Л. Н. Сивицкая[1], Н. Г. Даниленко[1], З.В. Забаровская[2], О. Г. Давыденко[1]

Роль мутаций HFE гена в развитии Гестационного сахарного диабета

[1]Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси

[2] Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Цель исследования. Определение взаимосвязи мутаций C282Y и H63D с риском развития и степенью тяжести (классами) ГСД у беременных женщин. Материал и методы. У 65 беременных женщин с ГСД выполнено выделение геномной ДНК из периферической крови по адаптированному методу Mathew C.C. Определение мутаций C282Y и H63D в гене HFE осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами на амплификаторе MyCyclerTM Termal cycler (BIORAD). Результаты. У женщин с ГСД носительство основных мутаций гена HFE показало, что частоты C282Y и H63D в этой выборке статистически не отличаются от показателей, определенных для населения Республики Беларусь. При сравнении классов ГСД разницы в частотах мутации C282Y не обнаружено ($p > 0,05\%$), но показатель для H63D достоверно выше у женщин с ГСД класса B нежели у пациенток A1 ($\chi 2 = 5,8$; $p = 0,02$). Заключение. Мутации C282Y и H63D в гене HFE не связаны с риском развития ГСД (OR = 0,6; 95% CI 0,2 – 2,1) у белорусских женщин. Носительство мутации H63D связано со степенью тяжести (класса) ГСД, в 5 раз увеличивает риск утяжеления класса с A1 до B при ГСД.

Ключевые слова: гестационный сахарный диабет, мутации, ген, частоты генотипов риска, классы.

Гестационный сахарный диабет (ГСД) является серьезным и одним из наиболее распространенных нарушений углеводного обмена встречающегося во время беременности. По данным Американской диабетической ассоциации это заболевание отмечается у 4% беременных женщин, что в 100 раз чаще, чем случаи

Репозиторий БГМУ

гестации на фоне сахарного диабета (СД) 1 типа или 2 типа [1, 2]. В литературе подробно описаны факторы риска, приводящие к развитию ГСД (таблица 1) [1–5]. Однако, их явно не достаточно для того, чтобы подтвердить или исключить вероятность развития ГСД у конкретной женщины, предсказать выраженность нарушений углеводного обмена во время гестации, то есть потребность в инсулинотерапии (беременность может, рассматривается как пусковой фактор развития СД 1 типа) или манифестацию СД 2 типа после родов.

Причины нарушения углеводного обмена, приводящие к развитию СД разнообразны. Среди них лидирующую позицию занимают генетические дефекты. Одни из них вносят значительный вклад в развитие СД 1 типа (гены HLA системы), другие играют второстепенную роль, создавая генетический фон, способствующий развитию ГСД или СД 2 типа. Так, например, опубликован ряд работ, где выявлена взаимосвязь нарушения углеводного обмена с носительством мутаций в гене HFE [5–8]. Этот ген расположен на хромосоме 6 (6p21.3) и кодирует белок, регулирующий транспорт железа внутрь клеток [9]. В 1996 году Feder J.N. и соавт. описали две миссенс–мутации в HFE гене — C282Y и H63D, — которые приводят к беспрепятственному поступлению железа в клетки и их перегрузке этим ионом, что вызывает деструкцию тканей и целых органов, в том числе и поджелудочной железы [9].

В последнее десятилетие внимание ученых приковано к изучению роли железа в этиологии нарушений углеводного обмена [10, 11]. Особенно это актуально в отношении ГСД, так как, во-первых, физиологические кровопотери в период беременности приостановлены, и не происходит выведения излишков железа из организма женщины. Во-вторых, всем беременным рекомендуется принимать препараты железа при наличии железодефицитной анемии [12]. В случае носительства мутаций в гене HFE прием таких препаратов может приводить к перегрузке железом [7].

Целью данного исследования было определить взаимосвязь мутаций C282Y и H63D с риском развития и степенью тяжести (классами) ГСД у беременных женщин.

Репозиторий БГМУ

Материал и методы

Исследуемую группу составили 65 беременных женщин, имеющих ГСД; белоруски по происхождению. Отбор пациенток и взятие у них образцов крови осуществлялся в отделении патологии беременных УЗ «1-я Городская клиническая больница» г. Минска и РНПЦ «Мать и дитя» г. Минска в период с 2007 по декабрь 2009 гг. Диагноз ГСД был установлен с учетом факторов риска и согласно критериям, используемым в Республике Беларусь [3]. Подробная характеристика выборки пациентов представлена в таблице 1.

