

Влияние инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента на развитие, прогрессирование и эффективность терапии диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом типа 1

Ж.В.Шуцкая, О.О.Егорова, Ю.Г.Надь, А.С.Стройкова, А.В.Папаян, Е.И.Шварц
Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

Резюме. Задачами нашего исследования явились изучение ассоциации инсерционно-делеционного (I/D) полиморфизма гена АПФ с развитием и прогрессированием диабетической нефропатии (ДН), а также установление взаимосвязи различных аллельных вариантов данного генетического полиморфизма и эффективности снижения микроальбуминурии (МАУ) при терапии каптоприлом больных с начинающейся ДН. При изучении I/D-полиморфизма гена АПФ не выявлено статистических различий в распределении генотипов и аллелей в группе больных с ДН (n=47) и без ДН (n=79). Однако обнаружена достоверно более высокая частота встречаемости D-аллеля у больных с поздними стадиями ДН (выраженной нефропатии и уремии) по сравнению с пациентами с ранней стадией ДН – МАУ ($p<0,05$). Выявленная закономерность может свидетельствовать, что присутствие D-аллеля в структуре гена АПФ является одним из маркеров прогрессирования диабетического поражения почек у больных СД типа 1. Терапия больных с начинающейся ДН (n=13) каптоприлом в течение 1 мес приводит к статистически достоверному снижению МАУ. При этом нами не выявлено достоверных различий в группах пациентов с различными аллельными вариантами гена АПФ.

Ключевые слова: диабетическая нефропатия, генетика диабетической нефропатии, I/D-полиморфизм гена АПФ, ингибиторы АПФ.

Impact of insertion-deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene on the development and progression of diabetic nephropathy and efficiency of its therapy in patients with type 1 diabetes mellitus

Zh.V. Shutskaia, O.O. Yegorova, Yu.G. Nad, A.S. Stroikova, A.V. Papayan, Ye.I. Shvarts

Summary. The study was undertaken to examine the association of the insertion-deletion (I/D) polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene with the development and progression of diabetic nephropathy (DN) and to establish a relationship of different allele types of genetic polymorphism to the efficiency of microalbuminuria (MAU) diminution in captopril-treated patients with evolving DN. The study of the I/D polymorphism of ACE gene revealed no statistical differences in the distribution of genotypes and alleles in the group of patients with (n=47) and without (n=79) DN. However, the significantly higher frequency of D allele was found in patients with end-stage DN (significant nephropathy and uremia) as compared with those of early-stage DN (MAU) ($p<0,05$). The revealed regularity may suggest that the presence of D allele in the structure of ACE gene is one of the markers of progression of diabetes-induced renal lesion in patients with type 1 diabetes mellitus. One-month captopril therapy in patients with evolving DN (n=13) causes a statistically significant decrease in MAU. At the same time, there were no significant differences in the group of patients with different allele genotypes of ACE.

Key words: diabetic nephropathy, genetics of diabetic nephropathy, insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene, angiotensin-converting inhibitors.

Введение

Диабетическая нефропатия (ДН) занимает ведущее место в ряду причин ранней инвалидизации и смертности больных сахарным диабетом (СД) типа 1. Учитывая важную роль наследственных факторов в этиопатогенезе ДН [1, 2], изучение генетических полиморфизмов в связи с данным сосудистым осложнением СД представляет значительный научный и практический интерес.

Структурный инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (вставка/отсутствие вставки из 287 пар нуклеотидов в 16-м интроне) является наиболее изученным в ассоциации с ДН [3–6]. Повышенное внимание к данному генетическому маркеру обусловлено главным образом эффективностью использования в терапии ДН ингибиторов АПФ [7]. Несмотря на то что I/D-полиморфизм локализован в некодирующей части гена, доказана его связь с уровнем АПФ в крови. При этом наиболее высокие значения зафиксированы у носителей D-аллеля [8].

Задачами нашего исследования явились изучение ассоциации I/D-полиморфизма гена АПФ с развитием и прогрессированием ДН, а также установление взаимосвязи различных аллельных вариантов данного генетического полиморфизма и эффективности снижения микроальбуминурии (МАУ) при терапии каптоприлом больных с начинающейся ДН.

