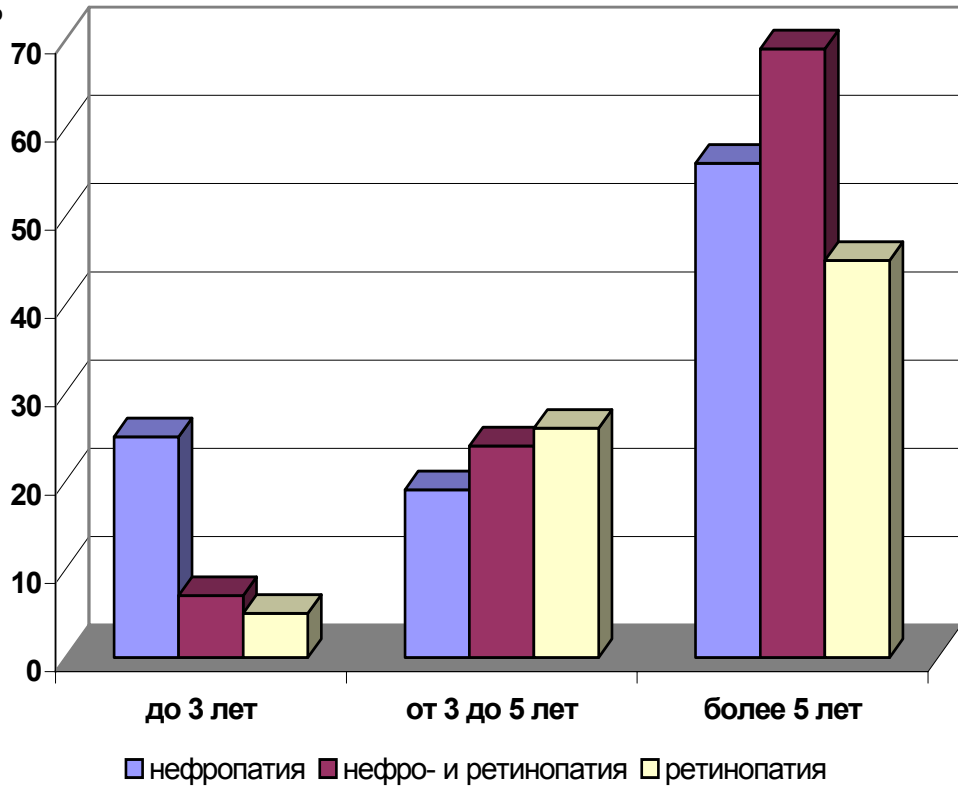


Рис.3. Доля детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа с наличием диабетических нефропатии, ретинопатии и их сочетанием, в зависимости от давности заболевания.

