# Ассоциация полиморфизма гена SOD2 и гена SOD3 с диабетической полинейропатией при сахарном диабете типа 1

И.А. Строков, Т.Р. Бурса, Е.В. Зотова, В.В. Носиков, А.С. Аметов

*Кафедра эндокринологии и диабетологии (зав. – проф. А.С. Аметов) РМАПО, Центр ВОЗ по обучению и информатике в области диабета, ГНЦ РФ «ГосНИИ генетика» (дир. – член-корр. РАН В.Г. Дебабов), Москва*

Поздние осложнения сахарного диабета (СД) являются основной причиной ранней инвалидизации и смертности больных. Гипергликемия признана главным пусковым фактором в развитии каскада патологических процессов, приводящих к развитию диабетической полинейропатии (ДПН). Гетерогенность диабетической нейропатии (ДН) нашла отражение в современных теориях патогенеза: метаболической, сосудистой и аутоиммунной. Возможно, для каждой клинической формы ДН существует один ведущий механизм нарушений, но, бесспорно, на начальном этапе процесс имеет универсальный характер [23]. Таким процессом можно считать окислительный стресс, который играет ключевую роль в развитии всех поздних осложнений СД, а при ДПН его патогенетическая роль косвенно подтверждается успешным применением антиоксидантов [8, 10].

Механизм пагубного воздействия окислительного стресса на периферическую нервную систему можно кратко представить следующим образом. Избыток свободных радикалов (O2-, OONO-), образующийся при неферментативном окислении глюкозы, и конечные продукты гликозилирования (окисленные ЛПНП) активируют транскрипционный фактор Nf-kB и митогенактивированную киназу. Эти вещества опосредуют высвобождение фактора некроза опухоли а (ФНОа) и интерлейкин-1b (ИЛ-1b). ФНОа участвует в индукции гипералгезии, вызывает ремоделирование нерва и нарушает синтез фактора роста нервов. Кроме того, транскрипционный фактор Nf-kB участвует в тромбогенной трансформации эндотелия сосудов, кровоснабжающих нервные волокна [1]. Все эти механизмы возникают в тех случаях, когда скорость образования свободных радикалов превышает нейтрализующую способность антиоксидантной системы, к которой относятся супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и др.; фитонутриенты (витамины С и А, токоферолы, тиоктовая и липоевая кислоты и т.д.), секвестранты металлов и другие вещества.

Предположение о влиянии генетических факторов на развитие поздних осложнений СД возникло в связи с тем, что дебют и скорость их прогрессирования не всегда коррелируют со степенью компенсации углеводного обмена и длительностью СД. Кроме того, выявление генетических локусов, предрасполагающих к развитию СД типа 1, с использованием анализа наследования аллелей полиморфных маркеров в ядерных семьях с конкордантными сибсами в популяциях Великобритании, США и России указывает на возможную причастность к развитию патологии генов ферментов антиоксидантной защиты, которые находятся в непосредственной близости от исследованных локусов [7, 12, 18]. К настоящему времени для ряда указанных генов описаны полиморфные участки, ассоциированные с диабетической ретинопатией и нефропатией [2, 3, 5].

Супероксиддисмутаза (СОД) у человека представлена тремя формами. Cu-Zn-СОД кодируется геном SOD1, для которого пока не найден полиморфизм, удобный для ассоциативного анализа. Mn-СОД расположен в митохондриях, зависит от ионов $Mn^{2+}$ и кодируется геном SOD2. Экстрацеллюлярный фермент EC-SOD также зависит от ионов $Mn^{2+}$, кодируется геном SOD3 и расположен на внешней стороне цитоплазматической мембраны [17]. В кодирующем участке гена SOD2 обнаружен однонуклеотидный полиморфизм (остатки Т или С), которому соответствует аминокислотный полиморфизм (остатки аминокислот Ala или Val) в положении 9 сигнального пептида [22]. EC-SOD содержит однонуклеотидный полиморфизм C637G, которому соответствует аминокислотный полиморфизм Arg213Gly.

Эволюционно закрепленная многовариантность (полиморфизм) одного и того же гена может изменять качественные и количественные свойства своего белкового продукта (в данном случае фермента) и проявляться в предрасположенности или устойчивости к определенным заболеваниям.

Целью нашей работы явилось изучение ассоциации полиморфизмов генов SOD2 и SOD3 с ДПН у пациентов с СД типа 1 при наличии и отсутствии ДПН в ходе популяционного исследования.

