

На правах рукописи

БЕЛОУСОВА Оксана Николаевна

**Клинико-генетическое исследование больных
сахарным диабетом 2 типа**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Белгород – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

Чурносов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Иванов Владимир Петрович, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии

Щипков Валерий Петрович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации, и.о. заведующего кафедрой биологии и общей генетики

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2013 года в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Автореферат разослан «___»_____2013 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13
доктор биологических наук

В.И.Кочкаров

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Сахарный диабет 2 типа (СД2) - самое распространенное эндокринное заболевание, которое представляет собой одну из острейших медико-социальных проблем, так как ведет к ранней инвалидизации и повышению смертности среди населения вследствие развития различных осложнений (Yamauchi T. et al., 2003; Alsema M. et al., 2007; Colagiuri S. et al., 2009; Hemmingsen B. et al., 2011; Шестакова М.В. и др., 2001; Якунина Н.Ю. и др., 2007; Дедов И.И. и др., 2011). В настоящее время более 285 млн человек в мире страдают сахарным диабетом, в 90% случаев это сахарный диабет 2-го типа. В России более 3 млн человек больны сахарным диабетом, из них 2,8 млн – сахарным диабетом 2-го типа. Согласно прогнозам ВОЗ к 2025 году количество больных диабетом в мире вырастет до 435 млн человек (Dinarello C.A. et al., 2010; Майоров А.Ю. и др., 2008; Дедов И.И. и др., 2010; Vistisen D. et al., 2011). По частоте инвалидизации и смертности сахарный диабет стоит на 3 месте после сердечно-сосудистых заболеваний и онкопатологии. В Российской Федерации данное заболевание включено в Федеральную целевую программу «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007-2011 гг.)» (Постановление Правительства РФ от 10.05.07 № 280). Сахарный диабет 2-го типа считают «неинфекционной эпидемией» (Дедов М.В., 2011).

СД2 относят к мультифакториальным заболеваниям (Чистяков Д.А. и др., 2010; Burgdorf K.S. et al., 2011; Ellervik C. et al., 2011). Согласно литературным данным роль генетических факторов в развитии СД 2 составляет 60-80% (Симбирцев А.С. и др., 2005; Носиков В.В. и др., 2008). Научные исследования последних лет показали, что важное значение в развитии СД2 играют цитокины (Wisse B.E. et al., 2004; Verstrepen L. et al., 2008; Bradley J.R. et al., 2008), которые способствуют развитию инсулинорезистентности, причем одними из ключевых медиаторов ее развития являются факторы некроза опухоли (Densem C. G. et al., 2002; Liu D.M. et al., 2004; Trujillo M.E. et al., 2005; Wang M. et al., 2010). Обладая множеством медико-биологических эффектов (оказывают иммуномодулирующее, цитотоксическое и провоспалительное действие, стимулируют липолиз, активируют систему гемостаза, индуцируют апоптоз и др.) факторы некроза опухоли могут влиять на развитие и прогрессирование сахарного диабета 2 типа (Parvin H. et al., 2001; Rosen E.D. et al., 2002; Vincent A.M. et al., 2002; Chen G. Et al., 2002; Joseph N.A. et al., 2004; Goldstein B.J. et al., 2005; Argoff C.E. et al., 2006; Benedicte F.V. et al., 2007).

С молекулярно-генетических позиций сахарный диабет 2-го типа изучен недостаточно. Подавляющее число работ по исследованию роли различных генов-кандидатов в формировании СД2 и его осложнений проведено за рубежом (Chen G. et al., 2002; Wisse B.E. et al., 2004; Verstrepen L. et al., 2008; Bradley J.R., 2008; Rung J. et al., 2009; Boraska et al., 2010). В Российской Федерации лишь несколько работ посвящено молекулярно-генетическим аспектам сахарного диабета 2-го типа (Яценко И.А., 2004; Кондратова Н.В.

2005; Хабарова О.Ю. и др., 2007; Майоров А.Ю., 2009; Потапов В.А. и др., 2010; Никитин А.Г., 2010; Коненков В.И. и др., 2012;). Роль полиморфных маркеров генов факторов некроза опухоли и их рецепторов в отношении сахарного диабета 2-го типа в нашей стране мало изучена, что диктует необходимость проведения данных исследований в Российской Федерации.

Цель: Изучить вовлеченность генетических полиморфизмов факторов некроза опухоли и их рецепторов в формирование и клиническое течение сахарного диабета 2-го типа.

Задачи:

1) Изучить распространенность полиморфных вариантов генов фактора некроза опухоли α ($-308G/A$ *TNF α*), лимфотоксина α ($+250A/G$ *Lta*), рецепторов фактора некроза опухоли 1-го ($+36A/G$ *TNFR1*) и 2-го ($+1663A/G$ *TNFR2*) типов у больных сахарным диабетом 2-го типа и в популяционной выборке.

2) Рассмотреть роль молекулярно-генетических маркеров и их комбинаций в формировании СД2.

3) Проанализировать ассоциации генов-кандидатов с клиническими особенностями СД2.

4) Исследовать влияние генетических полиморфизмов на развитие осложнений сахарного диабета 2-го типа.

5) Оценить связи генетических вариантов факторов некроза опухоли и их рецепторов с клинико-лабораторным статусом больных сахарным диабетом 2-го типа.