проценты, %

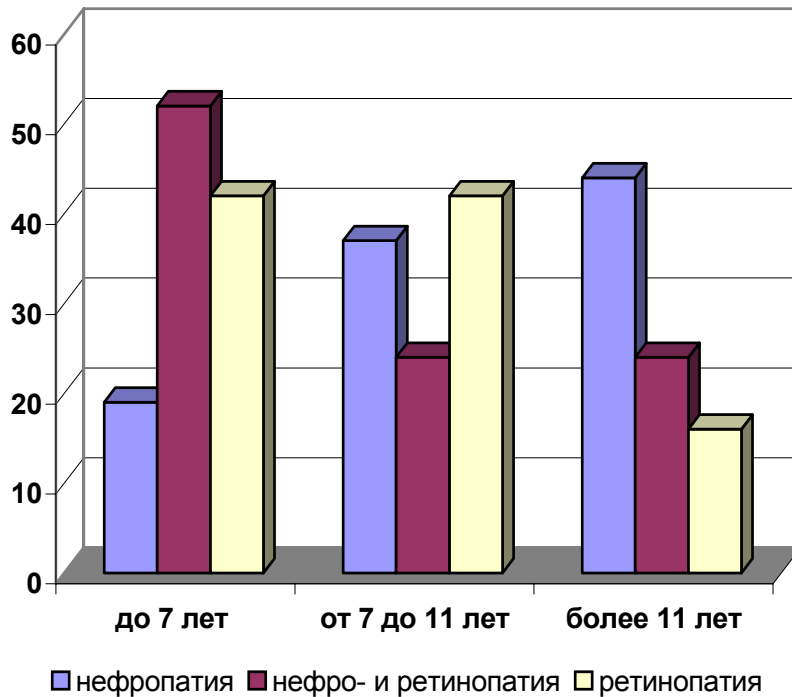


Рис.4. Доля детей и подростков, больных сахарным диабетом 1 типа с наличием диабетических нефропатии, ретинопатии и их сочетанием, в зависимости от возраста дебюта заболевания.

Результаты исследования показали зависимость развития и прогрессирования диабетических микроангиопатий от длительности заболевания, возраста дебюта СД 1 и уровня гликированного гемоглобина.

В патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета общепризнанна роль гипергликемии, однако нарушение жирового обмена также вносит вклад в развитие нефропатии, ретинопатии и других сосудистых осложнений диабета. Нарушения липидного обмена встречаются у больных сахарным диабетом значительно чаще (30-40%), чем в общей популяции (5%)[Austin M.N., 1996; Майкл Т.М., 1998; Дягилева А.К.,1998]. Выявлены атерогенные нарушения липидного обмена в виде повышения уровня ХС, ТГ, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП в группе пациентов с сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии (табл. 3). Впервые проведена оценка диагностической ценности и чувствительности обнаруженных изменений показателей липидного обмена при диабетической нефро- и ретинопатии и установлено, что уровни ХС, ТГ, и ХС-ЛПОНП обладают наибольшей диагностической ценностью (более 80%) при специфичности более 50%. У пациентов с наличием только диабетической нефропатии или ретинопатии статистически значимых различий показателей липидного обмена при сравнении с пациентами с СД 1 без осложнений не обнаружено. Как известно, тяжесть гиперлипидемии прямо пропорциональна прогрессированию ДН, а так как в группе пациентов с ДН основную часть составили пациенты с нефропатией в стадии микроальбуминурии можно предполагать, что нарушения липидного обмена в данной группе носит минимальный характер.

Таблица 3

Содержание липидов в сыворотке крови детей, больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от наличия диабетической нефро- и ретинопатии ( $X \pm m$ )

Показатели	Нефро- и ретинопатия n=21	Без осложнений n=18	p
ХС, ммоль/л	5,69±0,23	4,68±0,19	<b>p=0,003</b>
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,35±0,08	1,37±0,08	p=0,921
ХС-ЛПНП, ммоль/л	3,35±0,16	2,70±0,17	<b>p=0,016</b>
ХС-ЛПОНП, ммоль/л	0,81±0,08	0,57±0,08	<b>p=0,007</b>
ТГ, ммоль/л	1,76±0,18	1,32±0,18	<b>p=0,011</b>
ИА	4,21±0,53	3,27±0,25	p=0,273

Примечание: p – достигнутый уровень значимости различий при сравнении групп больных с нефро- и ретинопатией и без осложнений

Одной из причин, приводящей к развитию гиперлипидемии у больных сахарным диабетом, могут быть диета богатая насыщенными жирами и холестерином. Характер питания обследуемых пациентов изучался с помощью опросника, составленного на основе стандартной диетической анкеты программы CINDI. Продукты, согласно гиполлипидемической диете по рекомендациям Европейского Общества по Атеросклерозу, были объединены по группам: продукты с преимущественным содержанием жира, насыщенных жиров, белка, ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот, холестерина и содержащие сложные углеводы[Аметов А.С., 2001; Потемкина Р. А., 2002].