На основании результатов гликемического профиля и перорального теста толерантности к глюкозе (ПТТГ) с нагрузкой 75 г глюкозы определены классы ГСД в группе обследованных пациенток. Основную долю (61,5%; n = 40) составили женщины с ГСД класса А1, класс А2 представлен выборкой в 14 человек (21,5%), из них одна женщина получала инсулинотерапию. На долю пациенток с высоким классом (нуждающихся в базис–болюсном режиме инсулинотерапии) ГСД пришлось 11 человек (17%), из них 9 с классом В1 и две — В2.

Выделение геномной ДНК из периферической крови проводили по адаптированному методу Mathew C.C. [13]. Определение мутаций C282Y и H63D в гене HFE осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами на амплификаторе MyCyclerTM Termal cycler (BIORAD). Условия генотипирования и визуализации мутаций гена HFE подробно описаны в ранее опубликованных работах [14, 15].

Таблица 1 — Характеристика беременных женщин с гестационным сахарным диабетом

Фактор риска	Объем выборки (n=65)
Возраст старше 30 лет	31
Избыточный вес, ожирение (ИМТ > 27 кг/м2)	28
Выраженная глюкозурия	12
Кетонурия	13

Репозиторий БГМУ

Сахарный диабет у родственников I степени родства	18
Беременность крупным плодом (макросомия)	7*
Многоводие	6
Невынашивание (выкидыш, неразвивающаяся или внематочная) беременности	11*
Поздний гестоз	28
Артериальная гипертензия и/или другие сердечно-сосудистые заболевания.	31

*показатель известен не для всех пациентов;

диагноз «глюкозурия» установлен при уровне глюкозы в моче более 6,7 ммоль/л; «кетонурия» — при уровне кетоновых тел в моче не менее + (≥ 5,0 ммоль/л).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью специализированного пакета анализа данных Microsoft Excel и программы Statistica 6.0. Частоты C282Y и H63D в группе пациентов сравнивали с показателями встречаемости этих мутаций у населения Республики Беларусь. Контрольные образцы были собраны авторами в ходе популяционных исследований Института генетики и цитологии НАН Беларуси в период с января 2005 г. по май 2006 г [14]. В статистическом анализе использовали критерий $\chi 2$; сравнение малых выборок проводили с помощью алгоритма Фишера–Ирвина [16].

Результаты и обсуждение

Исследование группы пациенток на носительство основных мутаций гена HFE продемонстрировало, что частоты C282Y и H63D в этой выборки статистически не отличаются от показателей, определенных для населения Республики Беларусь ходе широкомасштабного скрининга [14] (таблица 2). Достоверных различий не выявлено также при сравнении частот генотипов риска, к которым относятся гомо- и гетерозиготы. Показатель «отношение шансов» (OR) не дает основания предполагать, что мутации C282Y и H63D связаны с риском развития ГСД. Однако это не отрицает того факта, что носительство мутаций при установленном диагнозе ГСД может усугублять течение основного заболевания.

Репозиторий БГМУ

Таблица 2 — Частоты мутаций C282Y и H63D у пациенток с гестационным сахарным диабетом и группы контроля

Группа	Пациенты, n (%)	Контроль, n (%)	Значение $\chi 2$
Аллель C282Y	3 (2,3)	55 (3,7)	0,35 (p = 0,5)
Аллель N	127 (97,7)	1417 (96,3)	—
Генотип C282Y/C282Y	0 (0,0)	2 (0,3)	—
Генотип C282Y/N	3 (4,6)	51 (6,9)	—
Генотип N/N	62 (95,4)	683 (92,8)	—
OR (95% CI)	0,6 (0,2 – 2,1)		0,3 (p = 0,6)
Аллель H63D	18 (13,8)	242 (15,7)	0,9 (p = 0,7)
Аллель N	112 (86,2)	1300 (84,3)	—
Генотип H63D/H63D	1 (1,5)	21 (2,7)	—
Генотип H63D/N	16 (24,6)	200 (25,9)	—
Генотип N/N	48 (73,8)	550 (71,3)	—
OR (95% CI)	0,9 (0,5 – 1,6)		0,1 (p = 0,8)

Для того, чтобы выявить четкую корреляцию генотипа с тяжестью проявления болезни (класс ГСД), группа пациенток должна быть на 100% однородна. В связи с этим исследуемая группа женщин была разделена на три выборки по тяжести ГСД, что соответствует классам A1, A2 и B (объедены B1 и B2 в общий класс из-за небольшого количества пациенток и из–за общего режима инсулинотерапии) (таблица 3). При их сравнении между собой разницы в частотах мутации C282Y не обнаружено: во всех случаях p > 0,05%. Однако, показатель для H63D достоверно выше у женщин с ГСД класса B нежели у пациенток A1 класса ($\chi 2$ = 5,8; p = 0,02).