Научная новизна. Впервые выявлено важное клиническое значение полиморфных локусов факторов некроза опухоли ($-308G/A$ *TNF α* , $+250A/G$ *Lta*) и их рецепторов ($+36A/G$ *TNFR1*, $+1663A/G$ *TNFR2*) при сахарном диабете 2-го типа среди русского населения Центрального Черноземья России. Установлены генетические факторы подверженности к сахарному диабету 2-го типа, определены межгенные сочетания, ассоциированные с формированием СД2. Выявлены молекулярно-генетические маркеры неблагоприятного клинического течения заболевания и развития его осложнений.

Научно-практическое значение. Результаты проведенного исследования расширяют представления о молекулярно-генетических детерминантах сахарного диабета 2-го типа. Установленные в исследовании генетические варианты цитокинов, ассоциированные с повышенным уровнем гликированного гемоглобина, глюкозурией, развитием ангиопатии нижних конечностей у больных СД2 могут быть использованы в работе эндокринологических стационаров для выявления среди больных группы риска неблагоприятного клинического течения заболевания, развития осложнений. Результаты работы используются в учебном процессе в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» и в практической деятельности Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: Третьей международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения-2010» (Белгород, 2010), 5 Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2010), Международной научно-практической конференции «Современный взгляд на болезни внутренних органов и полиморбидность» (Белгород, 2011), XIV Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей с международным участием «Фундаментальная наука и клиническая медицина-человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2011), VI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2011), Итоговой научной конференции сотрудников Курского государственного медицинского университета, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2011), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (Курск, 2011), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Алмазовские чтения 2011» (Санкт-Петербург, 2011), 76-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: «Молодежная наука и современность» (Курск, 2011), VII Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2012), V Юбилейной международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения-2012» (Белгород, 2012), 66-й Итоговой научной конференции молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета (Ростов-на-Дону, 2012).

Личный вклад автора. Автором лично определены цели и задачи исследования, разработаны методические подходы для их решения, проведено клиническое обследование всех больных сахарным диабетом 2-го типа. Автор лично принимал участие в выполнении молекулярно-генетических исследований, проводил обработку, анализ и обобщение полученных результатов, апробацию результатов исследования, подготовку основных публикаций по выполненной работе, написание и оформление рукописи.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 в журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Генетические полиморфизмы $+250A/G$ *Lta*, $-308G/A$ *TNFA*, $+36A/G$ *TNFR1* и $+1663A/G$ *TNFR2* определяют риск формирования сахарного диабета 2 типа.

2. Молекулярно-генетические маркеры ассоциированы с клиническими особенностями сахарного диабета 2-го типа и развитием его осложнений.

3. Клинико-лабораторный статус больных СД2 связан с генетическими вариантами факторов некроза опухолей и их рецепторов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации, список литературы и приложения.

Материалы диссертации изложены на 141 странице машинописного текста и содержат 22 таблицы и 37 рисунков. Библиографический указатель содержит 235 наименований, из которых 148 иностранных.

Материалы и методы исследования

Клиническая характеристика исследованных больных

Группу исследования составили 544 человека: 236 больных сахарным диабетом 2 типа и 308 человек популяционного контроля. В нее включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой. Среди 236 больных сахарным диабетом 2 типа мужчин было 64 человека (27,12%), женщин- 172 (72,88%). В популяционной выборке (n=308) распределение по полу было аналогичным: мужчины- 82 человека (26,62%), женщины- 226 (73,38%) (p>0,05). Средний возраст больных составил 57,85±6,11 лет (варьировал от 37 до 76 лет), популяционной выборки- 60,20±6,28 лет (варьировал от 31 до 79 лет) (p>0,05).

Клинико-лабораторное обследование пациентов проводилось на базе эндокринологического отделения Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Среди клинических признаков СД2 изучены: возраст манифестации заболевания, степень тяжести и характер компенсации сахарного диабета 2-го типа, наличие инсулинопотребности и эффективность терапии, развитие осложнений. Нами были рассмотрены клинико-лабораторные показатели, патогенетически значимые для СД2.

Всем больным СД2 и индивидуумам популяционного контроля проводилось типирование четырех молекулярно-генетических маркеров: диаллельные локусы генов факторов некроза опухоли α (-308G/A *TNFA*), лимфотоксина α (+250A/G *Lta*), рецептора фактора некроза опухоли первого типа (+36A/G *TNFR1*), рецептора фактора некроза опухоли второго типа (+1663A/G *TNFR2*). Генотипирование осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Молекулярно-генетические методы

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 4-5 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (pH=8.0).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1985). Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась на амплификаторе с флюоресцентной

детекцией IQ5 (Bio-Rad) с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М», олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Синтол».

Генотипирование ДНК-маркеров осуществлялось методом дискриминации аллелей с использованием Tag Man зондов и программного обеспечения - Standart Edition Version 2,0 (Bio-Rad).

Статистические методы

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программы «STATISTICA 6.0». Определение фенотипических и генных частот проводили стандартными методами (Животовский Л. А., 1983). Для оценки соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использовали критерий χ^2 (Вейр Б., 1995).

Ассоциации молекулярно-генетических маркеров с предрасположенностью к сахарному диабету 2 типа, а также с клиническими особенностями течения заболевания, развитием осложнений оценивали с помощью таблиц сопряженности 2x2 с расчетом критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI) (Schlesselman J., 1982). Анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов с СД2 проведен с помощью программного обеспечения APSampler (<http://sources.redhat.com/cygwin/>), использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику (Favogov A. V., et al., 2005). Оценку уровня статистической значимости полученных результатов проводили с использованием поправки Бонферрони (Реброва О. Ю., 2006).