Для оценки питания у детей с СД 1 были сформированы следующие группы: дети с удовлетворительной компенсацией жирового обмена (уровень общего холестерина менее 5,2 ммоль/л включительно), дети с неудовлетворительной компенсацией жирового обмена (уровень общего холестерина выше 5,2 ммоль/л). Проведенное сравнение особенностей питания в группе пациентов с СД 1 с удовлетворительной компенсацией жирового обмена и в группе пациентов с

СД 1 с неудовлетворительной компенсацией жирового обмена, не обнаружило существенных различий в употреблении продуктов, способных повлиять на жировой обмен. Полученные результаты можно объяснить тем, что исследуемая группа пациентов с СД 1 находилась на сбалансированной по всем параметрам физиологической диете, которая, как известно, рекомендует ограничение продуктов, содержащих холестерин и насыщенные жирные кислоты. Таким образом, проведенное исследование позволило исключить влияние такого экзогенного фактора как питание на уровень показателей липидного обмена в исследуемой группе пациентов с СД 1.

Помимо перечисленных факторов (гипергликемия, дислипидемия) глубокое повреждение сосудистого эндотелия при сахарном диабете могут вызвать вазоактивные факторы, способствуя инициации и прогрессированию диабетических микроангиопатий [Nathan D.J., 1996; Nosadini R.R., 1997; Marre M.N., 1999; Wirta O.E. et al., 2000; Rossing K.T. et al., 2003]. К вазоактивным факторам относят биологически активные вещества, вырабатываемые различными тканями и клетками организма, и участвующие в регуляции тонуса сосудов. Вызывая спазм (констрикцию) или расслабление (дилатацию) сосудов, вазоактивные факторы в физиологических условиях поддерживают нормальную перфузию органа, а при развитии патологии, могут вызвать нарушение внутриорганной или системной гемодинамики, способствуя прогрессированию поражения данного органа. АПФ потенциально является вазоактивным фактором, способствующим сужению сосудов, пролиферации сосудистых клеток и перестройке артериального русла. Показатели активности ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в сыворотке крови были определены у 66 детей (38 мальчиков и 28 девочек) с сахарным диабетом 1 типа. Статистически значимых зависимостей уровня АПФ от пола, возраста, давности диабета, возраста дебюта заболевания, ИМТ, наследственной отягощенности по СД 1, СД 2, АГ, наличию гипергликемических ком в анамнезе не получено. Выявлены статистически значимые различия активности АПФ при сравнении групп больных с СД 1 с наличием диабетической нефро- и ретинопатии и без осложнений. В группе больных с сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии уровень активности АПФ был достоверно выше, чем в группе больных не имеющих данных осложнений (табл. 4). Активность АПФ у пациентов с наличием только диабетической нефропатии или ретинопатии не отличался от таковой по сравнению с пациентами без осложнений.

Таблица 4

Показатели активности АПФ в сыворотке крови детей, больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от наличия диабетической нефро- и ретинопатии ( $X \pm m$ )

Показатели	Нефро- и ретинопатия n=15	Без осложнений n=36	p
АПФ (мкмоль · мин <sup>-1</sup> · л <sup>-1</sup> )	50,73±4,45	37,41±3,56	<b>0,02</b>

Примечание: p – достигнутый уровень значимости различий при сравнении групп больных с нефро- и ретинопатией и без осложнений

Также была проведена оценка диагностической ценности и чувствительности обнаруженных изменений уровня активности АПФ при диабетической нефро- и ретинопатии и установлено, что показатели уровня активности АПФ обладают чувствительностью более 70% при специфичности более 50%. Таким образом, можно предположить, что сочетание гиперлипидемии и повышение уровня активности АПФ может служить фактором повышенного риска развития и прогрессирования диабетических микроангиопатий.

На следующем этапе исследования был проведен поиск генетической основы клинических проявлений диабета и ассоциаций изучаемых полиморфизмов генов ACE и AGT с сахарным диабетом 1 типа и с патогенетически значимыми для заболевания и его осложнений количественными признаками.