Материал и методы

В исследование включены 126 больных СД типа 1 (64 мужчины и 62 женщины). Все пациенты являлись жителями Санкт-Петербурга и не были связаны узами родства. Средний возраст исследуемой группы составил 17,8±4,1 года. Средний возраст дебюта основного заболевания составил 8,2±2,2 года. Особенно следует отметить, что длительность СД у включенных в исследование пациентов была более 5 лет (варьировала от 5 до 18 лет, составляя в среднем 9,1±3,2 года).

Для определения стадии ДН была применена классификация N.Mogensen и соавт. (1983 г.) [9]. Критерием диагностики начинающейся ДН служила МАУ в пределах 30–300 мг/сут. Исследование содержания альбумина в моче проводили не менее 2 раз в суточной моче методом конкурентного связывания ELISA. Выраженную нефропатию диагностировали при альбуминурии более 300 мг в сутки.

Таблица 1. Характеристика групп больных с ДН, включенных в исследование I/D-полиморфизма гена АПФ

Параметр	Больные с ДН (n=47)	Больные без ДН (n=79)
Пол (м/ж)	25/22	39/40
Длительность диабета, годы	9,67±3,31	8,21±2,61
HbA _{1c} , %	9,9±0,3	9,1±0,4

Таблица 2. Распределение генотипов и частот аллелей I/D-полиморфизма гена АПФ у больных ДН и без ДН

Больные	Распределение генотипов*						Частоты аллелей**			
	II		ID		DD		I		D	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
С ДН (n=47)	10	21,3	25	53,2	12	25,5	45	47,9	49	52,1
Без ДН (n=79)	14	17,7	47	59,5	18	22,8	75	47,5	83	52,5

Примечание. * – $p > 0,05$; ** – $p > 0,05$.

Таблица 3. Частота встречаемости генотипов и распределение аллелей I/D-полиморфизма гена АПФ у больных различных стадий ДН

Стадия ДН	Распределение генотипов АПФ*						Частоты аллелей** n (%)			
	I		ID		DD		I		D	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Доклиническая (n=34)	9	26,5	19	55,9	6	17,6	37	57,8	31	48,4
Клиническая (n=13)	1	7,6	6	46,2	6	46,2	8	30,8	18	69,2

Примечание. * – $p > 0,05$; ** – $p < 0,05$.

Таблица 4. Показатели МАУ до и после лечения каптоприлом у больных с начинающейся ДН с различными генотипами АПФ

Генотип/ Показатель	МАУ до лечения, мг/сут	МАУ после лечения, мг/сут
II (n=3)	91,66±25,31	48,00±21,73
ID (n=7)	90,71±23,03	74,00±44,42
DD (n=3)	139,66±32,95	74,33±33,54

Стадию уремии констатировали при снижении скорости клубочковой фильтрации менее 10 мл/мин. Обследования проводили при отсутствии активного воспалительного процесса в мочевыделительной системе. В ходе исследования была сформирована группа больных ДН (29 с начинающейся нефропатией, 13 с выраженной нефропатией и 5 пациентов с ДН в стадии уремии). У 79 пациентов на момент обследования отсутствовали клинико-лабораторные признаки ДН (нормоальбинурия).

ДНК обследуемых больных выделяли фенол-хлороформным методом [10]. Идентификацию I/D-полиморфизма гена АПФ производили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [15].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистической обработки Statistica 5.0. Достоверность различий между группами оценивалась по критериям χ^2 и Стьюдента.

Результаты исследований

Для изучения влияния I/D-полиморфизма гена АПФ на формирование предрасположенности к развитию ДН мы сравнивали группы пациентов с диабетическим поражением почек и без ДН. Для снижения маскирующего влияния негенетических факторов риска все отобранные для генотипирования больные имели длительность диабета более 5 лет; сравниваемые группы статистически не различались по полу, длительности диабета, уровню гликированного гемоглобина (табл. 1). Все больные ДН (47 человек) и с нормоальбинурией (79 человек) были протипированы на наличие или отсутствие участка в 287 п.о. в 16-м интроне гена АПФ (табл. 2). Распределение генотипов в обеих группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Как видно из представленных данных, не обнаружено различий в частоте генотипов I/D-полиморфизма в группах больных с диабетическим поражением почек и без ДН ($p > 0,05$). Также не выявлено достоверных различий в частоте встречаемости I- и D-аллелей между 2 группами ($p > 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии ассоциации I/D-полиморфизма гена АПФ с развитием ДН.