## Объем и методы исследования

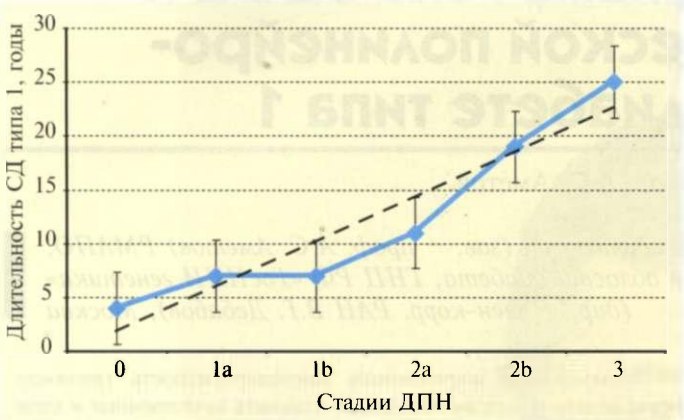
Обследовано 387 пациентов с установленным диагнозом СД типа 1 жителей Москвы и Московской области. Обследование проводилось на одной клинической базе постоянной группой специалистов. Для наиболее точного определения фенотипа осложнения нами использованы критерии, принятые ВОЗ в 1992 г. на конференции по стандартизации диагностики ДПН в Сан-Антонио. Для оценки жалоб использовалась шкала TSS (количественная оценка жалоб за последние сутки), предложенная D. Ziegler, и шкала NSC (нейропатические симптомы и изменения), используемая как опросник, включающий симптомы мышечной слабости, нарушения чувствительности и вегетативные симптомы [9, 25].

Количественная оценка неврологических нарушений при клиническом осмотре проводилась с помощью шкалы NIS-LL (счет нейропатических нарушений в нижних конечностях) [9, 15], которая включала определение мышечной силы, рефлексов, тактильной чувствительности (с помощью 5- и 10- граммового монофиламента), болевой (с помощью укола иглой на тыльной поверхности дистальной фаланги большого пальца), вибрационной чувствительности (с помощью градуированного по восьмибалльной шкале камертона с частотой 128 Гц, с определением среднего значения при троекратном тестировании на тыльной поверхности большого пальца), мышечно-суставного чувства в суставах дистальных фаланг больших пальцев стоп. Исследование температурной чувствительности проводилось инструментом Thioterm (цилиндр с пластмассовым и металлическим наконечниками) на тыльной поверхности больших пальцев обеих стоп. Кожная температура при обследовании – не ниже 32°С.

Электромиографическая оценка состояния периферических нервов проводилась с помощью стимуляционной электромиографии (ЭМГ) на аппарате «Нейроэлектромиограф 2» фирмы МБН (Россия) с исследованием следующих показателей: n. peroneus – амплитуда М-ответа, скорость распространения возбуждения (СРВ) на голени, резидуальная латентность (РЛ), пороговые величины; n. suralis (антидромная стимуляция) – амплитуда потенциала действия (ПД), СРВ на голени, пороговые величины. Кожная температура при проведении ЭМГ – не ниже 32°С.

Для диагностики автономных нарушений применялось количественное автономное тестирование (вариабельность сердечного ритма при глубоком дыхании) на аппарате «Case IV» (фирма Medical Electronics, США) и ортостатическая проба (измерение АД в положении лежа и после вставания на 2, 6 и 8-й минутах).

Клинически значимым является наличие одной из жалоб по шкале TSS или 2 и более жалоб по шкале NSC. Наличие неврологических нарушений фиксировалось при значении NIS-LL ≥2 баллов, при этом снижение тактильной чувствительности определялось при отсутствии ощущения прикосновения 5-граммовым монофиламентом, а отсутствие – 10-граммовым монофиламентом; вибрационная чувствительность расценивалась как сниженная при среднем значении менее 6 баллов у детей и взрослых моложе 50 лет и менее 5 баллов у лиц старше 50 лет.




**Зависимость стадии ДПН от длительности СД типа 1.**

При проведении ЭМГ нормальными считались следующие значения: n. peroneus – амплитуда М-ответа ⩾2,5 мВ, РЛ <3,0 м/с, СРВ ⩾40 м/с; n. suralis – амплитуда ПД (пик – пик) >6 мкВ, СРВ >40 м/с [4].

Нарушения при количественном автономном тестировании определялись при значениях ⩽1 перцентили. Ортостатическая проба расценивалась как патологическая при падении систолического АД более чем на 30 мм рт.ст.