При изучении связей генетических полиморфизмов с патогенетически значимыми количественными признаками СД2 в начале оценивали характер распределения исследуемых признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка (Реброва О. Ю., 2006). Получено, что распределение всех исследуемых количественных признаков (клинико-лабораторные и др. показатели) не соответствовало закону нормального распределения и поэтому для их описания применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а для сравнительного анализа - критерий Манна-Уитни (Реброва О. Ю., 2006).

Результаты исследования и их обсуждение

1. Исследование роли генетических полиморфизмов факторов некроза опухолей и их рецепторов в формировании сахарного диабета 2 типа

Изучение частот генотипов изучаемых генетических маркеров (табл.1) показало, что для всех рассмотренных локусов в популяционной выборке и в группе больных СД2 эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Распределение полиморфных маркеров генов факторов некроза опухоли и их рецепторов у больных СД2 и в контрольной группе

Локусы	Аллели, генотипы, генетическое разнообразие	Больные СД 2 (n=236)		Контрольная группа (n=308)		OR (95% CI) χ^2 ; p
		n	%	n	%	
+250A/G Lta	+250 A	341	72,25	473	77,04	0,77 (0,58-1,03) $\chi^2=3,01$; p=0,08
	+250 G	131	27,75	141	22,96	1,29 (0,97-1,74) $\chi^2=3,01$; p=0,08
	+250 AA	129	54,66	180	58,63	0,85 (0,59-1,81) $\chi^2=0,70$; p=0,40
	+250 AG	83	35,16	113	36,80	0,93 (0,64-1,34) $\chi^2=0,09$; p=0,76
	+250 GG	24	10,18	14	4,57	2,36 (1,14-4,95) $\chi^2=5,61$; p=0,01
	H ₀ (H _E)	0,35 (0,40)		0,36 (0,35)		
-308G/A TNFα	-308 G	405	85,81	539	88,94	0,75 (0,91-1,94) $\chi^2=2,12$; p=0,14
	-308 A	67	14,19	67	11,06	1,33 (0,51-1,09) $\chi^2=2,12$; p=0,14
	-308 GG	176	74,57	242	79,87	0,73 (0,48-1,13) $\chi^2=1,84$; p=0,17
	-308 AG	53	22,45	55	18,15	1,30 (0,83-2,05) $\chi^2=1,27$; p=0,25
	-308 AA	7	2,98	6	1,98	1,51 (0,45-5,15) $\chi^2=0,20$; p=0,64
	H ₀ (H _E)	0,22 (0,24)		0,18 (0,19)		
+36A/G TNFR1	+36 G	237	50,42	318	51,62	0,94 (0,73-1,21) $\chi^2=0,16$; p=0,68
	+36 A	235	49,58	298	48,38	1,05 (0,82-1,35) $\chi^2=0,16$; p=0,68
	+36 GG	66	27,96	76	24,68	1,18 (0,79-1,77) $\chi^2=0,58$; p=0,44
	+36 AG	106	44,91	166	53,89	0,69 (0,48-0,99) $\chi^2=3,95$; p=0,04
	+36 AA	64	27,13	66	21,43	1,36 (0,90-2,06) $\chi^2=2,07$; p=0,15
	H ₀ (H _E)	0,44 (0,50)		0,53 (0,49)		
+1663A/G TNFR2	+1663 G	272	57,63	341	55,74	1,07 (0,83-1,37) $\chi^2=0,25$; p=0,61
	+1663 A	200	42,37	269	44,26	0,93 (0,72-1,19) $\chi^2=0,25$; p=0,61
	+1663 GG	81	34,32	101	33,12	1,05 (0,72-1,53) $\chi^2=0,04$; p=0,83
	+1663 AG	110	46,61	138	45,24	1,05 (0,74-1,50) $\chi^2=0,05$; p=0,81
	+1663 AA	45	19,07	66	21,64	0,85 (0,54-1,33) $\chi^2=0,39$; p=0,53
	H ₀ (H _E)	0,46 (0,48)		0,43 (0,49)		

Примечание: H₀ и H_E – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность

Уровень аллельного разнообразия по рассматриваемым локусам варьировал от $H_0=0,18$ (для локуса $-308G/A$ *TNF α*) до $H_0=0,53$ (для локуса $+36A/G$ *TNFR1*) в популяционной выборке и от $H_0=0,22$ ($-308G/A$ *TNF α*) до $H_0=0,46$ ($+1663A/G$ *TNFR2*) среди больных СД2.

Установлена более высокая частота генетического варианта $+250GG$ лимфотоксина α среди больных СД2 (10,18%) по сравнению с контрольной группой, где анализируемый показатель составил 4,57% ($\chi^2=5,61$, $p=0,01$, с учётом поправки Бонферрони $p_{\text{cor}}=0,03$). По другим исследуемым генетическим полиморфизмам достоверных различий в концентрациях аллелей и генотипов не обнаружено ($p>0,05$).

