

Л.Л. Алексеева

ПОИСК ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА РЕЗИСТИНА У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИ- ЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2 У ЯКУТОВ

УДК: 575.113.1:616.379-008.64 (=512.157)

В этнической группе якутов полиморфные варианты гена резистина rs34861192 (-639G/A), rs1862513 (-420C/G), rs3219177 (156C/T) и rs3745367 (298G/A) достоверно не ассоциированы с диабетической ретинопатией при сахарном диабете типа 2, что свидетельствует об их второстепенной роли в развитии ретиального диабетического поражения.

Ключевые слова: резистин, генетический полиморфизм, сахарный диабет типа 2, диабетическая ретинопатия.

In the ethnic group of the Yakuts polymorphic variants of resistin rs34861192 (-639G/A), rs1862513 (-420C/G), rs3219177 (156C/T) and rs3745367 (298G/A) are not for sure associated with diabetic retinopathy in 2 type sugar diabetes which is the evidence of their secondary role in the development of retinal diabetic lesion.

Key words: resistin, genetic polymorphism, 2 type sugar diabetes, diabetic retinopathy.

Диабетическая ретинопатия (ДР) является классическим примером генерализованной микроангиопатии и актуальной проблемой слабовидения и слепоты. Риск развития ДР зависит от длительности и типа сахарного диабета (СД). Своевременное выявление и проведение лечения на ранних стадиях ДР позволяют остановить прогрессирование сосудистых изменений оболочек глаза.

За последние 25 лет уровень заболеваемости населения СД в Республике Саха (Якутия) возрос в 8 раз, что значительно превышает аналогичные параметры в отдельных регионах развитых стран мира. В структуре диабета СД типа 2 занимает 91,5%. В течение последних двух лет уровень заболеваемости СД типа 2 увеличился более чем в 2 раза, особенно среди коренных жителей сельских районов Центральной Якутии. Одновременно отмечается интенсивный рост сосудистых осложнений вследствие диабетического поражения организма пациентов. Диабетические изменения сетчатки развиваются раньше других сосудистых осложнений, при средней продолжительности основного заболевания 3,6 года. Уровень инвалидности вследствие ДР среди населения республики ежегодно увеличивается [1]. При этом обращают внимание региональные данные по распространенности ДР в 2009 г. – 13200 больных, из которых лишь 330 чел. (2,5%) нуждаются в проведении лазерной коагуляции сетчатки [2].

Отсутствие скрининга ДР в условиях республики и данных о фактической эпидемиологии заболевания, не-

гативная динамика распространения и уровень инвалидности пациентов вследствие диабетического поражения глазного дна, напрямую свидетельствуют о несвоевременности выявления этой патологии у пациентов при неполном объеме проводимых диагностических и лечебных мероприятий и, тем самым подтверждают медико-социальное и экономическое значение для дальнейшего изучения особенностей диабетической ретинопатии.

Механизм развития микроангиопатий, в том числе и диабетической ретинопатии при СД 2 типа, недостаточно изучен. Предполагается, что наряду с факторами, которые связаны с метаболическими нарушениями, в патогенезе микроангиопатией принимают участие наследственные факторы. На это указывают нередкие семейные случаи заболевания. Наследственные факторы до настоящего времени не идентифицированы, однако их значение в развитии микроангиопатий не вызывает сомнений. Заболевания со сложным наследованием вызываются не единичной мутацией в одном гене, а сочетанием генетических вариаций во многих генах, каждый из которых вносит сравнительно скромный вклад, но все вместе они существенно увеличивают риск развития заболевания. Учитывая особую актуальность последствий диабета, в современных условиях возрос интерес к генетическим факторам, участвующим в формировании сосудистых осложнений [8].

В связи с этим изучение ассоциации диабетической ретинопатии с полиморфными генами – кандидатами и дальнейший поиск их патогенных аллелей у жителей разных стран и этнических групп обеспечивают актуальность проводимых научных исследований в

мире. Учитывая мультифакториальность заболевания, при проведении научных исследований особое внимание уделяют генетической однородности групп как среди больных СД типа 2, так и в контрольной группе.

Проспективные исследования показали, что висцеральное ожирение связано с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, дислипидемии, СД типа 2 [2,6,7]. Глубокие (висцеральные) скопления белой жировой (адипозной) ткани расположены в области сальника, брыжейки кишки, в забрюшинном пространстве организма. Адипокины, секретируемые висцеральным жиром, поступают преимущественно в портальную систему и печень, а из подкожных жировых депо – в системный кровоток. В связи с этим висцеральная жировая ткань оказывает влияние главным образом на метаболические процессы, происходящие в печени [5].

