

*Л. Н. Сивицкая<sup>1</sup>, Н. Г. Даниленко<sup>1</sup>, З.В. Забаровская<sup>2</sup>, О. Г. Давыденко<sup>1</sup>*

## **Роль мутаций HFE гена в развитии Гестационного сахарного диабета**

*<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси*

*<sup>2</sup> 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 С.С. Определение мутаций C282Y и H63D в гене HFE осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами на амплификаторе MyCycler™ Thermal 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 В нежели у пациенток А1 ( $\chi^2 = 5,8; p = 0,02$ ). 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 А1 до В 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

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.

## 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 С.С. [13]. Определение мутаций С282У и Н63Д в гене HFE осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами на амплификаторе MyCycler™ Thermal 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<br>( $n=65$ ) |
|--|-----------------------------|
| Возраст старше 30 лет                                  | 31                          |
| Избыточный вес, ожирение (ИМТ > 27 кг/м <sup>2</sup> ) | 28                          |
| Выраженная глюкозурия                                  | 12                          |
| Кетонурия  | 13                          |

|  |     |
|--|-----|
| 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 «гликозурия» установлен при уровне глюкозы в моче более 6,7 ммоль/л; «кетонурия» — при уровне кетоновых тел в моче не менее + ( $\geq$  5,0 ммоль/л).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью специализированного пакета анализа данных Microsoft Excel и программы Statistica 6.0. Частоты С282У и Н63D 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 С282У и Н63D в этой выборки статистически не отличаются от показателей, определенных для населения Республики Беларусь в 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 С282У и Н63D связаны с риском развития ГСД. Однако это не отрицает того факта, что носительство мутаций при установленном диагнозе ГСД может усугублять течение основного заболевания.

Таблица 2 — Частоты мутаций С282У и Н63D у пациенток с гестационным сахарным диабетом и группы контроля

| Группа              | Пациенты, n (%) | Контроль, n (%) | Значение $\chi^2$ |
|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Аллель С282У        | 3 (2,3)         | 55 (3,7)        | 0,35 (p = 0,5)    |
| Аллель N            | 127 (97,7)      | 1417 (96,3)     | —                 |
| Генотип С282У/С282У | 0 (0,0)         | 2 (0,3)         | —                 |
| Генотип С282У/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 Н63D         | 18 (13,8)       | 242 (15,7)      | 0,9 (p = 0,7)     |
| Аллель N            | 112 (86,2)      | 1300 (84,3)     | —                 |
| Генотип Н63D/Н63D   | 1 (1,5)         | 21 (2,7)        | —                 |
| Генотип Н63D/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 А1, А2 и В (объединены В1 и В2 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 С282У не обнаружено: во всех случаях  $p > 0,05\%$ . Однако, показатель для Н63D достоверно выше у женщин с ГСД класса В нежели у пациенток А1 класса ( $\chi^2 = 5,8$ ;  $p = 0,02$ ).

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 являются 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 гетерозигот 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

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  $\beta$ -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 Т.Т. Лао 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

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 С282У и Н63D 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 С282У и Н63D 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 Н63D 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.



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 JMNIJ (ed): *Methods in Molecular Biology*, Clifton: Human Press, 1984. Vol. 2, № 1. P. 31–34.
14. Сивицкая Л. Н. Наследственный гемохроматоз: частота мутаций С282У и Н63D 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. Лاپич // *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.

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 //