При изучении связи молекулярно-генетических маркеров факторов некроза опухолей и их рецепторов с формированием СД2 у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от наследственной отягощенности по СД2 выявлены значимые различия в концентрациях генетических вариантов по локусу $+250A/G$ *Lta* (рис.1): у больных СД2 без наследственной отягощенности по СД2 концентрация генотипа $+250GG$ лимфотоксина α составляет 14,39% и в 3,5 раза превышает аналогичный показатель как контрольной группы (4,57%, $\chi^2=17,76$, $p=0,01$, $p_{\text{cor}}=0,03$, $OR=3,52$, 95% CI 1,63-7,63) так и пациентов с наследственной отягощенностью по СД2 (4,26%, $\chi^2=5,18$, $p=0,02$, $p_{\text{cor}}=0,06$). Также больные СД2 без наследственной отягощенности отличаются более высокой концентрацией генетического варианта $+250G$ лимфотоксина α (32,37%) в сравнении с контрольной группой (22,96%, $\chi^2=8,34$, $p=0,004$, $OR=1,61$, 95% CI 1,16-2,23) и пациентами с наследственной отягощенностью по СД2 (21,81%, $\chi^2=6,68$, $p=0,01$).

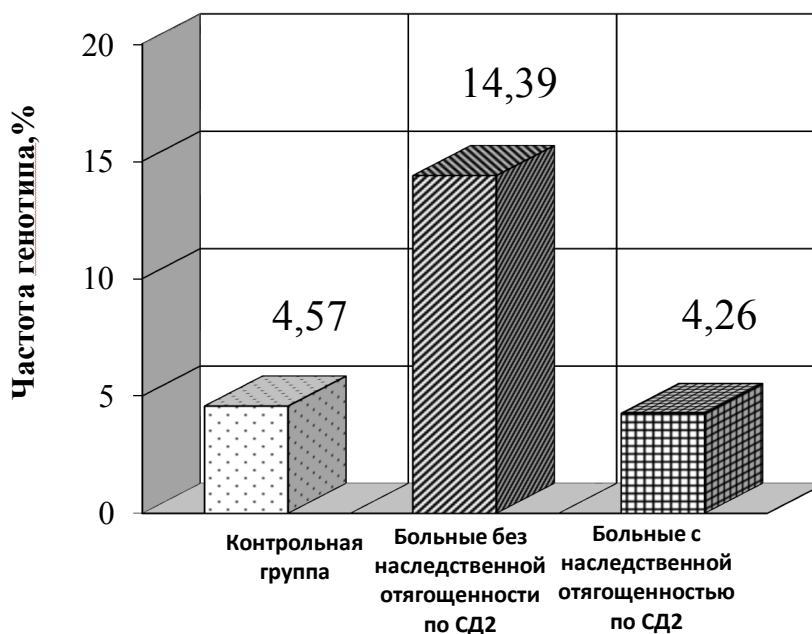


Рис. 1. Частота генотипа $+250GG$ *Lta* среди больных СД2 в зависимости от наследственной отягощенности по СД2 и в контрольной группе

С помощью биоинформатических подходов нами выявлены достоверные различия в концентрациях сочетаний аллеля +250A *Lta* с аллелем +36G *TNFR1* и аллелем +1663A *TNFR2* между больными сахарным диабетом 2-го типа без наследственной отягощенности по СД2 (33,81%) и контролем (45,45%). Данное сочетание является протективным фактором формирования сахарного диабета 2-го типа у индивидуумов без отягощенного семейного анамнеза по СД2 ($p=0,0004$, $p_{\text{cor}}=0,03$, $OR=0,47$, 95% CI 0,31-0,73). Также, зарегистрированы различия в распространенности сочетаний двух генетических маркеров +250A *Lta* и -308G *TNF α* между больными сахарным диабетом 2-го типа без наследственной отягощенности по СД2 (82,73%) и популяционным контролем (91,55%). Эта комбинация полиморфных вариантов генов факторов некроза опухоли также является протективной для формирования сахарного диабета 2-го типа у индивидуумов без наследственной отягощенности по СД2 ($p=0,0004$, $p_{\text{cor}}=0,04$, $OR=0,32$, 95% CI 0,17-0,61).

Полученные данные свидетельствуют о значимом вкладе комбинаций полиморфных вариантов генов факторов некроза опухоли (-308G/A *TNF α* , +250A/G *Lta*, +36A/G *TNFR1*, +1663A/G *TNFR2*) в формирование сахарного диабета 2-го типа у индивидуумов без отягощенного семейного анамнеза по СД2. Согласно литературным данным (Eissner G. et al. 2004; Sasaki M. et al., 2005; Okuse K. et al., 2007; Brian E. C., 2009) факторы некроза опухолей (фактор некроза опухоли α , лимфотоксин α) через свои рецепторы (рецепторы фактора некроза опухоли 1-го и 2-го типов) участвуют в реализации широкого спектра медико-биологических процессов в организме (митогенные факторы в апоптозе адипоцитов, стимуляция секреции лептина и регуляция функции митохондрий, участие в регуляции обмена углеводов и жиров, индукция инсулинорезистентности в жировой ткани и мышцах, подавление секреции инсулина β -клетками островков поджелудочной железы), имеющих важное значение в этиопатогенезе сахарного диабета 2-го типа (Anderson P.J. et al., 2001; Boden G. et al., 2002; Joseph N.A. et al., 2004; Кондратова Н.В. и др., 2005; Галстян Г.Р. и др., 2008; Гумилевский Б. Ю. и др., 2010).

