

## ПОЛИМОРФИЗМ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА И ДИАБЕТИЧЕСКОЙ АНГИОПАТИИ В КЫРГЫЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

*Г.С. Бобушева, Ж.Т. Исакова*

Рассматривается носительство D аллеля и DD генотипа полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента в связи с утолщением толщины интима медиа каротидных артерий, наличием гиперхолестеринемии и артериальной гипертензии.

*Ключевые слова:* полиморфизм гена АПФ; макроангиопатия; толщина интима медиа; сахарный диабет 2 типа.

При сахарном диабете (СД) 2 типа развитие диабетических ангиопатий заметно ухудшает прогноз и увеличивает смертность пациентов от осложнений, последствий преждевременного атеросклероза. Изучение влияния разных генов на заболеваемость сахарным диабетом вызвало разногласие среди ученых. Влияние, в частности трех генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС) – ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), ангиотензиногена (AGT) M235T, (AT1R) и A1166C полиморфизма для выяснения возможной роли этих расстройств у азиатов давали периодически превалирование то аллель I и ID генотипа, то D аллеля и DD генотипов, как достоверно частых и были ассоциированы с развитием как поражения почек, так и макроангиопатий [1–3]. Более того, некоторые ученые выразили сомнение об участии этих генов в патогенезе гипертонии в китайской популяции [4]. Третьи пришли к выводу, что полиморфизм A1166C гена AT1R (рецепторов к АП) мог быть единственным потенциальным генетическим маркером для увеличенной восприимчивости лишь к почечным осложнениям при СД 2 типа [5]. Развитие осложнений лишь при синергическом взаимодействии полиморфизма гена АПФ и гена рецепторов АП

было еще одним вариантом сомнения ученых [3]. Хотя считается, что гипергликемия – главный предиктор осложнений при СД, однако этот риск, по их мнению, модифицируется под влиянием факторов так называемого метаболического синдрома [1,6–9].

**Цель:** изучить клинико-функциональные особенности макроангиопатий у этнических кыргызов, больных СД 2 типа, во взаимосвязи с полиморфизмом гена АПФ.

**Материал и методы.** Было обследовано 106 мужчин кыргызской национальности в возрасте от 37 до 75 лет (средний возраст  $52,1 \pm 7,4$ ) с СД 2 типа. Повышенным считалось систолическое АД (САД) больше 130 мм рт. ст. и/или диастолическое АД (ДАД) больше 80 мм рт. ст., так как известно, что данный уровень АД в сочетании с СД несет в себе высокий риск развития ангиопатий (нефропатии, ретинопатии, макроангиопатий).

Всем пациентам было проведено клиническое обследование. Ожирение устанавливалось при индексе массы тела более 30 кг/м<sup>2</sup>. Диагноз КБС устанавливался при наличии у пациентов положительного опросника Роузе, перенесенного в анамнезе инфаркта миокарда с наличием рубцовых изменений на ЭКГ, положительных проб с физиче-

ской нагрузкой и/или обнаружении ишемических изменений при суточном ЭКГ-мониторировании.

ДНК выделялась из лимфоцитов крови с использованием набора для экстракции ДНК из венозной крови Nucleon BACC3 kit Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Анализ I/D полиморфизма гена АПФ проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием пары олигонуклеотидов праймеров 5'-CTG-GAGACCACTCCCATCCTT-3' и 5'-TGGCCAT-CACATTCGTCAGAT-3'. В результате ПЦР-амплификации синтезировались фрагменты ДНК, содержащие в себе вставку (аллель I) или не содержащие ее (аллель D), размером ~490 п.н. и ~190 п.н. соответственно. ПЦР-амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, которая содержала 1×ПЦР буфер (Gibco BRL Life Technologies, Великобритания), 1,5 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 5 % DMSO, 0,2 мкМ каждого dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), 0,5 мкМ каждого праймера, 0,5 ЕД Taq ДНК-полимеразы Platinum (Gibco BRL Life Technologies, Великобритания) и 100 нг геномной ДНК. ПЦР проводили на термоблокере MINI-GENE (Stuart Scientific, Великобритания) по следующей программе: первый цикл – 94°C/4 мин, 30 циклов – 94°C/45 сек, 61°C/45 сек, 72°C/1 мин, последний цикл – 72°C/10 мин. Полученные ПЦР продукты разделяли с помощью горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Сканирование геля, визуализацию и анализ результатов электрофореза проводили на имидж-денситометре Fluor-S MultiImager (Bio-Rad, США).