Для изучения влияния I/D-полиморфизма на прогрессирование ДН мы сравнивали распределение генотипов и аллелей гена АПФ. У пациентов с ранней доклинической (34 больных с начинающейся ДН) и более поздних клинических стадий диабетической нефроангиопатии (13 человек с ДН в стадии выраженной нефропатии и уремии). Результаты представлены в табл. 3.

Достоверно более высокая частота встречаемости D-аллеля в группе больных клиническими стадиями ДН может свидетельствовать, что его присутствие является одним из маркеров прогрессирования ДН.

В ходе исследования мы анализировали также влияние I/D-полиморфизма гена АПФ на эффективность снижения суточной МАУ у 13 больных с начинающейся ДН. Все пациенты в течение 1 мес получали каптоприл в дозе 1 мг/кг/сут. К началу лечения больные находились в стадии компенсации или субкомпенсации углеводного обмена, при отсутствии активного воспалительного процесса в мочевыделительной системе. В результате лечения каптоприлом в исследуемой группе больных отмечено достоверное снижение показателей МАУ ($p < 0,05$).

Динамика снижения МАУ после 1 мес лечения каптоприлом больных начинающейся ДН с различными генотипами АПФ представлена в табл. 4.

Как видно из представленных данных, отчетливая тенденция к снижению МАУ прослеживается у больных с различными вариантами генотипов. При этом у больных с II генотипом отмечено наибольшее снижение МАУ (47,63%), в группе больных с DD-генотипом – на 46,77% и у пациентов с IO-генотипом – на 18,42%. В целом у больных, имеющих D-аллель (IO- и DD-генотипы), отмечено улучшение показателей суточной МАУ на 29,7% (до лечения $105,41 \pm 19,40$ мг/сут, после лечения $74,11 \pm 31,5$ мг/сут). Таким образом, отмечается тенденция к меньшему снижению МАУ у пациентов с наличием D-аллеля в структуре гена АПФ. Учитывая, однако, что количество наблюдений в нашем исследовании было невелико, а различия между изучаемыми группами не достигли статистической достоверности, данная проблема нуждается в дальнейшем изучении.

Обсуждение

Выяснение молекулярно-генетических механизмов развития ДН является одной из горячих точек современной медико-биологической науки. С позиций практической медицины наибольший интерес представляют полиморфизмы генов, являющиеся, с одной стороны, диагностическими маркерами предрасположенности и прогрессирования ДН, а с другой – фенотипической экспрессией которых доступна фармакологическая коррекция. I/D-полиморфизм гена АПФ максимально отвечает этим тре-

бованиям, в связи с чем ряд исследований посвящен изучению данного генетического маркера у больных ДН. Так, в исследовании M. Magte (1996 г.) [4] была показана более высокая частота встречаемости D-аллеля у больных ДН в сравнении с пациентами без нефропатии. Tarnow (1995 г.) [11], а также S. Schmidt [6] не нашли различий в частоте генотипов и аллельном распределении I/D-полиморфизма гена АПФ у больных с ДН и без нее. В ходе нашего исследования также не выявлено различий в частоте генотипов и аллельном распределении I/D-полиморфизма в группах больных с диабетическим поражением почек и без ДН ($p > 0,05$). Возможными объяснениями таких расхождений этого генетического маркера при ДН могут быть различия использованных методологических подходов, клиническая гетерогенность обследованных больных, расовые и этнические различия частот встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях, а также этнические особенности клиники нефропатии и ее прогрессирования.

Одной из актуальных проблем диабетологии и нефрологии является прогнозирование течения патологии у больных с начинающейся нефропатией. H. Yoshida и соавт. (1998 г.) [12] показали, только 80% больных с МАУ прогрессируют до стадии выраженной нефропатии. Однако с момента появления постоянной протеинурии ДН прогрессирует с математически рассчитанной скоростью ежемесячного снижения клубочковой фильтрации 1 мл/мин, что уже через 5–7 лет может привести к развитию почечной недостаточности [13]. В связи с этим доклиническая стадия ДН (начинающейся нефропатии) может считаться потенциально обратимой, а клиническая стадия ДН (выраженная нефропатия и уремия) уже необратимой. В связи с этим в нашем исследовании прогрессированием мы считали переход доклинической ДН в клиническую стадию. Значительный интерес представляет выявленное различие в частоте встречаемости I- и D-аллелей гена АПФ в сравниваемых группах. Выявленная нами более высокая частота встречаемости D-аллеля в группе больных клинических стадий ДН может свидетельствовать, что его присутствие является одним из маркеров прогрессирования ДН. Вероятно, более высокий уровень АПФ у носителей D-аллеля [8] способствует развитию внутриклубочковой гипертензии, клеточной пролиферации и как следствие развитию гломерулосклероза.