2. Молекулярно-генетические маркеры и клиничко-лабораторный статус больных сахарным диабетом 2 типа

Важными маркерами неблагоприятного течения СД2 являются повышенный уровень гликемии и гликированного гемоглобина, которые служат показателями степени компенсации сахарного диабета и эффективности проводимой терапии (Дедов И.И. и др., 2011).

При изучении ассоциаций генетических полиморфизмов с клиничко-лабораторным статусом больных сахарным диабетом 2 типа установлено, что

молекулярно-генетический маркер $+36A/G$ *TNFR1* ассоциирован с уровнем гликированного гемоглобина у больных СД2. Индивидуумы с генотипом $+36AA$ *TNFR1* отличаются повышенным уровнем гликированного гемоглобина (медиана – 8,95%, нижний квартиль – 7,80%, верхний квартиль – 10,60 %) по сравнению с больными, имеющими генетические варианты $+36AG$ и $+36GG$ *TNFR1* (медиана – 8,50%, интерквартильный размах 7,10–9,6%, $p=0,03$).

Ассоциации с клинико-лабораторными показателями больных СД2 (уровень гликемии и гликированного гемоглобина) обнаруживает и генетический маркер $+250A/G$ *Lta*: пациенты с генетическими вариантами $+250AG$ и $+250AA$ *Lta* имеют более высокий уровень гликемии (медиана – 10,50 ммоль/л, нижний квартиль – 8,20 ммоль/л, верхний квартиль – 12,60 ммоль/л) и гликированного гемоглобина (медиана – 8,80%, нижний квартиль – 7,40%, верхний квартиль – 10,30%) по сравнению с пациентами с генотипом $+250GG$ *Lta* (медиана – 8,50 ммоль/л, интерквартильный размах – 6,05–11,25 ммоль/л, $p=0,01$ и медиана – 6,91% , интерквартильный размах – 6,16–8,70%, $p=0,001$, соответственно)(рис.2).

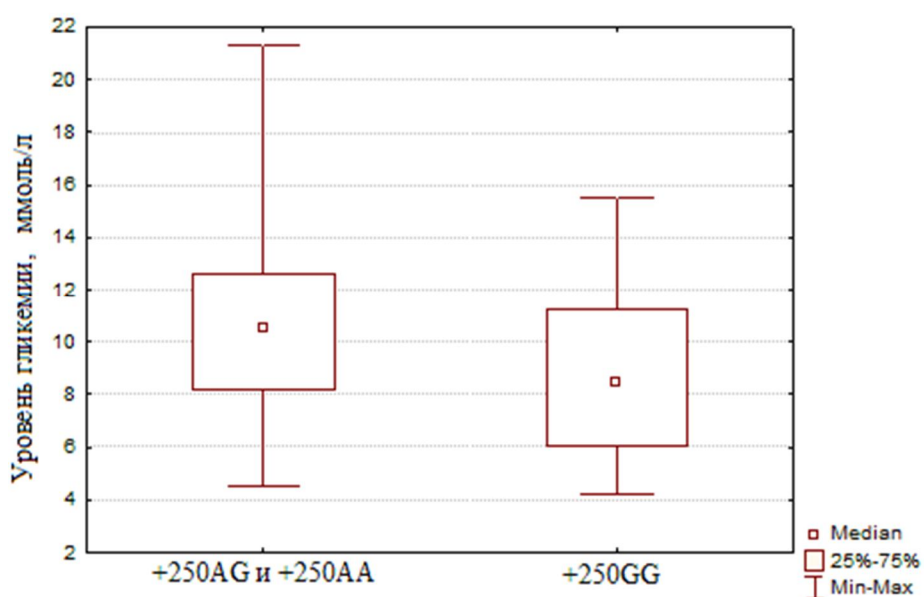


Рис. 2. Уровень гликемии у больных СД2 в зависимости от генотипов локуса $+250A/G$ *Lta*

Наряду с этим выявлены ассоциации генетических вариантов локуса $-308G/A$ фактора некроза опухоли α с уровнем гликированного гемоглобина, СОЭ, сахара в моче и показателем канальцевой реабсорбции у больных СД2. Так, индивидуумы с генотипами $-308GA$ и $-308AA$ *TNF α* имеют повышенный уровень гликированного гемоглобина (медиана – 8,97%, нижний квартиль –

7,69%, верхний квартиль – 10,90%) и сниженную канальцевую реабсорбцию (медиана – 99,00 мкмоль/л, интерквартильный размах – 98,00-99,00 мкмоль/л) по сравнению с пациентами с генотипом *-308GG TNFa* (медиана – 8,50%, интерквартильный размах – 7,10-9,76%, $p=0,03$, и медиана – 99,00 мкмоль/л, интерквартильный размах – 98,80-99,00 мкмоль/л, $p=0,02$, соответственно) (рис. 3). Также у больных СД2 с генотипами *-308GA* и *-308AA TNFa* уровень сахара в моче (медиана – 1,00 %, нижний квартиль – 0,02 %, верхний квартиль – 2,25%) и уровень СОЭ (медиана – 16,00 мм/час, нижний квартиль – 9,00 мм/час, верхний квартиль – 24,00 мм/час) статистически достоверно превышают аналогичные показатели индивидуумов с генотипом *-308GG TNFa* (медиана – 1,00 %, интерквартильный размах – 0,00-2,00 %, $p=0,03$ и медиана – 14,00 мм/час, интерквартильный размах – 8,00-23,00 мм/час, $p=0,006$, соответственно). Таким образом, маркерами неблагоприятного клинико-лабораторного статуса больных СД2 являются *-308AA* и *-308GA TNFa*. Согласно литературным данным (Dalziel et al., 2002; Fernandez et al., 2003; Pogoda T. V. et al., 2007; Namkung J. H. et al., 2007; Kirwan et al., 2009; Кондратова Н.П. и др., 2005) генетический вариант *-308A TNFa* связан с повышенным уровнем продукции фактора некроза опухоли α , который обладает выраженным иммуномодулирующим, цитотоксическим, провоспалительным действием, стимулирует липолиз, индуцирует инсулинорезистентность и апоптоз.

