

Т. А. Чак¹, Е. А. Павлющук², А. В. Хапалюк¹,
В. Ю. Афонин², В. Н. Сорокина¹

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АЛЬДОЗОРЕДУКТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СЕНСОМОТОРНОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИЕЙ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»²

Исследование включило 181 пациента с сахарным диабетом (СД) 2 типа, у которых был определен генотип полиморфизма С106Т гена альдозоредуктазы и полиморфизма С1167Т гена каталазы. Пациенты обследовались на наличие диабетической периферической сенсомоторной нейропатии с помощью шкал TSS, НДС и электромиографии. Выявлено, что генотип СТ гена альдозоредуктазы ассоциирован с более высокими показателями электромиографии по сенсорным и моторным волокнам. Обнаружена взаимосвязь аллеля С гена альдозоредуктазы с меньшим количеством и интенсивностью жалоб, в то время как у гомозигот с генотипом ТТ интенсивность судорог и онемения выражена сильнее ($p < 0,05$). Ген каталазы в нашем исследовании не был ассоциирован с диабетической сенсомоторной полинейропатией.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, ген альдозоредуктазы, ген каталазы, нейрососудистые осложнения сахарного диабета

**T. A. Chak, E. A. Pavlyushchik, A. V. Khapaliuk,
V. Yu. Afonin, V. N. Sorokina**

ASSOCIATION ALDOSE REDUCTASE AND CATALASE GENE POLYMORPHISMS WITH DIABETIC SENSORIMOTOR POLYNEUROPATHY

181 patients with diabetes mellitus type 2 included in the study. All participants were determined by genotype C106T polymorphism of aldose reductase gene and C1167T polymorphism catalase gene. Patients were examined for diabetic peripheral sensorimotor neuropathy according to TSS, NDS scales and electromyography. Genotype CT aldose reductase gene associated with higher rates of electromyography on sensory and motor fibers was found out. Allele C of aldose reductase gene correlated with a smaller number of complaints and its intensity, whereas TT genotype homozygotes have more expressed cramps and numbness ($p < 0,05$). Catalase gene is not associated with diabetic sensorimotor polyneuropathy in the presented study.

Key words: diabetes mellitus type 2, aldose reductase gene, catalase gene, neurovascular complications of diabetes

В последнее время возрастающая распространенность сахарного диабета (СД) является тревожной реальностью во всем мире. Опасность СД заключается в частом развитии осложнений со стороны различных органов и систем. Диабетическая полинейропатия (ДПН) представляет собой серьезную медико-социальную проблему. Частота ДПН колеблется в очень широких пределах, что, вероятнее всего, обусловлено принципиально разными методами диагностики.

Важным является вопрос о роли свободно-радикального окисления в развитии и прогрессировании поздних осложнений СД [4]. При нормальных условиях в организме сохраняется рав-

новесие между скоростью перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активностью эндогенной антиоксидантной системы (витамины Е, С, В, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионтрансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.), что является одним из основных показателей гомеостаза [1, 10]. Приведенное выше равновесие нарушено у пациентов с СД, соответственно скорость ПОЛ превышает способность антиоксидантной системы гасить избыточное количество свободных радикалов. Инсулинорезистентность, характерная для СД 2 типа, также запускает реакции окислительного стресса, с которым не всегда справляются антиоксидантные системы. След-

□ Оригинальные научные публикации

ствием этого являются сосудистые нарушения, приводящие к развитию нейропатии либо усугубляющие ее степень [1, 4].

В мире ведутся активные исследования по поиску генетических комбинаций либо отдельных генов, способствующих развитию диабетических осложнений. Учитывая вышеописанные механизмы развития осложнений, гены антиоксидантной защиты могут изучаться в качестве генов-кандидатов ДПН.

Ассоциация гена фермента каталазы, инактивирующей образующуюся перекись водорода у пациентов СД и ДПН, исследована только в нескольких работах [2, 9]. Недостаточное количество работ и противоречивость результатов побуждает дальнейший интерес ученых в данной области.

Одним из наиболее активно изучаемых генов-кандидатов осложнений СД, в том числе ДПН, является ген альдозоредуктазы [7]. Альдозоредуктаза является ключевым ферментом патологического полиолового (сорбитолового) пути обмена глюкозы, который активируется в случае гипергликемии. При физиологическом уровне глюкозы в крови образование сорбитола и фруктозы не превышает потребностей тканей и клеток. В условиях гипергликемии при СД метаболизм глюкозы сдвигается в сторону образования сорбитола, который, посредством увеличения осмотического давления в клетке приводит к лизису. Активация полиолового пути обмена глюкозы является одним из механизмов развития диабетических осложнений [5].