Репозиторий БГМУ

Выявлено, что носительство мутации H63D связано со степенью тяжести (класса) ГСД. При вычислении показателя OR по числу носителей генотипов риска в группе беременных женщин с классом В и А1 получено значение 5,1 при $\chi 2 = 4,8$; $p = 0,03$ (таблица 3). Эти показатели позволяют говорить о том, что у беременной женщины, имеющих ГСД класса А1, риск утяжеления класса заболевания до инсулинзависимого (класса В) повышен почти в 5 раз, если эти пациентки является носителями мутации H63D.

Следует отметить, что в исследованной группе беременных женщин только у двух пациенток диагностирована наиболее тяжелая форма ГСД — инсулинозависимый класс В2 (требующий более высокие дозы инсулина для коррекции углеводного обмена), — и обе они оказались гетерозиготными носителями мутации H63D.

Таблица 3 — Частоты мутаций C282Y и H63D у пациенток с гестационным сахарным диабетом разных классов

Выборка	Класс А1, n (%)	Класс А2, n (%)	Класс В,n (%)
Общий объем	40 (61,5)	14 (21,5)	11 (17)
Аллель C282Y	2 (2,5)	1 (3,5)	0 (0,0)
Генотипы риска	2 (5,0)	1 (7,1)	0 (0,0)
Аллель H63D	5 (6,2)	6 (21,4)	7 (31,8)
Генотипы риска*	5 (11,5)	5 (35,7)	7 (63,6)
OR (95% CI)	—	—	5,1 (1,3–17,3)**

* в строке «генотипы риска» суммированы показатели для геторозигот и гомозигот по мутации H63D; ** — значение получено при сравнении генотипов риска класса А1 и В по мутации H63D

Тот факт, что мутация H63D в гене HFE усугубляет клинические проявления нарушения углеводного обмена, отмечен в работах D. K. Mozsulski и соавт. (2001) и С.В. Михайловой и соавт. (2006) [15, 17]. По данным литературы выявлена высокая

Репозиторий БГМУ

частота носителей мутации H63D в группе пациенток с тяжелыми осложнениями СД 2 типа (нефропатия, пролиферативная ретинопатия, нейропатия, перенесенный инсульт) [15]. Показано, что вероятность развития диабетической нефропатии при СД 2 типа, в генотипе которых имеется мутация H63D, возрастает почти в 2 раза по сравнению с пациентами, не несущими эту мутацию [17].

Механизм появления осложнений у H63D-носителей сводится к тому, что железо в избытке накапливается внутри клеток. Ионы железа потенциально опасны, так как легко вступают в реакции, генерирующие свободные радикалы. Последние, в свою очередь, являются сильными окислителями и вызывают повреждение и гибель клеток. Такой процесс имеет место не только в клетках почек, но и сосудов, мышечной ткани сердца, значительно ускоряя развитие сердечно-сосудистых заболеваний у людей с СД [4]. Следует отметить, что в исследуемой нами выборке у 11 из 17 беременных женщин с генотипом риска по H63D (64,6%) поставлен диагноз «позднего гестоза» средней или тяжелой степени. Доля пациенток с ГСД, осложненных поздним гестозом, и не являющихся носителями мутации, почти в 2 раза ниже встречается и составляет 35,4%. Однако, вследствие небольшой численности обеих групп, статистической разницы между этими показателями не достигнуто ($\chi 2 = 3,3$; $p = 0,07$).

Кроме того, что избыток железа оказывает негативное влияние на организм посредством окислительного стресса, он же нарушает экстракцию инсулина из печени, что приводит к развитию периферической гиперинсулинемии [18]. А накопление железа в β-клетках поджелудочной железы значительно ослабляет секрецию инсулина [10]. Такие нарушения углеводного обмена могут иметь место и у пациенток с ГСД, имеющих перегрузку железа в организме вследствие неконтролируемого приема препаратов железа при носительстве мутации в гене HFE. В пользу этого, говорит высокий уровень показателей статуса железа (уровень ферритина, степень насыщения трансферина и др.) в организме беременных женщин с ГСД, продемонстрированный в работе T.T. Lao и соавт. (2001) [5]. Возможно, эти метаболические аномалии и является одним из оснований для развития СД после родов. Согласно проведенным исследованиям у 5–10% женщин, перенесших ГСД, после беременности развивается СД 2 типа (то есть

Репозиторий БГМУ

сразу же после гестации), у остальных (40–60%) он диагностируется в ближайшие 5–10 лет [1, 2]. Более того, по подсчетам датского ученого Damm P. (), у детей, матери которых перенесли ГСД во время беременности, риск развития СД к 20–27 летнему возрасту увеличен в 8 раз [19]. Однако прямых доказательств того, что присутствие мутаций C282Y и H63D в генотипе женщин с ГСД приводит к развитию СД 2 типа после беременности, в настоящее время не получено.