При обработке материала применялись методы вариационной статистики с использова-

нием критерия Стьюдента. Статистические расчеты выполняли с помощью программы фирмы "Microsoft"-Excel, v.7.0.

**Результаты.** У пациентов наиболее часто встречались такие факторы риска, как артериальная гипертензия (АГ), ожирение, гиперхолестеринемия (ГХС) и гипертриглицеридемия (ГТГ) (табл. 1).

Каждый третий был курильщиком и 36 % имели низкий уровень липидов высокой плотности (ЛПВП).

Для оценки влияния различных генотипов на факторы риска липидного и углеводного обменов все обследуемые лица были разбиты на три группы в зависимости от генотипа. При анализе факторов риска у обследованных лиц с различными генотипами была выявлена достоверная разница по наличию АГ (соответственно уровни САД и ДАД), в то же время по встречаемости курения, отягощенной наследственности по СД и АГ статистически значимой разницы выявлено не было (табл. 2).

Наблюдалось достоверное различие как по частоте наличия АГ, так и по уровням АД. В группе с DD генотипом уровни САД и ДАД были значимо выше, чем в других группах. По возрасту и остальным основным факторам риска КБС различий между исследуемыми группами не обнаружено. Встречаемость КБС в группе с DD генотипом была подтверждена у 26 пациентов. Наиболее высокая постпрандиальная гипергликемия наблюдалась у лиц с DD генотипом; в то же время уровень HbA<sub>1c</sub>, независимо от генотипа полиморфизма гена АПФ, сохранялся высоким у всех пациентов с различными генотипами.

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных пациентов

Фактор риска	В общей группе, n (%)
Возраст (лет)	52,1±7,4
Артериальная гипертензия (АД>130/80)	93 (87,7)
Ожирение (ИМТ > 30)	91 (85,8)
Курение	31 (29,2)
Отягощенная наследственность по диабету	7 (6,6)
Отягощенная наследственность по ССЗ	18 (17,0)
Уровень ОХС >4,4 ммоль/л	91 (85,8)
ЛПВП-ХС < 1,0 ммоль/л	36 (33,9)
ТГ>1,6 ммоль/л	98 (92,4)
КБС	16 (15,1)
Эссенциальная гипертензия	67 (63,2)
Вторичная гипертензия (диабетическая нефропатия)	16 (15,1)
Изолированная систолическая АГ	7 (6,6)
Всего (человек)	106

Таблица 2

## Факторы риска обследованных пациентов

Фактор	II	ID	DD	p
Возраст (лет)	50±5,7	49±7,8	57±6,9	нд
Артериальная гипертензия (%)	68,3	64,8	87,3*#	p<0,05
САД, мм рт. ст.	152,37±33,9	142,52±25,8	188,4±8,8*#	p<0,05
ДАД, мм рт. ст.	87,18±13,7	89,7±11,7	105,5±6,2*#	p<0,05
Ожирение, %	72,5	71,6	82,6	нд
Курение, %	36,1	22,6	28,7	нд
Отягощенная наследственность по диабету, %	20,8	17,8	23,5	нд
Отягощенная наследственность по АГ, %	19,7	19,3	34,2	нд
КБС	23,1	25,5	26	нд

Примечание: \* – достоверность в группах ID и DD; # – достоверность в группах II и DD.