Учитывая недостаточный объем и некоторую противоречивость генетических исследований в данной области, мы предприняли наше исследование.

Цель и задачи исследования

Целью работы было исследование ассоциации генов альдозоредуктазы и каталазы с диабетической дистальной периферической сенсорной нейропатией.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Исследовать ассоциативную взаимосвязь полиморфизма С106Т гена альдозоредуктазы с нейропатией.
2. Исследовать ассоциативную взаимосвязь полиморфизма С1167Т гена каталазы с нейропатией.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе Городского эндокринологического диспансера г. Минска и Республиканского госпиталя МВД Респуб-

лики Беларусь. Обследовано 181 пациент с СД 2 типа, среди которых 68% (n = 123) составили мужчины, и 32% (n = 58) – женщины. Критериями исключения из исследования были сопутствующие заболевания, способные вызывать нейропатию: алкоголизм, СПИД, активные формы гепатита, гипотиреоидные и гипертиреоидные состояния, онкологические заболевания в момент исследования или в анамнезе; нарушения психики; возраст старше 65 лет; а также наличие ДПН 3 степени с ампутациями и/или трофическими изменениями нижних конечностей.

В протокол обследования пациентов входил опрос с уточнением анкетных данных, длительности СД и особенностей его течения, наследственности, наличия жалоб. Для количественной оценки жалоб использовалась общая шкала неврологических симптомов (Total Symptoms Score, TSS), которая включает исследование четырех нейропатических симптомов: онемения, жжения, парестезии, боли в конечностях. Проводилась диагностика ДПН. Для этого применялась Шкала нейропатического дисфункционального счета (Neuropathy Disability Score, NDS), используемая для оценки коленного и ахиллова рефлексов, порога вибрационной, температурной, болевой и тактильной чувствительности, а также уровня поражения. Для определения обширности поражения периферических нервов и для разграничения двух основных патоморфологических изменений: аксональной дегенерации и демиелинизации, – у 132 пациентов группы была проведена стимуляционная электромиография (ЭМГ) с помощью 2-канального электронейромиографа «Нейро-ЭМГ-Микро» фирмы Нейрософт (Россия). Оценивались амплитуда М-ответа и скорость распространения возбуждения (СРВ) по n. peroneus, амплитуда потенциала действия и СРВ по n. suralis и n. peroneus superficialis. На основании результатов обследования выставлялся диагноз ДПН, а также определялась степень тяжести нейропатии с использованием классификации по P. Dyck [8].

Учитывая различные нормы показаний ЭМГ, описанные в литературе, а также особенности используемых приборов и методик проведения обследования, для установления диапазона нормальных значений электромиографических показателей данного исследования была набрана отдельная контрольная группа из 35 человек: 68,6% (24 человека) составили женщины, 31,4% (11 человек) – мужчины. Средний возраст группы – $43,5 \pm 9,88$ лет. Обследуемые данной группы не имели неврологических жалоб и диагноза нейропатии любого генеза. Критерием исключения также служили облитерирующий атеросклероз, варикозная болезнь нижних конечностей,

радикулопатии, алкоголизм и другие заболевания, способные приводить к изменениям сенсорных и моторных волокон нервов нижних конечностей.

У обследуемых пациентов проводился однократный забор венозной крови. В лаборатории фармакогенетики Института биоорганической химии НАН Беларуси определяли генотип. Для определения полиморфизмов генов альдозоредуктазы и каталазы пробы венозной крови больных брали в пробирки типа вакутейнера с ЭДТА. Кровь замораживали при -70°C , затем выделяли ДНК с помощью набора «ДНК-сорб-Б» (Амплиценс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ полиморфных маркеров проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа C106T полиморфизма гена ARR1B1 использовались следующие праймеры: прямой праймер F: 5'-CCTTTC TGCCACGCG GGG CGC GGG-3' и обратный праймер R: 5'-CAT GGC TGC TGC GCT CCC CAG-3'. Для анализа C1167T полиморфизма гена CAT использовались следующие праймеры: прямой праймер F: 5'-GCCGCSTTTTGCSTATCCT-3' и обратный праймер R: 5'-TCCCGCCCATCTGCTCCAC-3'. В лаборатории Городского эндокринологического диспансера и Республиканского госпиталя МВД РБ проводили биохимический анализ крови (гликемия, HbA1c, билирубин, АСТ, АЛТ, креатинин, мочевины, холестерин, ЛПНП, триглицериды).