Проведенное исследование позволяет сделать заключение о том, что мутации C282Y и H63D в гене HFE не связаны с риском развития ГСД у белорусских женщин. Но следует корректировать тактику ведения пациенток с ГСД в зависимости от HFE-генотипа беременной. Выявлено, что носительство мутации H63D у женщин, с ГСД класса А1, в 5 раз увеличивает риск утяжеления класса заболевания до класса В, нуждающегося в интенсивном режиме инсулинотерапии.

Литература

1. American Diabetes Association. Gestational of Diabetes Mellitus // Diabetes Care. 2000. Vol. 23, Suppl. 1. P. 77–79.

2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statement) // Diabetes Care. 2009. Vol. 32 (Suppl. 1). P. 62–67.

3. Забаровская, З. В. Скрининг и мониторинг гестационного сахарного диабета / З. В. Забаровская [и др.] // Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний: сб. инструктив.-метод. док. (офиц. изд). 5-й вып. Минск: ГУ РНМБ, 2005. Т. 1–7, Т. 5. С. 68–77.

4. Carpenter, M. W. Gestational diabetes, pregnancy, hypertension and late vascular disease / M. W. Carpenter // Diabetes Care. 2007. Vol. 30, № 2. P. 246–250.

5. Lao, T. T. Gestational diabetes mellitus in the last trimester – a feature of maternal iron excess / T. T. Lao, P. L. Chan, K. F. Tam // Diabet. Med. 2001.Vol. 18, № 3. P. 218–223.

6. Qu, L. HFE genetic variability, body iron stores, and the risk of type 2 diabetes in U.S. women / L. Qu [et al.] // Diabetes. 2005. Vol. 54. P. 3567–3572.

Репозиторий БГМУ

7. Causa, E. Increased C282Y heterosigosity in gestational diabetes / E. Causa [et al.] // Fetal. Diagn. Ther. 2005. Vol. 5, № 5. P. 349–354.

8. Halsall, D. Typical type 2 diabetes mellitus and HFE gene mutations: a population–based case–control study / D. Halsall [et al.] // Hum. Mol. Genetics. 2003. Vol. 12, № 12. P. 1361–1365.

9. Feder, J. N. A novel MHC class I–like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis / J. N. Feder // Nat. Genet. 1996. Vol. 13, № 4. P. 399–408.

10. Fernandes–Real J. M. Cross–talk between iron metabolism and diabetes / J. M. Fernandes–Real, A. Lopes–Bermejo, W. Ricard // Diabetes. 2002. Vol. 51. P. 2348–2354.

11. Swaminathan, S. The role of iron in diabetes and its complications / S. Swaminathan [et al.] // Diabetes Care. 2007. Vol. 30, № 7. P. 1926–1933.

12. Milman, N. Iron requirements and iron balance during pregnancy: is iron supplementation needed for pregnant woman / N. Milman [et al.] // Ugeskr. Laeger. 1997. Vol. 159, № 41. P. 6057–6062.

13. Mathew, C. C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C.C. Mathew // in Walker JMNJ (ed): Methods in Molecular Biology, Clifton: Human Press, 1984. Vol. 2, № 1. P. 31–34.

14. Сивицкая Л. Н. Наследственный гемохроматоз: частота мутаций C282Y и H63D гена HFE в белорусской популяции / Л. Н. Сивицкая, Е. И. Кушнеревич // Молодежь в науке 2007: биологические и медицинские науки. Минск, 2007. Ч. 1. С. 414–418.

15. Михайлова, С. В. Гаплотипический анализ гена HFE в популяциях русских и среди пациентов с мультифакторными заболеваниями / С. В. Михайлова [и др.] // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10, № 3. С. 504–513.

16. Бабич, П. Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия хи–квадрат / П. Н. Бабич, А. В. Чубенко, С. Н. Лапич // Укр. мед. часопис. 2004. № 2. С. 138–144.

17. Moczulski, D. K. Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy / D. K. Moczulski, W. Grzeszczak, B. Gawlik // Diabetes Care. 2001. Vol. 24, № 7. P. 1187–1191.

Репозиторий БГМУ

18. Ferrannini, E. Insulin resistance, iron and liver / E. Ferrannini // Lancet. 2000. Vol. 355. P. 2181–2182.

19. Damm, P. Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus / P. Damm //

Репозиторий БГМУ