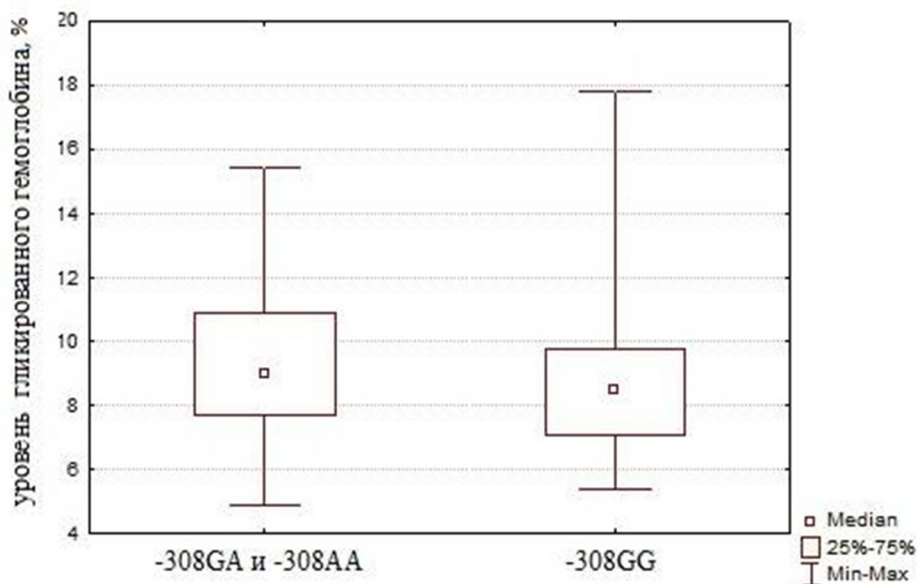


Рис. 3. Ассоциации генетических вариантов локуса *-308G/A TNFa* с уровнем гликированного гемоглобина у больных СД2

3. Изучение влияния генетических факторов на клинические особенности сахарного диабета 2 типа

Проведено исследование ассоциации генетических полиморфизмов факторов некроза опухолей и их рецепторов (+250A/G *Lta*, -308G/A *TNFA*, +36A/G *TNFR1* и +1663A/G *TNFR2*) с клиническими характеристиками сахарного диабета 2-го типа. Среди клинических признаков СД2 детально анализировались различные осложнения заболевания (диабетическая ангиопатия нижних конечностей, нефропатия, ретинопатия, синдром диабетической стопы). Развитие и прогрессирование данных осложнений ведет к ранней инвалидизации и гибели пациентов (Yamauchi T. et al., 2003; Alssema M. et al., 2007; Colagiuri S. et al., 2009; Hemmingsen B. et al., 2011; Шестакова М.В. и др., 2001; Якунина Н.Ю. и др., 2007; Дедов И.И. и др., 2011). В исследуемой группе больных СД2 (n=236) у 130 больных (55,08%) отмечалось наличие ангиопатии нижних конечностей, у 49 индивидуумов (20,76%) наблюдался синдром диабетической стопы, диабетическая нефропатия была зарегистрирована у 144 человек (61,01%), ретинопатия - у 171 больных (72,45%) исследуемой группы.

Установлены генетические факторы риска развития ангиопатии нижних конечностей: пациенты СД2 с ангиопатией нижних конечностей имеют наибольшую частоту аллеля -308A *TNFA* (17,31%) (рис.4) в сравнении с контрольной группой (11,06%, $\chi^2=5,77$, $p=0,02$, OR=1,68, 95% CI 1,09-2,59 и пациентами без ангиопатии нижних конечностей (10,38%, $p=0,02$).