При определении стадии ДПН использовались критерии, предложенные P. Dyck и соавт. [14], согласно которым ДПН разделяется на: ДПН 0 – полинейропатия отсутствует; ДПН 1а – субклиническая полинейропатия (нарушения выявлены при электромиографическом обследовании или в ходе количественного автономного тестирования); ДПН 1b – критерии для ДПН 1а плюс нарушения при неврологическом осмотре; ДПН 2а – критерии для стадии ДПН 1b плюс наличие нейропатических жалоб. При этом парез тыльных сгибателей стопы менее 50% (пациент может ходить на пятках); ДПН 2b – выраженная полинейропатия. Нарушения при инструментальных методах исследования, неврологическом осмотре, наличие нейропатических жалоб и парез тыльных сгибателей стопы более 50% (пациент не может ходить на пятках), ДПН 3 – инвалидизирующая полинейропатия (наличие у больного комплекса сенсорных, моторных и автономных нарушений, являющихся причиной нетрудоспособности).

Из числа обследованных были сформированы 2 группы сравнения («случай» – «контроль») с использованием принципа «полярных» (не перекрывающихся) фенотипов для уменьшения маскирующего влияния такого мощного фактора риска как длительность СД [6]. В группу «случай» (ДПН+) вошли больные с ранней ДПН (длительность СД < 5 лет), имеющие субклиническую или клиническую стадии заболевания, а в группу «контроль» (ДПН-) – пациенты с длительностью СД более 10 лет и отсутствием ДПН. В сформированных таким образом группах «случай» (n= 46) и «контроль» (n= 51) проведено определение аллелей полиморфного маркера Ala(-9)Val гена SOD2 и полиморфного маркера Arg213Gly гена SOD3. Выделение геномной ДНК из венозной крови осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Амплификацию полиморфного участка ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ биотехнология», Россия). Аллели и генотипы идентифицировали после электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 12% полиакриламидном геле и окраски серебром [19].

О статистической значимости различий клинико-лабораторных данных в сформированных группах судили по точному однолинейному критерию Фишера и t-критерию для независимых выборок. Различия в частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов в сравниваемых группах определяли с помощью критерия $\chi^2$. Статистически значимыми считали различия при p<0,05. Статистический анализ проводился с помощью программы «Statistica», версия 6,0 компании StatSoft (США).

Количественные данные в тексте и таблицах представлены в виде Me – медианы и интерквартильного диапазона. Первая цифра в скобках – значение 25 процентили, вторая цифра – 75 процентили.

## Результаты и их обсуждение

Для определения точки разделения групп по наличию и отсутствию ДПН был проведен анализ зависимости стадии ДПН от длительности СД в общей группе пациентов (см. рисунок). Как видно, эта зависимость имеет характер близкий к линейному. В исследованной популяции отсутствие ДПН определяется при средней длительности СД 4 года [1, 5, 10]. Это позволило нам заключить, что появление признаков ДПН у пациентов с длительностью СД менее 5 лет можно считать ранним развитием ДПН относительно популяции и включить их в группу «случай». Появление субклинических признаков осложнения наблюдается при средней длительности 7 лет [2, 10], а наличие клинических симптомов (2а стадия ДПН) при средней длительности СД 11 лет [7, 16]. В дальнейшем при увеличении длительности СД тяжесть ДПН прогрессивно увеличивается. Таким образом, пациенты с длительностью СД более 10 лет при отсутствии признаков ДПН были включены в группу «контроль».

Выбор клинико-лабораторных показателей для сравнения двух групп был основан на исследованных к настоящему времени факторах риска развития ДПН [13]. Такой мощный фактор риска ДПН как длительность СД был нивелирован, а влияние других известных факторов можно считать незначительным. В изучаемых группах не выявлено статистически значимых различий по соотношению дети/взрослые, наличию артериальной гипертензии, курению, по уровню HbA1c, показателям общего холестерина, триглицеридов и β-липопротеинов (табл. 1).

Различие по возрастному критерию можно объяснить принципом формирования групп и включением в соответствии с требованиями популяционного исследования пациентов детского возраста. В этой же связи мы не проводили сравнение по показателю роста, поскольку у детей этот показатель имеет динамичный характер.

Сравнение частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера Ala(-9)Val показало статистически значимое преобладание аллеля Val (p=0,03) и генотипа Val/Val (p=0,02) в группе пациентов с ранней ДПН, в отличие от пациентов без признаков ДПН и длительностью СД более 10 лет, у которых преобладал аллель Ala и генотип Ala/Ala (табл. 2).