Был проведен поиск ассоциаций исследуемых полиморфизмов генов ACE и AGT с количественными признаками: с показателями липидного обмена и показателями активности ангиотензинпревращающего фермента.

По результатам дисперсионного анализа ассоциация I/D полиморфизма гена ACE с показателями липидного обмена у пациентов с СД 1 не установлена, найдена ассоциация T174M полиморфизма гена AGT с уровнем ХС и ХС-ЛПНП. В результате поиска обнаружено, что гомозиготы TT имеют статистически значимо более низкий уровень холестерина и холестерина низкой плотности по сравнению с группой сравнения, состоящей из гетерозигот TM и одного индивида гомозиготного по аллелю M (табл. 5).

Таблица 5

Показатели липидного обмена детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа в зависимости от генотипов T174M полиморфизма гена AGT ( $X \pm m$ )

Группа	Генотипы		Н р
	TM+MM	TT	
Показатель			
ХС, ммоль/л	5,88±0,58	4,93±0,16	4,05 <b>0,04</b>
ХС-ЛПВП, ммоль/л	12,32±10,96	3,23±1,86	0,16 0,69
ХС-ЛПНП, ммоль/л	14,75±10,66	4,72±1,84	6,37 <b>0,01</b>
ХС-ЛПОНП, ммоль/л	11,81±11,02	2,54±1,87	1,46 0,23
ТГ, ммоль/л	1,86±0,30	1,47±0,09	1,51 0,22
ИА	15,49±10,66	5,21±1,84	3,29 0,07

Примечание: Н – критерий Крускала – Уоллиса, р – достигнутый уровень значимости различий при сравнении показателей липидного обмена у больных СД 1

В исследуемой выборке пациентов с СД 1 установлены статистически значимые различия при сравнении уровней показателей активности АПФ у носителей разных генотипов гена ACE. Пациенты с СД 1 гомозиготные по аллелю D имели статистически значимо более высокий уровень активности АПФ по сравнению с гомозиготами по аллелю I. Зависимость уровня активности АПФ от T174M полиморфизма гена AGT не установлена.

Для решения вопроса о вкладе генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС) в развитие СД 1 и диабетических микроангиопатий у детей с СД 1 был проведен поиск ассоциаций методом случай – контроль, а также впервые на семейном материале у пациентов с СД 1 был проведен тест на неравновесие по сцеплению - Transmission/Disequilibrium Test (TDT).

Поиск ассоциаций методом случай – контроль обнаружил ассоциацию диабетической нефропатии и I/D полиморфизма гена ACE у больных СД 1 типа. Распределение генотипов и частот аллелей I/D полиморфизма гена ACE у больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от наличия у больных с диабетической нефропатии представлено в таблице 6.

Распределение генотипов и частот аллелей I/D полиморфизма гена ACE у больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от наличия нефропатии

Группы больных сахарным диабетом 1 типа	N	Генотипы			Аллели(%)		P
		II	ID	DD	I	D	
С диабетической нефропатией	26	0	13	3	25	75	<b>0,006</b>
Без осложнений	74	17	29	28	43	57	

У больных с диабетической нефропатией по сравнению с больными без данного осложнения показано преобладание аллеля D (75% против 57%). Генотип DD наблюдался у 95,2% детей с нефропатией и у 74,1% детей без нее. Не обнаружено диабетической нефропатии у больных с генотипом II, у гетерозигот ID она встречалась редко (13 пациентов с нефропатией против 29 больных без нефропатии). На основании полученных данных можно предполагать, что пациенты с СД 1, носители D аллеля, имеют генетическую предрасположенность к развитию диабетической нефропатии.