Наш интерес вызвал поиск роли полиморфных маркеров генов адипокинов, и в частности гена резистина, в развитии диабетической ретинопатии при СД типа 2.

Резистин – самый малый по молекулярному весу (12 кДа) полипептид, принадлежащий к семейству протеинов, содержащих богатый цистеином С-терминальный домен. Секретируется преимущественно преадипоцитами и в меньшей степени зрелыми адипоцитами висцеральной жировой ткани. Участвует в дифференцировке адипоцитов и, по данным некоторых авторов, снижает чувствительность рецепторов к инсулину.

Введение рекомбинантного резистина в культуру адипоцитов нарушает стимулированное инсулином поглощение глюкозы, тогда как введение анти-

тел к резистину предотвращает этот эффект. По экспериментальным данным, резистин нейтрализует тормозящее влияние инсулина на продукцию глюкозы печенью и снижает поглощение глюкозы скелетной мускулатурой независимо от ГЛЮТ-4. Однако роль резистина в механизмах развития инсулинорезистентности еще недостаточно ясна. В опытах на мышах было показано, что при отсутствии резистина улучшается гомеостаз глюкозы в результате снижения глюконеогенеза в печени. Этот эффект осуществлялся частично через увеличение активности АМФ-активированной протеинкиназы и снижение экспрессии энзимов глюконеогенеза в печени. Эти данные подтверждают значение резистина для гомеостаза глюкозы у экспериментальных животных. В опытах на животных показано, что овариэктомия и тестостерон значительно повышают экспрессию резистина. Подобную роль резистина у человека предстоит выяснить [9].

Учитывая актуальность проблемы инвалидности, слабовидения и слепоты пациентов вследствие СД типа 2 необходимостью стало изучение влияния и специфики генетических факторов на развитие диабетической ретинопатии в этнической группе якутов, поскольку аборигенное население Лено-Амгинского междуречья Республики Саха (Якутия) характеризуется генетической однородностью популяции [4].

Цель данной работы – определить возможную ассоциацию между полиморфными вариантами гена резистина и диабетической ретинопатией при сахарном диабете типа 2 у якутов.

Материал и методы. Исследование проведено в рамках совместной научной программы «Клинико-генетические исследования сахарного диабета 2-го типа в якутской популяции» (госзаказ Министерства науки и высшего профессионального образования РС(Я) №1.6.5. 2006 г.) по теме «Генетические исследования соматической патологии», разрабатываемой ФГНУ «Институт здоровья» (г.Якутск) совместно с Отделением клинической генетики Института неврологических заболеваний США (NINDS/NIH) (г.Бетесда), по теме НИОКР «Клинико-генетическая характеристика сахарного диабета и его глазных осложнений в якутской популяции. Профилактика слепоты и слабовидения вследствие диабетической ретинопатии».

Нами обследованы коренные жите-

ли, принадлежащие к этнической группе якутов и проживающие в 5 районах Лено-Амгинского междуречья Республики Саха (Якутия): Амгинский, Усть-Алданский, Таттинский, Чурапчинский, Мегино-Кангаласский.

Учитывая особые этические моменты, связанные с охраной права личности, осмотры и забор биологического материала проводились с заполнением специальных медицинских карт при добровольном согласии на участие в клиническом исследовании взрослого пациента или родителя несовершеннолетнего больного. Форма указанной медицинской карты одобрена Комитетом по этике при Якутском научном центре комплексных медицинских проблем СО РАМН (протокол № 5 от 21.06.2006г.).

В ходе работы исследованы 238 образцов ДНК этнических якутов. Группу исследования составили 78 больных ДР (классификация E.Kohner, M.Porta, 1990) при СД типа 2, в возрасте свыше 40 лет. Контрольная группа состояла из 160 добровольных доноров той же этнической группы, без клинических и лабораторных признаков сахарного диабета, не родственных между собой и не имеющихотягощенный семейный анамнез по сахарному диабету.

Кровь для выделения ДНК собирали из локтевой вены пациента в специальный вакутейнер с консервантом EDTA. Собранную кровь замораживали в специальном контейнере при температуре -20° С и ниже. ДНК экстрагировали из лейкоцитов с помощью системы очистки (Promega, Madison, WI).

В работе использовали 4 полиморфных варианта гена резистина, участвующих в воспалительных процессах: rs34861192 (-639G/A), rs1862513 (-420C/G), rs3219177 (156C/T) и rs3745367 (298G/A).