Это согласуется с рядом исследований, по данным которых замена аминокислоты Ala на Val в гене SOD2 приводит к нарушениям в механизме доставки этого фермента внутрь митохондрий, его относительному дефициту в органеллах и, как следствие, снижению ферментативной активности [16, 22].

При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg213Gly гена SOD3 выявлено увеличение частоты встречаемости аллеля Arg и генотипа Arg/Arg в группе пациентов с ранней ДПН (p=0,02 и 0,004 соответственно). В группе

*Таблица 1*

**Характеристика обследованных больных СД типа 1 с наличием (ДПН +) и отсутствием (ДПН -) ДПН**

| Показатель | ДПН + (n = 46) | ДПН - (n = 51) | p |
|---|---|---|---|
| Возраст, годы | 23 (20; 46) | 31 (14; 27) | <0,05* |
| Дети/взрослые (абс.) | 10/36 | 5/46 | нз |
| Артериальная гипертензия, % | 19,5 | 23,3 | нз |
| Курение, % | 2,5 | 3,2 | нз |
| Уровень Hb A1c, % | 9,3 (8,1; 11,5) | 8,1 (7,2; 10,5) | нз |
| Общий холестерин, ммоль/л | 4,5 (3,9; 5,0) | 4,7 (4,2; 5,3) | нз |
| Триглицериды, ммоль/л | 0,9 (0,7; 1,4) | 1,1 (0,6; 2,6) | нз |
| β-липопротеины, г/л | 3,5 (2,9; 4,3) | 4,2 (3; 5,2) | нз |

Количественные данные представлены в виде Me – медианы и процентилей. Первая цифра в скобках – значение 25 процентили, вторая цифра – 75 процентили; нз – отличия статистически незначимы; * – t-критерий для независимых выборок

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера Ala(-9)Val гена SOD2 в группах больных СД типа 1 с наличием (ДПН+) и отсутствием (ДПН-) ДПН

| Генетический маркер | Число аллелей и генотипов | | $\chi^2$ | p |
|---|---|---|---|---|
| | ДПН+ (n=46) | ДПН- (n=51) | | |
| Аллель Ala | 35 | 47 | 4,78 | 0,03 |
| Аллель Val | 11 | 4 | 4,78 | 0,03 |
| Генотип Ala/Ala | 5 | 15 | 12,8 | 0,02 |
| Генотип Ala/Val | 25 | 32 | 12,8 | 0,02 |
| Генотип Val/Val | 16 | 4 | 12,8 | 0,02 |

Здесь и в табл. 3 различия между группами достоверны при $p<0,05$.

Таблица 3

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg213Gly гена SOD3 в группах больных СД типа 1 с наличием (ДПН+) и отсутствием (ДПН-) ДПН

| Генетический маркер | Число аллелей и генотипов | | $\chi^2$ | p |
|---|---|---|---|---|
| | ДПН+ (n=46) | ДПН- (n=51) | | |
| Аллель Arg | 45 | 43 | 5,25 | 0,02 |
| Аллель Gly | 1 | 8 | 5,25 | 0,02 |
| Генотип Arg/Arg | 19 | 8 | 11,02 | 0,004 |
| Генотип Arg/Gly | 26 | 35 | 11,02 | 0,004 |
| Генотип Gly/Gly | 1 | 8 | 11,02 | 0,004 |

сравнения статистически значимо преобладал аллель Gly и генотип Gly/Gly (табл. 3).

Полученные результаты совпадают с данными исследований, согласно которым носители генотипа Arg/Arg обладают менее эффективной системой антиоксидантной защиты [20, 24]. Результаты предшествующих исследований показали, что остаток Arg или Gly в положении 213 определяет концентрацию фермента на внешней поверхности эндотелиальных клеток. Это связано с тем, что полиморфная аминокислота расположена в домене, который отвечает за связывание фермента с гепарансульфатпротеогликанами. Таким образом, около 99% внеклеточной СОД, содержащей остаток Arg в положении 213, связано с гепарансульфатпротеогликанами и находится на поверхности клеточных мембран [21]. Фермент, содержащий остаток Gly в положении 213, напротив, имеет низкое сродство к гепарансульфатпротеогликанам, поэтому основное его количество находится в кровотоке. Полученные нами данные подтверждают, что несвязанная форма фермента обладает большей антиоксидантной активностью и носители генотипа Gly/Gly гена SOD3 лучше защищены от воздействия окислительного стресса.