Одним из наиболее распространенных подходов к картированию генов является анализ сцепления – метод, основанный на прослеживании косегрегации генов при передаче от родителей к потомкам в ряду поколений. Относительно недавно был предложен еще один метод анализа сцепления – Тест на Неравновесие при Наследовании (Transmission/Disequilibrium Test, TDT, ТНН). Даже если исходные доказательства о наличии ассоциации отсутствуют, ТНН работает и может быть использован для проверки сцепления любого маркера (или набора маркеров) с геном болезни, для которых доступны данные о родителях и хотя бы одном больном ребенке. Этот тест имеет ряд существенных преимуществ: обладает высокой статистической мощностью, устойчив к эффектам популяционной структуры, практически безотносителен к типу наследования и т.д. [Ewens J.J., 1999].

Исследование частоты наследования аллелей I и D от гетерозиготных родителей выявило, что аллель D ассоциирует с сахарным диабетом 1 типа, при этом показатель TDT составил 4,18, p = 0,04 (табл. 7).

Таблица 7

Распределение частот I/D полиморфизма гена ACE аллелей, унаследованных пациентами с сахарным диабетом 1 типа от родителей

Случай	Наследование	Количество	TDT	p
a	II→I	41	4,18	<b>0,04</b>
b	ID→I	47		
c	ID→D	70		
d	DD→D	66		

Для того, чтобы доказать ассоциацию аллеля D с сахарным диабетом 1 типа, и исключить более высокую частоту наследования данного аллеля в исследуемой группе, был проведен тест на неравновесие по сцеплению на ассоциацию со здоровыми sibсами. При этом показатель TDT составил 1,82, p = 0,18. Таким образом, нами впервые установлена ассоциация I/D полиморфизма гена ACE с сахарным диабетом 1 типа у детей и подростков Томска и Томской области.

Поиск ассоциации T174M полиморфизма гена AGT с сахарным диабетом был проведен аналогичным образом. Была установлена ассоциация T аллеля гена AGT с СД 1, подтвержденная отрицательным TDT тестом на ассоциацию со здоровыми sibсами (табл. 8).

Распределение частот аллелей T174M полиморфизма гена AGT, унаследованных пациентами с сахарным диабетом 1 типа от родителей

Случай	Наследование	Количество	TDT	p
a	MM→M	0	8,52	<b>0,004</b>
b	TM→M	4		
c	TM→T	19		
d	TT→T	111		

На основании этих данных можно сделать вывод, что использование в ассоциативном исследовании генетической предрасположенности к СД 1 TDT теста позволило установить связь полиморфизма типа I/D гена ACE и полиморфизма типа T174M гена AGT с сахарным диабетом 1 типа у детей и подростков г. Томска и Томской области.

Впервые был проведен анализ ассоциаций I/D полиморфизма гена ACE и T174M полиморфизма гена AGT с диабетическими микроангиопатиями с помощью TDT теста. При этом впервые на семейном материале обнаружена ассоциация D аллеля гена ACE с диабетической ретинопатией (табл. 9).

Таблица 9

Тест на неравновесие по сцеплению на ассоциацию I/D полиморфизма гена ACE с диабетической ретинопатией

Случай	Наследование	Количество	TDT	p
a	II→I	5	3,77	<b>0,05</b>
b	ID→I	4		
c	ID→D	13		
d	DD→D	14		

Также обнаружена ассоциация аллеля T с диабетической нефропатией (табл. 10). Следует принять во внимание, что в связи с малочисленностью выборки при семейном анализе не была выделена отдельно группа пациентов с сочетанием нефро- и ретинопатии.