Для анализа генетического влияния на патоклинез СД 2 типа все обследуемые были разделены на три группы в зависимости от полученных генотипов. Группу с генотипом СС гена альдозоредуктазы составили 75 пациентов с СД 2 типа (28% – женщин, 72% – мужчин); группу СТ – 84 пациента (34,5% – женщин, 65,5% – мужчин); группу ТТ – 22 пациента (36,4% – женщин, 64,6% – мужчин). Группу с генотипом СС гена каталазы составили 101 пациент с СД 2 типа (29,7% – женщин, 70,3% – мужчин); группу СТ – 70 пациентов (34,7% – женщин, 65,3% – мужчин); группу ТТ – 9 пациентов (33,3% – женщин, 66,7% – мужчин). В группах проводился сравнительный анализ по степени компенсации диабета, наличию и степени тяжести дистальной нейропатии с учетом данных электромиографии, НДС и TSS, биохимическим показателям крови, гендерным и возрастным характеристикам.

Обработка полученных данных проводилась на персональной ЭВМ с использованием статистических пакетов Excel, Statistica 10.0. Гипотезу о нормальности распределения признаков, характеризующихся количественными значениями, считали подтвержденной, если в интервал $M \pm 2\sigma$ попадало не менее 95% всех значений признаков. При нормальном распределении признака

использовали методы параметрической статистики. Оценку достоверности разности сравниваемых величин проводили на основании величины критерия Стьюдента (t). Если гипотезу о нормальности распределения признака в совокупности отвергали, для обработки данных использовали методы непараметрической статистики – Манна–Уитни (U). Достоверность различия данных, характеризующих качественные признаки в исследуемых группах, определяли на основании величины критерия соответствия (χ^2). Результаты исследования считали достоверными, различия между показателями значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95% ($p < 0,05$) [3].

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ шкалы НДС показал отсутствие статистически достоверных различий в группах пациентов с генотипами СС, СТ и ТТ гена альдозоредуктазы. Однако, имеется тенденция к уменьшению субъективного проявления нейропатии в группе гетерозигот, где НДС составил $6,6 \pm 0,53$ против $7,2 \pm 0,56$ и $7,1 \pm 0,92$ в группах с генотипами СС и ТТ, соответственно, ($p > 0,05$).

При анализе жалоб, предъявляемых пациентами с СД 2 типа, было отмечено увеличение значения TSS в группе генотипом ТТ по сравнению с генотипами СТ и СС гена альдозоредуктазы, но различия не было статистически значимо. При генотипе ТТ отмечалось статистически достоверное увеличение выраженности и частоты онемения нижних конечностей и интенсивности судорог, ($p < 0,05$). Соответственно, наблюдается тенденция к уменьшению жалоб при нейропатии, ассоциированная с аллелем С гена альдозоредуктазы. Сравнительный анализ шкалы TSS и проявления судорог в зависимости от полиморфизма гена альдозоредуктазы отображен в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительный анализ жалоб пациентов с СД 2 типа в зависимости от генотипа по полиморфизму C106T гена альдозоредуктазы

| Показатели | Альдозоредуктаза | | P |
|------------------------|------------------------------|------------------------|-------|
| | Генотипы СС + СТ Me (25–75%) | Генотип ТТ Me (25–75%) | |
| Онемение | 0,0 (0,0–1,0) | 1,17 (0,0–2,33) | 0,047 |
| Судороги интенсивность | 0,0(0,0–6,0) | 5,5 (0,0–8,0) | 0,025 |
| Боль | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–2,0) | >0,05 |
| Жжение | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–1,0) | >0,05 |
| Парестезии | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–1,33) | >0,05 |
| TSS | 1,0 (0,0–4,0) | 2,7 (0,0–4,7) | >0,05 |

Таблица 2. Сравнительный анализ показателей электромиографии в группах с различными генотипами полиморфизма С106Т гена альдозоредуктазы