## Выводы

1. Полиморфизм Ala(-9)Val гена SOD2 и полиморфизм Arg213Gly гена SOD3 ассоциированы с развитием ДПН у пациентов с СД типа 1, что подтверждает наличие генетических факторов в развитии осложнения.

2. Ассоциация полиморфизмов генов супероксиддисмутаз с развитием ранней ДПН при СД типа 1 свидетельствует об инициирующей роли окислительного стресса в патогенезе данного осложнения.

3. Аллель Ala полиморфного маркера гена SOD2 и генотип Ala/Ala определяют бóльшую устойчивость к раннему развитию ДПН, чем аллель Val и генотип Val/Val у пациентов с СД типа 1.

4. Носители аллеля Gly полиморфного маркера гена SOD3 и генотипа Gly/Gly лучше защищены от воздействия окислительного стресса и раннего развития ДПН, чем носители аллеля Arg и генотипа Arg/Arg при СД типа 1.

## Литература


1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. // Пробл. эндокринол. – 2000. – Т. 46.- № 6. – С. 29 – 34.
2. Булатова О.С., Кондратьев Я.Ю., Миленькая Т.М. и др. // Пробл. эндокринол. – 1999. – Т. 45.- № 4. – С. 3 – 7.
3. Воронько О.Е., Чистяков Д.А., Савостьянов К.В. и др. // Пробл. эндокринол. – 2001. – Т. 47.- № 3. – С. 15 – 18.
4. Команцев В.Н., Заболотных В.А. Методические основы клинической электронейромиографии. Руководство для врачей. – С-Петербург, 2001.
5. Кондратьев Я.Ю., Чугунова Л.А., Шамхалова М.Ш. и др. // Пробл. эндокринол. – 1998. – Т. 44.- № 4. – С. 12 – 15.
6. Кондратьев Я.Ю., Шестакова М.В., Чугунова Л.А. и др. // Сахарный диабет. – 1998. – № 1. – С. 22 – 24.
7. Носиков В.В., Серегин Ю.А., Титович Е.В. и др. // Пробл. эндокринол. – 2002. – Т. 48.- № 4. – С. 10 – 13.
8. Северина Т.А., Тарасов А.В., Трельская Н.Ю. и др. // Пробл. эндокринол. – 2002. – Т. 48.- № 1. – С. 18 – 21.
9. Строков И. А., Новосадова М. В., Баринов А. Н., Яхно Н.Н // Неврологический журнал. – 2000. – Т. 5.- № 5. – С. 14 – 18.
10. Строков И.А., Козлова Н.А., Мозолевский Ю.В. и др. // Журн. Невропл. и психиатр. – 1999. – Т. 99. – № 6. – С. 18-22.
11. Budowle B., Baechtel F.S. // Appl. Electrophor. – 1990. – N. 1. – P. 181-187.
12. Concannon P., Gogolin-Ewens K.J., Hinds D.A et al. // Nature Genet. – 1998. – Vol. 19. – P. 292-296.
13. Diabetic Neuropathy / Melton J. L., Dyck P.J. – Philadelphia, WB Saunders – 1999.
14. Diabetic Neuropathy /Dyck J.B., Dyck P.J. – Philadelphia, WB Saunders – 1999.
15. Dyck P. J., Melton J.L., O'Brien et al. // Diabetes. – 1997. – Vol. 46 (Suppl. 2 ). – P. 5 – 8.
16. Hiroi S., Harada H., Nishi H. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – N. 261. – P. 332-339.
17. Marklund // Methods Enzymol. – 1990. – N. 186. – P. 260-265.
18. Mein C.A., Esposito L., Dunn M.G. et al. // Nature Genet. – 1998. – Vol. 19. – P. 297-300.
19. Sajantilla A., Budowle B., Strom M. et al. // Am. J. Hum. Genet. – 1992. – N. 50 – P. 816-825.
20. Sakashita N., Anda Y., Marlund S.L. et al. // Hum. Pathol. – 1994. – N. 29 – P. 1169-1172.
21. Sandstrom J., Nilsson P., Karlsson K. et al. // J. Biol. Chem. – 1994. – N. 269 – P. 19163-19166.
22. Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H., Kobayashi T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – N. 226. – P. 561-565.
23. Vinik A.I.,Park T.S.,Stansberry K.B. et al. // Diabetologia. – 2000. – Vol. 43. – P. 957-973.
24. Wang X.L., Adachi T., Sim A.S. et al. // Arteroiscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – N. 18 – P. 1915-1921.
25. Ziegler D. et al. // Diabetologia. – 1995. – Vol. 38 – P. 1425 – 1433.