Таблица 10

Тест на неравновесие по сцеплению на ассоциацию T174M полиморфизма гена AGT с диабетической нефропатией

Случай	Наследование	Количество	TDT	p
a	MM→M	0	4,90	<b>0,03</b>
b	TM→M	1		
c	TM→T	9		
d	TT→T	24		

Таким образом, в исследуемой группе пациентов с СД 1 частота развития диабетических микроангиопатий зависит от давности заболевания, от возраста, в котором дебютировал сахарный диабет и от компенсации углеводного обмена. Нарушения липидного обмена у пациентов с сочетанием диабетической нефро- и ретинопатии носит атерогенный характер, кроме того в данной группе имеется повышение активности ангиотензин-превращающего фермента. При этом чувствительность указанных изменений со стороны липидного обмена более 80 % и специфичность более 50%. Оценка диагностической ценности обнаруженных изменений уровня активности АПФ при диабетической нефро и ретинопатии, показала чувствительность более 40%,

при специфичности более 75%. Впервые на семейном материале с помощью теста на неравновесие по сцеплению установлена ассоциация I/D полиморфизма гена ACE и T174M полиморфизма гена AGT с сахарным диабетом 1 типа. Впервые на семейном материале с помощью теста на неравновесие по сцеплению проведен поиск ассоциаций вышеуказанных полиморфизмов с диабетическими микроангиопатиями. Подтверждена ассоциация D аллеля исследуемого полиморфизма гена ACE с диабетической нефропатией, найдена ассоциация данного аллеля с диабетической ретинопатией. Обнаружена ассоциация аллеля T T174M полиморфизма гена AGT с диабетической нефропатией. На основании полученных данных предложен алгоритм прогнозирования развития диабетических микроангиопатий у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа (рис. 5).