| Показатель (М ± m) | | Генотип СС (n = 54) | | Генотип СТ (n = 60) | | Генотип ТТ (n = 18) | | |
|---|-------------------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|----------------|---------------------|---------------|---------------|
| | | 1 – Справа | 2 – Слева | 3 – Справа | 4 – Слева | 5 – Справа | 6 – Слева | |
| Амплитуда М-ответа <i>n. peroneus</i> (мВ) (Ме (25%–75%)) | Точки стимуляции <i>n. peroneus</i> | 1 | 2,4 (0,5–5,2) | 3,3 (1,7–5,3)* | 2,8 (1,6–5,3) | 5,3 (2,9–5,4) | 1,2 (0,5–3,7) | 5,3 (1,9–5,4) |
| | | 2 | 4,7 (1,9–5,4) | 3,1 (0,8–5,3) | 3,6 (2,8–5,3) | 3,4 (2,4–5,3)** | 3,1 (0,9–5,3) | 1,9 (0,6–3,2) |
| | | 3 | 3,3 (2,6–5,3) | 4,4 (2,4–5,3) | 4,2 (2,9–5,3) | 5,3 (2,7–5,4) | 4,4 (2,8–5,4) | 3,7 (1,8–5,3) |
| СРВ по <i>n. peroneus</i> (м/с) | | 1–2 | 50,7 ± 0,97 | 46,2 ± 1,43 | 49,5 ± 0,96 | 48,9 ± 1,48 | 49,7 ± 2,58 | 44,4 ± 1,74 |
| | | 2–3 | 48,8 ± 1,18 | 48,8 ± 1,58 | 48,8 ± 0,96 | 49,8 ± 1,5 | 47,4 ± 3,37 | 46,3 ± 2,24 |
| | | 1–3 | 49,8 ± 0,82 | 46,3 ± 0,82 | 49,1 ± 0,77 | 48,6 ± 1,26 | 49,1 ± 2,28 | 45,4 ± 1,44 |
| Амплитуда ПД <i>n. suralis</i> (мкВ) | | 7,5 ± 0,53 | 9,3 ± 0,8*** | 8,4 ± 0,6 | 10,3 ± 0,74*** | 7,3 ± 1,07 | 6,1 ± 0,97 | |
| СРВ по <i>n. suralis</i> (м/с) | | 50,4 ± 1,43**** | 48,4 ± 1,42**** | 54,7 ± 1,56 | 54,3 ± 1,29 | 51,8 ± 2,0 | 54,0 ± 2,2 | |
| Амплитуда ПД по <i>n. peroneus superficialis</i> (мкВ) | | 6,9 ± 0,67 | 7,8 ± 0,74 | 9,1 ± 0,89 | 9,3 ± 0,85 | 6,9 ± 1,28 | 6,8 ± 1,34 | |
| СРВ по <i>n. peroneus superficialis</i> (м/с) | | 52,3 ± 1,39 | 49,6 ± ,99 | 53,8 ± 1,79 | 53,7 ± 1,56 | 50,7 ± 1,82 | 53,0 ± 3,23 | |

Примечание: $p_{2-4}^* < 0,05$; $p_{4-6}^{**} < 0,05$; $p_{2-6,4-6}^{***} < 0,05$; $p_{2-4,2-6}^{****} < 0,05$; $p_{1-3}^{*****} < 0,05$ при сравнении групп с генотипами СС, СТ, ТТ; СРВ – скорость распространения возбуждения; ПД – потенциал действия; 1 – предплюсна; 2 – голень малоберцовой кости; 3 – подколенная ямка; 1–2 – интервал предплюсна-голень малоберцовой кости; 2–3 – голень малоберцовой кости – подколенная ямка; 1–3 – предплюсна – подколенная ямка.

Анализ объективных изменений периферических нервов нижних конечностей был проведен по результатам электромиографии. При сравнении показателей сенсорных нервных волокон отмечалось увеличение амплитуды ПД по *n. suralis* и *n. peroneus superficialis* обеих ног в группе с генотипом СТ, статистически достоверное только по икроножному нерву слева, ($p < 0,05$). У гетерозигот гена альдозоредуктазы имелась тенденция к увеличению СРВ по тем же нервным волокнам, статистически значимая по икроножным нервам обеих ног, ($p < 0,05$). Анализ показателей моторных волокон нервов нижних конечностей выявил увеличение М-ответа *n. peroneus* слева, ($p < 0,05$). По правому *n. peroneus* аналогия сохранялась только для точки стимуляции предплюсна, ($p > 0,05$). СРВ по *n. peroneus* были достоверно выше в группе с генотипом СТ только по *n. peroneus* слева, ($p < 0,05$), в то время как справа не имелось статистических и диагностических различий, ($p > 0,05$). Тем не менее, средние значения электромиографических показателей как сенсорных, так и моторных волокон гетерозигот гена альдозоредуктазы сопоставимы со средними значениями контрольной группы по данным электромиографии. Т. е. большинство пациентов с генотипом СТ по данным электромиографии не имеют признаков нейропатии, в то время как гомозиготы характеризуются в основном более низкими значениями СРВ и амплитуд ПД. Данные электромиографии представлены в таблице 2.