Прогностическая неблагоприятность наличия D-аллеля в структуре гена АПФ усугубляется также значительно меньшей эффективностью терапии ингибиторами АПФ лиц с DD-генотипом по сравнению с пациентами с ДН, имеющими II-генотип [5]. Исследования показывают, что использование ингибиторов АПФ эффективно влияет на снижение скорости прогрессирования ДН [7]. Однако отмечены различия в эффективности терапии у пациентов с ДН. Одной из причин таких различий H.-H. Parving (1996 г.) [5] считает особенности гена АПФ. Так, в ретроспективном исследовании у носителей генотипа DD гена АПФ отсутствовал ренопротективный эффект от эналаприла, тогда как максимально выраженный эффект был достигнут у носителей II-генотипа [14]. В нашем исследовании закономерности скорости снижения МАУ при различных

генотипах АПФ выявлено не было. Учитывая, однако, что количество наблюдений было невелико, следует считать, что данная проблема нуждается в дальнейшем изучении.

Заключение

При изучении I/D-полиморфизма гена АПФ не выявлено статистических различий в распределении генотипов у больных с диабетическим поражением почек и без ДН. Данное обстоятельство свидетельствует об отсутствии ассоциации данного генетического полиморфизма с развитием наследственной предрасположенности к ДН при СД типа 1. Большой интерес представляют полученные данные о достоверно более высокой частоте встречаемости D-аллеля у больных поздних клинических стадий ДН по сравнению с пациентами доклинической стадии (начинающейся ДН). Возможно, что присутствие D-аллеля в структуре гена АПФ у больных с диабетическим поражением почек является маркером прогрессирования данной патологии. В ходе исследования нами не выявлено статистически значимых различий первичного ответа на терапию каптоприлом у больных ДН с различными аллельными вариантами гена АПФ.

Литература

1. Doria A, Warram JH, Krolewski AS. Genetic susceptibility to nephropathy in IDDM: from epidemiology to molecular genetics. *Diabetes* 1995; 44: 287–314.
2. Krolewski AS, Quinn I, Angelico MC, Warram JH. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patient with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 940–5.
3. Bjorck S, Blohm G, Sylven C, Mulec H. Deletion insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (Suppl. 2): 67–70.
4. Marre M, Bernadet P, Gallois Y et al. Relationship between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 1997; 47: 1585–95.
5. Parving HH, Jacobsen P, Tarnow L et al. Effect of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene on progression of diabetic nephropathy during inhibition of angiotensin converting enzyme: observational follow up study. *BMJ* 1996; 313: 591–4.
6. Schmidt S, Schone N, Ritz E. The Diabetic Nephropathy Study Group: Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995; 47: 1176–81.
7. Parving H-H, Hommel E, Smidt UM. Protection of kidney and decrease in albuminuria by captopril in insulin dependent diabetics with nephropathy. *Brit Med J* 1988; 27: 1086–91.
8. Rigal B, Hubert C, Albenc-Gelas F et al. An insertion – deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343–6.
9. Mogensen C, Christensen C, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient nephropathy. *Diabetes* 1983; 32: 64–78.
10. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3: 2303.
11. Tarnow L, Cambien F, Rossing P et al. Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. *Diabetes* 1995; 44: 489–94.
12. Yoshida H, Kon V, Ichikawa I. Polymorphism of the renin-angiotensin system genes in progressive renal diseases. *Kidney Int* 1996; 50: 732–44.
13. Дедов ИИ, Фадеев ВВ. Введение в диабетологию. М., 1998: с. 153.
14. Van Essen GG, Rensma PL, de Zeeuw D et al. Association between angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 1996; 347: 94–5.
15. Odawara M, Matsumura A, Yamashita K. Mistyping frequency of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. *Human Genet* 1997; 100: 163–6.