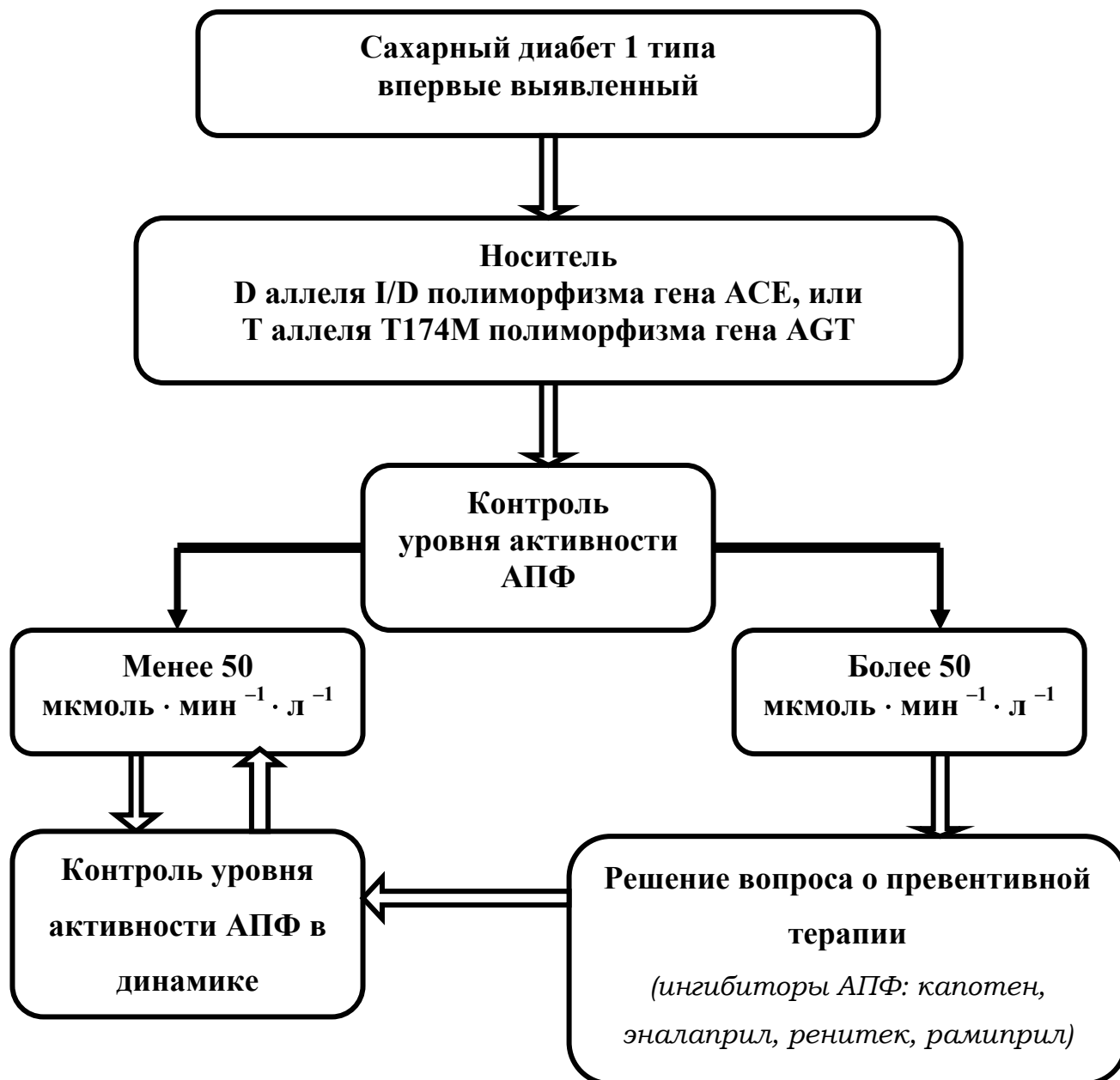


Рис.5. Алгоритм прогнозирования развития диабетических микроангиопатий у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа

## ВЫВОДЫ

1. Из многочисленных факторов риска развитие диабетических микроангиопатий при сахарном диабете 1 типа в детском и подростковом наиболее информативными являются: компенсация углеводного обмена, давность заболевания (более 5 лет) и возраст пациента к моменту заболевания (до 7 лет).
2. Нарушения липидного обмена в виде атерогенных проявлений (повышение общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеинов низкой и очень низкой плотности), а также повышение активности ангиотензинпревращающего фермента способствуют развитию и прогрессированию диабетических микроангиопатий.
3. Обнаружена зависимость между тяжестью сахарного диабета 1 типа, показателями липидного обмена (холестерина, и холестерина липопротеинов низкой плотности) и T174M полиморфизмом гена AGT. Гомозиготы TT имели статистически значимо более низкий уровень холестерина и холестерина низкой плотности по сравнению с группой сравнения, состоящей из гетерозигот TM и одного индивида гомозиготного по аллелю M.
4. Установлена ассоциация I/D полиморфизма гена ACE и T174M полиморфизма гена AGT с сахарным диабетом 1 типа.
5. Установленная ассоциация D аллеля исследуемого I/D полиморфизма гена ACE с диабетической нефропатией и ретинопатией, и обнаруженная ассоциация T аллеля T174M полиморфизма гена AGT с диабетической нефропатией позволила решить вопрос о превентивной терапии диабетических микроангиопатий.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве дополнительных критериев риска развития микроангиопатий могут использоваться показатели липидного обмена (повышение общего холестерина более  $4,68 \pm 0,19$  ммоль/л, триглицеридов более  $1,32 \pm 0,18$  ммоль/л, холестерина липопротеинов низкой плотности более  $2,70 \pm 0,17$  ммоль/л, холестерина липопротеинов очень низкой плотности более  $0,57 \pm 0,08$  ммоль/л) и показатели активности ангиотензинпревращающего фермента (уровень активности АПФ более  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ ).
2. С целью прогнозирования развития диабетических микроангиопатий рекомендуется проводить молекулярно-генетическое обследование семей пациентов сахарным диабетом 1 типа.
3. Наличие у пациента с сахарным диабетом 1 типа D аллеля I/D полиморфизма гена ACE и T аллеля T174M полиморфизма гена AGT может оцениваться как дополнительный фактор риска развития диабетических микроангиопатий.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ассоциация полиморфизма генов синтазы оксида азота и ангиотензинпревращающего фермента с сахарным диабетом 1 типа // КСНМ Науки о человеке. Второй конгресс молодых ученых и специалистов. - 2001. - С. 201-202. (в соавт. Косенкова Т.В.).
2. Характеристика липидного обмена в семьях больных инсулинзависимого сахарного диабета // КСНМ Науки о человеке. Второй конгресс молодых ученых и специалистов. - 2001. - С.236-237. (в соавт. Деменкова А.П., Спирина Л.А.).
3. Наследственность и особенности течения СД 1 типа у детей сибирского региона // КСНМ Науки о человеке. Второй конгресс молодых ученых и специалистов. - 2001.- С.193-194. (в соавт. Серых Ю.Ю.).
4. Ассоциация полиморфизма генов ангиотензиногена и ангиотензинконвертирующего фермента с СД 1 типа КСНМ Науки о человеке. Третий конгресс молодых ученых и специалистов. - 2002. - С.198-199. (в соавт. Косенкова Т.В., Тарасенко Н.В.).