Таблица 3

## Показатели липидного обмена и показателей углеводного обмена у больных СД 2 типа в зависимости от генотипов

Показатель	1 группа (II генотип), n=36	2 группа (ID генотип), n=41	3 группа (DD генотип), n=29	p 1–2	p 2–3	p 1–3
ХС общий, ммоль/л	4,94±0,22	5,16±0,24	5,96±0,19*#	нд	<0,05	<0,01
ТГ, моль/л	2,12±0,78	2,2±0,64	2,78±0,64	нд	нд	нд
ЛПВП, моль/л	0,75±0,10	0,61±0,11	1,02±0,16#	нд	<0,05	нд
ЛПНП, моль/л	3,17±0,89	3,15±0,23	3,07±0,28	нд	нд	нд
Глюкоза крови, натощак, моль/л	7,61±0,66	9,81±0,22	8,37±0,32	нд	нд	нд
Постпрандиальная глюкоза, моль/л	12,3±0,69	14,10±0,58	15,86±1,78	нд	нд	нд
НвА1с, %	7,51±0,68	7,53±0,76	7,38±0,43	нд	нд	нд

Примечание: \* – достоверность в группах ID и DD; # – достоверность в группах II и DD.

При анализе липидных показателей было отмечено, что пациенты с DD генотипом имели достоверно более высокий уровень ОХС, по сравнению с двумя другими (p<0,05), и значимо низкий уровень ЛПВП.

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи генотипов полиморфизма АПФ с клиническими данными у больных СД 2 типа оказалось, что возраст, ИМТ, глюкоза крови натощак влияния не оказали.

При анализе показателей углеводного обмена оказалось, что уровень глюкозы натощак и постпрандиальная гипергликемия в обследуемых группах, как и по показателю гликированного гемоглобина (НвА1с), отличались недостоверно (табл. 3).

Однако наиболее высокая постпрандиальная гипергликемия наблюдалась у лиц с DD генотипом; в то же время уровень НвА1с, независимо от генотипа полиморфизма гена АПФ,

сохранялся высоким у всех пациентов с различными генотипами.

При анализе липидных показателей было отмечено, что пациенты с DD генотипом имели достоверно более высокий уровень ОХС, по сравнению с двумя другими (p<0,05), и значимо низкий уровень ЛПВП.

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи генотипов полиморфизма АПФ с клиническими данными у больных СД 2 типа оказалось, что возраст, ИМТ, глюкоза крови натощак влияния не оказали. Однако отмечена зависимость наличия генотипа DD как от давности диабета, так и уровня АД, при этом более тесная связь была обозначена с уровнем ДАД (r = 0,54; p < 0,01) по сравнению с САД (r = 0,368; p < 0,05). Достоверные корреляции были получены и для уровней ОХС и уровня постпрандиальной гликемии. Для ОХС эта корреляция была достоверно

Показатели дуплексного сканирования сонных артерий у пациентов СД 2 типа в зависимости от генотипа

Показатель	II генотип, (n=25)	ID генотип, (n=28)	DD генотип, (n=25)
ОСА s (см)	0,62±0,06	0,61±0,07	0,65±0,07
ОСА d (см)	0,59±0,07	0,57±0,08	0,61±0,07
ТИМ s (см)	0,057±0,014	0,059±0,01	0,064±0,015*
ТИМ d (см)	0,061±0,016	0,064±0,018	0,069±0,015*
Vs (м/сек)	0,56 ±0,01	0,49±0,09	0,46±0,09
Vd (м/сек)	0,16±0,03	0,15±0,03	0,13±0,03
S/D ср	3,39±1,08	3,45±0,65	3,78±0,98
RI ср	0,689±0,056	0,701±0,053	0,723±0,072
Наличие атеросклеротического поражения сонных артерий, %	11 (44)	13 (46,4)	16 (64)
Множественное поражение сонных артерий, %	6 (24)	7 (25)	9 (36)

ОСА – общая сонная артерия; s – в систолу; d – в диастолу; V – скорость кровотока; RI – индекс резистентности; данные представлены как среднее (95 % ДИ); \* –  $p < 0,05$  при сравнении DD генотипа с группой с II генотипом.