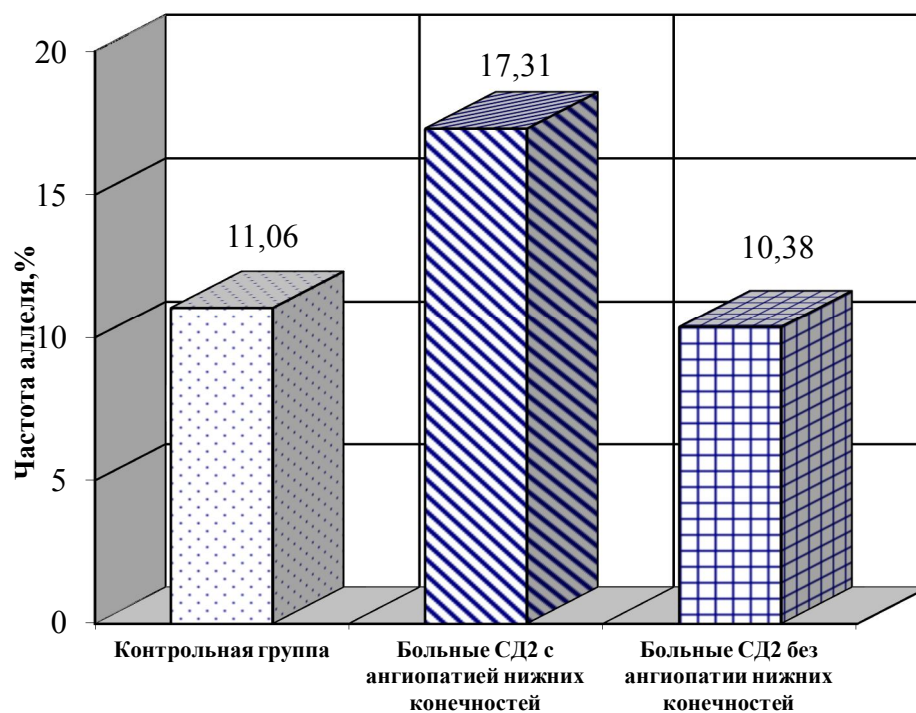


Рис. 4. Ассоциации генетического варианта -308A *TNFA* с развитием ангиопатии нижних конечностей у больных СД2

Наши результаты соответствуют литературным данным (Dalziel B. et al., 2002; Namkung J. H. et al., 2007; Kirwan et al., 2009; Кондратова Н. В. И др., 2009), свидетельствующим о том, что аллель *-308A TNF α* является прогностически неблагоприятным фактором течения сахарного диабета 2 типа и развития его осложнений.

Выявлены молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с более благоприятным клиническим течением СД2 (без осложнений). Генетический вариант *+250G Lta* связан с течением СД2 без нефропатии (OR=1,58, p=0,02) и ангиопатии нижних конечностей (OR=1,58, p=0,01), а генотип *+250GG Lta* маркирует течение СД2 без ретинопатии (OR=3,80, p=0,01, p_{cor}=0,03), синдрома диабетической стопы (OR=3,10, p=0,01, p_{cor}=0,03), ангиопатии нижних конечностей (OR=3,99, p=0,0009, p_{cor}=0,0027) и нефропатии (OR=4,41, p=0,0007, p_{cor}=0,0021).

Важное значение при определении индивидуальной тактики ведения больных СД2, профилактики развития и прогрессирования осложнений имеет своевременное диагностирование инсулинопотребности и назначение в соответствии с этим эффективного лечения (Pittas A. G. et al., 2004; Wisse V. E. et al., 2004; Аметов А. С. и др., 2007; Майоров А. Ю. 2009; Дедов И. И. и др., 2011; Hemmingsen B. et al., 2012). В исследуемой группе (n=236) инсулинопотребность наблюдалась у 169 человек (71,61%). На таблетированной терапии находились 72 человека (30,50%), 64 пациента получали (27,11%) инсулинотерапию, 100 больных были на комбинированной терапии (42,39%). На момент исследования положительный эффект от проводимой терапии имели 71 пациент (30,08%). Выявлено, что у больных СД2 без инсулинопотребности концентрация генотипа *+250GG* лимфотоксина α составляет 16,42% и в 2-4 раза превышает аналогичные показатели как контрольной группы (4,57%, $\chi^2=10,56$, p=0,01, p_{cor}=0,03, OR=4,11, 95% CI 1,64-10,24) так и пациентов с инсулинопотребностью (7,69%, $\chi^2=3,10$, p=0,07). Установлено, что у больных СД2 с положительным эффектом от проводимой терапии распространенность генотипа *+250GG* лимфотоксина α составляет 18,31% и в 3-4 раза превышает аналогичный показатель как контрольной группы (4,57%, $\chi^2=14,42$, p=0,0008, p_{cor}=0,0024, OR=4,69, 95% CI 1,95-11,26), так и пациентов без эффекта от терапии (6,67%, $\chi^2=6,15$, p=0,01, p_{cor}=0,03). В группе пациентов с положительным эффектом от терапии пероральными сахароснижающими препаратами (n=48) (рис.5) частота генотипа *+250GG Lta* составила 20,84%, тогда как среди больных с отрицательным эффектом от этой терапии (n=24) данный показатель равнялся - 0,00% ($\chi^2=4,20$, p=0,04), а в контрольной группе он был равен 4,57% ($\chi^2=14,95$, p=0,0007, p_{cor}=0,0021, OR=5,51, 95% CI 2,10-14,37).