5. Анализ VNTR полиморфизма гена NOS 3 у больных СД 1 типа // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Приложение 1. - 2001. – С.60-62 . ( в соавт. Кравец Е.Б., Кондратьевой Е.В., Фрейдин М.Б.).
6. Липидный обмен в семьях больных с сахарным диабетом // Сахарный диабет. – 2000.- №3. –С.29-32.(в соавт. Кравец Е.Б., Кондратьевой Е.В., Деменковой А.П.).
7. Ассоциация полиморфизма генов синтазы оксида азота и ангиотензинпревращающего фермента с сахарным диабетом 1 типа / Материалы IV Всероссийского конгресса эндокринологов. - Санкт-Петербург, 1-5 июня.- 2001. – С.99. (в соавт. Пузырев В.П., Кравец Е.Б., Кондратьевой Е.В.).
8. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента при сахарном диабете 1 типа у детей Сибири // Сахарный диабет. – 2001. - № 4. – С. 10-13. .(в соавт. Кондратьевой Е.В., Пузырев В.П., Кравец Е.Б.).
9. Состояние липидного обмена в семьях больных инсулинзависимым сахарным диабетом // Тезисы докладов Российской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АМН СССР В.Г. Баранова. «Актуальные вопросы эндокринологии». – Санкт-Петербург, 6-7 Апреля.- 2000. – С. 64-65. ( в соавт. Кравец Е.Б., Кондратьевой Е.В.).
10. Холестерин сыворотки крови и липопротеинов в семьях детей с инсулинзависимым сахарным диабетом // Вестник СГМУ, посвященный 25-летию медико-биологического факультета. –2000. - №1. – С.46-51. (в соавт. Кондратьевой Е.В., Сухановой Г.А., Деменковой А.П.).
11. Липидный обмен в семьях больных сахарным диабетом 1 типа // Генетика человека и патология. – Томск. Выпуск 5. – 2000. – С.327-322. (в соавт. Кондратьевой Е.В., Солюковым В.Б., Деменковой А.П.).

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия  
 АПФ – ангиотензинпревращающий фермент  
 ДЛП – дислипидемия  
 ДН – диабетическая нефропатия  
 ДР – диабетическая ретинопатия  
 ИА – индекс атерогенности  
 ИМТ – индекс массы тела  
 ЛП – липопротеины  
 РАС – ренин-ангиотензиновая система  
 СД – сахарный диабет  
 СД 1 – сахарный диабет 1 типа  
 ТГ – триглицериды  
 ХС – холестерол  
 ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности  
 ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности  
 ХС-ЛПОНП – холестерин липопротеинов очень низкой плотности  
 ACE – ген ангиотензинконвертирующего фермента  
 AGT – ген ангиотензиногена  
 I/D – инсерционно-делеционный полиморфизм  
 T174M – замена треонина на метионин в положении 174 (полиморфизм 174M)