По данным финского исследования полиморфизма С106Т гена альдозоредуктазы у пациентов

с СД 2 типа была показана ассоциация аллеля Т с более низкими амплитудами потенциала действия сенсорных волокон нижних конечностей [6].

При статистическом анализе гематологических и антропометрических показателей пациентов с СД 2 типа в группах с генотипами СС, СТ и ТТ значимых различий не выявлено.

Анализ гена каталазы не показал взаимосвязи с проявлениями дистальной нейропатии у пациентов с СД 2 типа, либо иными лабораторными и клиническими исследованиями. Сравнительная характеристика жалоб у пациентов с различными генотипами полиморфного гена каталазы представлены в таблице 3.

Таблица 3. Сравнительный анализ жалоб пациентов с СД 2 типа в зависимости от генотипа по полиморфизму С1167Т гена каталазы

| Показатели | Каталаза | | | p |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------|
| | Генотип СС Ме (25–75%) | Генотип СТ Ме (25–75%) | Генотип ТТ Ме (25–75%) | |
| онемение | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–1,66) | 0,0 (0,0–2,0) | p > 0,05 |
| судороги интенсивность | 0,0 (0,0–5,0) | 0,0 (0,0–8,0) | 4,0 (0,0–8,0) | |
| боль | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–1,33) | 0,0 (0,0–1,0) | |
| жжение | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–0,0) | 0,0 (0,0–1,0) | |
| парестезии | 0,0 (0,0–1,0) | 0,0 (0,0–1,33) | 1,33 (0,0–2,33) | p = 0,04 |
| TSS | 1,0 (0,0–3,99) | 1,67 (0,0–4,66) | 3,0 (0,0–6,0) | p > 0,05 |
| НДС (М ± m) | 6,9 ± 0,44 | 6,7 ± 0,58 | 7,0 ± 1,61 | |

Оригинальные научные публикации □

Как видно, из таблицы, достоверное различие выявлено только в отношении проявления парестезий в группах с генотипами СС и ТТ. Имеется тенденция к нарастанию жалоб у пациентов с генотипом ТТ, однако статистически не значимая. При сравнительном анализе электромиографических показателей по сенсорным и моторным волокнам нижних конечностей достоверных различий не было выявлено.

Таким образом, гетерозиготы полиморфизма С106Т гена альдозоредуктазы характеризуются меньшими нарушениями показателей электромиографии по сенсорным и моторным волокнам нервов нижних конечностей. Обнаружена взаимосвязь аллеля С гена альдозоредуктазы с меньшим количеством и интенсивностью жалоб, в то время как у гомозигот с генотипом ТТ интенсивность судорог и онемения выражена сильнее ($p < 0,05$). Ген каталазы в нашем исследовании не был ассоциирован с диабетической сенсорной полинейропатией.

Литература

1. Балаболкин, М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М. И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. – № 4. – С. 5–16.
2. Зотова, Е. В. Мутация С1167Т в гене каталазы и развитие нейропатии при сахарном диабете 1 типа /

Е. В. Зотова [и др.] // Сахарный диабет. – 2000. – № 2. – С. 7–8.

3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.

4. Чак, Т. А. Патолофизиология нейрососудистых осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа / Т. А. Чак // Лечебное дело. – 2013. – № 3(31). – С. 65–70.

5. Шестакова, М. В. Определение прогноза развития диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 1 типа на основе молекулярно-генетических исследований / Пособие для врачей // М. В. Шестакова, В. В. Носиков, О. К. Викулова. – М., 2007. – 40 с.

6. Aldose reductase gene polymorphisms and peripheral nerve function in patients with type 2 diabetes / Sivenius K. [et al.] // Diabetes Care. – 2004. – Vol. 27(8). – P. 2021–6.

7. Demaine, A. G. Polymorphisms of the aldose reductase gene and susceptibility to diabetic microvascular complications / A. G. Demaine // Curr Med Chem. – 2003. – Vol. 10(15). – P. 1389–98.

8. Dyck, J. B. Diabetic polyneuropathy / J. B. Dyck, P. J. Dyck // Diabetic Neuropathy / In Dyck P. J., Thomas P. K., editors. – Philadelphia, 1999. – P. 255–78.

9. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus / O. Ukkola [et al.] // J. Intern. Med. – 2001. – Vol. 249(5). – P. 451–9.

10. Lindholm, E. Candidate Genes for Late Diabetic Complications: academic dissertation / E. Lindholm. – Malmö, 2007. – 117 p.

Поступила 11.12.2014 г.