Гаплотипы rs34861192 (-639G/A), rs1862513 (-420C/G), rs3219177 (156C/T) и rs3745367 (298G/A) гена резистина анализированы с помощью аллельной дифференциации Tagman универсальной средой ПЦР (по AmpErase UNG). Все реакции проводились на системе ABI7300 с использованием программы SDS 1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Фрагменты ПЦР денатурировались при температуре 95°С в течение 5 мин с последующей ренатурацией понижением температуры до 25°С на протяжении 45 мин. Идентификация аллелей выполнена с использованием системы Wave Nuclear Acid Fragment Analysis

System (Transgenomic, Omaha, NE). Результаты соответствовали прямым данным секвенирования.

Офтальмологическое обследование пациентов включало стандартные методы определения визометрии, офтальмотонуса, биомикроскопии, офтальмоскопии с применением универсальной линзы Гольдмана в условиях медикаментозного мидриаза при отсутствии противопоказаний.

Пациенты обеих групп не имели особых статистических различий по полу и возрасту. Основной составляющей обеих групп были женщины в возрасте старше 50 лет. Среди пациентов исследуемой группы отмечается повышенный индекс массы тела, уровня гликемии и артериального давления.

В результате офтальмологического исследования пациентов установлено, что длительность развития ДР варьировала в диапазоне от 1 года до 20 лет. ДР развилась в 62,8% случаев после установления СД типа 2 в течение первых 5 лет. Впервые выявленная ДР, преимущественно 1-й и 2-й стадии, установлена нами при сроке СД типа 2 на момент исследования и продолжительности основного заболевания до 1 года в 30% случаев. Данный факт подтверждает тяжесть диабетических микроангиопатий органа зрения, обуславливающих раннюю слепоту и слабовидение пациентов в первые годы заболевания.

Статистический анализ данных проведен с использованием пакета Statistica 8.0 и SAS 7.0. При сравнении качественных данных использован критерий Пирсона χ^2 и точный критерий Фишера. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%. Относительный риск заболевания по каждому аллелю вычисляли как соотношение шансов (odds ratio - OR) с расчетом доверительных интервалов (OR'). При OR=1 ассоциации нет, OR>1 – положительная ассоциация заболевания с аллелем и генотипом и OR<1 – отрицательная ассоциация.

Результаты исследования. В общей популяции якутов исследовано 4 полиморфных варианта гена резистина, участвующих в воспалительных процессах: rs34861192 (-639G/A), rs1862513 (-420C/G), rs3219177 (156C/T) и rs3745367 (298G/A).

Эмпирическое распределение частоты генотипов полиморфных маркеров гена RES в популяции якутов соответствовало равновесному, теоретически ожидаемому распределению Харди-Вайнберга: -639G/A ($\chi^2 = 0.009$,

$P=0.999$), $-420C/G$ ($\chi^2=0.003$, $P=0.999$), $156C/T$ ($\chi^2=0.006$, $P=0.999$) и $298G/A$ ($\chi^2=0.008$, $P=0.999$).

Ассоциации с ДР ни одного из полиморфных маркеров гена резистина у якутов не отмечались. Одновременно различия по частотам генотипов и аллелей гена резистина в зависимости от пола больных ДР при СД типа 2 не выявлены.

Результаты полученных данных позволяют сделать предположение о второстепенной роли наследственных факторов – полиморфных вариантов генов резистина, участвующих в воспалительных процессах: rs34861192 ($-639G/A$), rs1862513 ($-420C/G$), rs3219177 ($156C/T$) и rs3745367 ($298G/A$) в развитии ДР при СД типа 2 у якутов.

Таким образом, в этнической группе якутов с СД типа 2 изученные полиморфные варианты гена резисти-

на rs34861192 ($-639G/A$), rs1862513 ($-420C/G$), rs3219177 ($156C/T$) и rs3745367 ($298G/A$) достоверно не ассоциированы с ДР.

Литература

1. Алексеева Л.Л. Клинические особенности развития сахарного диабета 2 типа у якутов / Л.Л. Алексеева, П.М.Игнатьев, Ф.А.Платонов, В.И.Лазаренко // Якутский медицинский журнал. - №1. - 2010 г. - С.7-10.
2. Alekseeva L.L. Clinical features of type 2 diabetes in Yakut people / L.L. Alekseeva, P.M. Ignatiev, F.A. Platonov, V.I. Lazarenko / Yakutsk Medical journal. - 2010, - № 1. - p.7-10.
3. Американская диабетологическая ассоциация. Консенсус конференции по инсулинорезистентности 5-6 ноября 1997 г. // Международный медицинский журнал. - 1999. - №1-2. - С.66-70.
4. American diabetic association. Consensus of conference of the insulin resistance 5-6 november 1997/ World medical J. - 1999. - V.1-2. - P. 66-70.
5. Государственный регистр больных сахарным диабетом по РС (Я), 2009 г.
6. Government register of patients of sugar

diabetes type 2 of Sakha Republic (Yakutia), 2009.

4. Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ митохондриальной ДНК и Y-хромосомы / С.А. Федорова. - Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН. - 2008. - 235 с.

Fedorova S.A. Genetic portraits of Sakha Republic (Yakutia) peoples: Analysis of Mitochondrial DNA and Y-chromosome / S.A. Fyodorova - Yakutsk: Pub. by Yakutsk SD RAS. - 2008. - 235.

5. Arner P. Catecholamine-induced lipolysis in obesity / P. Arner // Int J Obes Relat Metab Disord. - 1999. - V.23. - Suppl 1. - P.10-13.

6. A new concept of the selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice / M.L.G. Gorreria [et al.] // J Hypertens. - 2001. - V.19. - S95.

7. Impairment of health and quality of life in people with large waist circumference / M.E. Lean [et al.] // Lancet. - 1998. - V.351. - P.853-856.

8. Reaven G.M. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. / G.M. Reaven // J Clin Endocrinol Metab. - 2003. - V.88. - P.2399-2403.

9. Smith U. Resistin - resistant to defining its role / U.Smith // Obes Res. - 2002. - V.10. - P.61-62.

Н.В. Мотина, А.Ю. Жариков, Я.Ф. Зверев, А.В. Лепилов, В.В. Лампатов, Ю.Г. Мотин

РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В РАЗВИТИИ ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА У КРЫС

УДК 616.34-089-006.6

Анализируются результаты морфологического исследования почки крыс с этиленгликолевой моделью оксалатного нефролитиаза. Оценивали изменение экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы и малонового диальдегида в ходе моделирования оксалатной модели нефролитиаза. Показаны морфологические признаки активации процессов оксидативного повреждения тканей и ослабления функционирования системы ферментной антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: экспериментальный нефролитиаз, оксидативное повреждение, морфология.

The results of kidney medulla morphological study from rats with ethylenglycol oxalate nephrolithiasis model are analyzed. Characteristics mitochondrial superoxide dismutase and malone dialdehyde expression during ethylenglycol oxalate nephrolithiasis modeling are evaluated. Registered morphological signs of oxidative damage activation and antioxidant enzyme attenuation in renal tissues.

Key words: experimental nephrolithiasis, oxidative damage, morphology.

Введение. Все больше сведений указывают на важную патогенетическую роль повреждения клеток и тканей почек в развитии оксалатного нефролитиаза. Установлено, что повреждение уротелия способствует формированию первичного очага литогенеза на бляшках Рэндалла в интерстиции, прилежащем к тонкому отделу петли

Генле, с последующим пенетрированием в просвет собирательных трубок, где происходит окончательное формирование камней [4]. При этом в настоящее время преобладающим является мнение, согласно которому повреждение эпителиоцитов канальцев почки при оксалатном нефролитиазе напрямую связано с активацией процесса свободно-радикального окисления (СРО) в почке [4]. Данные, подтверждающие это мнение, ранее были получены и в нашей лаборатории. Было установлено, что при моделировании экспериментального нефролитиаза наблюдались характерные признаки оксидативного стресса в почках, сопровождающиеся отложением в зоне почечного сосочка кальций-позитивных депозитов [5]. Полученные результаты в совокупности с литературными данными обусловили интерес к более

глубокому изучению патоморфологических изменений почки на фоне активации процесса СРО при экспериментальном нефролитиазе.

Цель исследования. Определить закономерности патоморфологических изменений почки и особенности экспрессии показателей оксидативного повреждения (малоновый диальдегид) и антиоксидантной защиты (митохондриальная супероксиддисмутаз) при этиленгликолевой модели оксалатного нефролитиаза.

Материал и методы. Экспериментальная модель оксалатного нефролитиаза была выполнена на 60 самцах крыс линии Wistar массой тела от 180 до 250г.

Все животные были разделены на три группы по 20 крыс. Крысы первой группы находились на общевиварном рационе, получали в качестве питья

Сотрудники Алтайского государственного медицинского университета: **МОТИНА Наталья Владимировна** – ассистент каф. гистологии, motinan@gmail.com, **ЖАРИКОВ Александр Юрьевич** – к.б.н., доцент, zharikov_a_y@mail.ru. **ЗВЕРЕВ Яков Федорович** – д.м.н., проф., zver@asmu.ru, **ЛЕПИЛОВ Александр Васильевич** – д.м.н., проф., lepilov@list.ru, **ЛАМПАТОВ Вячеслав Витальевич** – д.б.н., проф., lampatov@asmu.ru, **МОТИН Юрий Григорьевич** – к.м.н., ассистент каф. гистологии, ymotin@mail.ru.