высокой с DD генотипом ( $r = 0,43$ ;  $P < 0,05$ ), несколько – меньшей в группе с ID. Также установлена статистически значимая обратная связь генотипа ID с уровнем ЛПВП. В то время как в группе с II генотипом подобной взаимосвязи не получено. При множественном корреляционном анализе взаимосвязь генотипа DD с HbA1c была достоверно независимым предиктором повышения уровня ОХС. Таким образом, выявилась взаимосвязь между DD генотипом гена АПФ и хронической гипергликемией (особенно с HbA1c) с высоким уровнем ОХС у пациентов СД 2 типа.

Дуплексное сканирование сонных артерий у пациентов с DD генотипом выявило значимое утолщение ТИМ, по сравнению с показателями других групп (табл. 4). Скоростные показатели, так же, как и встречаемость атеросклеротического поражения, в том числе множественных бляшек у пациентов с различными генотипами полиморфизма гена АПФ, по подгруппам достоверно не отличались.

При сопоставлении показателей состояния сосудистой стенки сонных артерий с клиническими параметрами у больных СД 2 типа выявлена прямая связь с уровнем ОХС сыворотки крови ТИМ, причем как в систолу, так и в диастолу ( $r = 0,402$ ,  $p < 0,05$ ), и пострандиальной гликемией. Выявилась прямая корреляционная зависимость ТИМ с длительностью диабета и уровнем САД. Также получена негативная вза-

имосвязь уровня ДАД с диаметром ОСА в систолу и диастолу ( $r = 0,389$ ,  $p < 0,05$ ).

**Обсуждение.** Результаты данного исследования выявили наличие взаимосвязи между DD генотипом АПФ с гиперхолестеринемией и пострандиальной гипергликемией. Возможно, выявленная ассоциация с липидными нарушениями связана с более частым развитием ожирения и отягощенностью наследования по АГ.

Выявленная нами взаимосвязь полиморфизма гена АПФ с каротидным атеросклерозом, а именно, достоверное утолщение ТИМ у больных с DD генотипом, не может быть интерпретирована однозначно, поскольку результаты исследований исключают наличие взаимосвязи полиморфизма гена АПФ и развития макроангиопатий и КБС. Наличие у диабетиков факторов углеводного и жирового обмена и функциональных расстройств (АГ), подтверждает общие установленные факты о развитии в итоге преждевременного атеросклероза.

#### Литература

1. Are genetic variants of methyl group metabolism enzymes risk factors predisposing to obesity / I. Terruzzi, P. Senesi, I. Fermo et al. // J Endocrinol Invest. 2007. Vol. 30. P. 747–753.
2. Hosoi M., Nishizawa Y., Kogawa K. et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with carotid arterial wall thickness in

- non– insulin-dependent diabetic patients. // *Circulation*. 1996. P. 704–707.
3. *Licata G., Di Chiara T., Licata A. et al.* Relationship between circulating E-selectin, DD genotype of angiotensin-converting-enzyme, and cardiovascular damage in central obese subjects // *Metabolism*. 2003. Aug; 52(8). P. 999-1004.
  4. *Feng Y., Niu T., Xu X. et al.* Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is associated with type 2 diabetes // *Diabetes*. 2002. Jun. 51(6):1986–8.
  5. *Ha S.K., Park H.C., Park H.S. et al.* ACE gene polymorphism and progression of diabetic nephropathy in Korean type 2 diabetic patients: effect of ACE gene DD on the progression of diabetic nephropathy // *Am J Kidney Dis*. 2003. May. 41(5). P. 943–9.
  6. *Castellano M., Muiesan M.L., Beschi M. et al.* Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism // *Hypertension*. 1996. 28. P. 1076–1080.
  7. *Fakhredin A. Sayed-Tabatabaei, Jeanine J. et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Carotid Artery Wall Thickness. A Meta-Analysis // *Stroke*. 2003. 34. P. 1634–1639.
  8. *Niu T., Chen X., Xu X.* Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease: therapeutic implications // *Drugs*. 2002. 62(7). P. 977–93.
  9. *Stephens J.W., Dhamrait S.S., Cooper J.A. et al.* D allele of the ACE I/D common gene variant is associated with Type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects // *Mol Genet Metab*. 2005. Jan; 84 (1). P. 83–9.