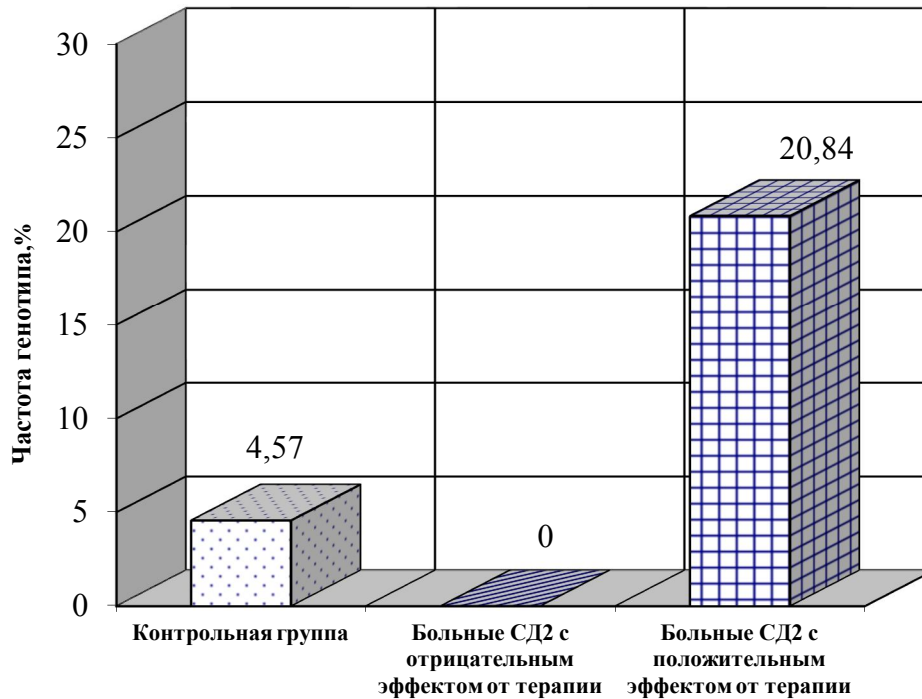


Рис. 5. Частота генотипа $+250GG$ *Lta* среди больных СД2, получавших пероральные сахароснижающие препараты, в зависимости от эффективности лечения

Выводы

1. Генетические полиморфизмы лимфотоксина α ($+250A/G$ *Lta*), фактора некроза опухоли α ($-308G/A$ *TNF α*), рецепторов факторов некроза опухоли 1-го ($+36A/G$ *TNFR1*) и 2-го ($+1663A/G$ *TNFR2*) типов ассоциированы с формированием сахарного диабета 2-го типа и его осложнений, клиническими особенностями заболевания, клинико-лабораторным статусом больных.

2. Частота генетического варианта $+250GG$ лимфотоксина α среди больных сахарным диабетом 2-го типа (10,18%) в 2,2 раза выше по сравнению с популяционным контролем (4,57%). У пациентов без наследственной отягощенности концентрации генотипа $+250GG$ *Lta* (14,39%) и аллеля $+250G$ *Lta* (32,37%) наибольшие.

3. Сочетание аллелей $+250A$ *Lta*, $+36G$ *TNFR1*, $+1663A$ *TNFR2* и комбинация генетического варианта $+250A$ *Lta* совместно с $-308G$ *TNF α* являются протективными факторами развития сахарного диабета 2-го типа у индивидуумов без отягощенного семейного анамнеза (OR=0,47 и OR=0,32, соответственно).

4. Развитие ангиопатии нижних конечностей у больных сахарным диабетом 2-го типа ассоциировано с аллелем $-308A$ *TNF α* (OR=1,68). Течение заболевания с низким уровнем гликемии и гликированного гемоглобина, без инсулинопотребности и осложнений, с положительным эффектом от

проводимой терапии маркируется полиморфными вариантами *+250GG Lta* и *+250G Lta*.

5. Генетические варианты *-308AA* и *-308GA TNF α* ассоциированы с повышенным уровнем сахара в моче, сниженной канальцевой реабсорбцией, высокой скоростью оседания эритроцитов, а генотипы *+36AA TNFR1* и *-308AA, -308GA TNF α* маркируют повышенный уровень гликированного гемоглобина у больных сахарным диабетом 2-го типа.

Практические рекомендации

1. При медико-генетическом консультировании для оценки риска развития сахарного диабета 2 типа следует проводить молекулярно-генетическое тестирование генов факторов некроза опухолей и их рецепторов (*+250A/G Lta*, *-308G/A TNF α* , *+36A/G TNFR1* и *+1663A/G TNFR2*) с учетом наследственной отягощенности по СД2.

2. В эндокринологических стационарах при обследовании пациентов с сахарным диабетом 2 типа в качестве маркера повышенного риска развития ангиопатии нижних конечностей рекомендуется использовать генетический вариант *-308A TNF α* . У больных СД2 в качестве маркеров благоприятного течения заболевания (низкий уровень гликированного гемоглобина, без осложнений и инсулинопотребности) использовать полиморфные варианты *+250G Lta* и *+250GG Lta*.

3. При назначении лечения больным СД2 пероральными сахароснижающими препаратами следует учитывать результаты молекулярно-генетического типирования локуса *+250A/G* лимфотоксина α (генотип *+250GG Lta* ассоциирован с положительным эффектом от терапии).

Список сокращений

Lta — лимфотоксин α

TNF α — фактор некроза опухоли α

TNFR1 — рецептор фактора некроза опухоли первого типа

TNFR2 — рецептор фактора некроза опухоли второго типа

СД2 — сахарный диабет 2 типа

СОЭ — скорость оседания эритроцитов

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Белоусова, О. Н. Изучение роли генетических факторов в возникновении осложнений сахарного диабета 2 типа / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносков // Геронтологический журнал им. В. Ф. Купревича. – 2010. – № 2. – С. 16-17. – (Геронтологические чтения-2010 : III междунар. науч.-практ. конф., Белгород, 11-12 нояб. 2010 г. / БелГУ).

2. Белоусова, О. Н. Клинико-генетическое исследование сахарного

диабета 2 типа / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносков // 5 Всероссийский диабетологический конгресс, Москва, 23-26 мая 2010 г. : тез. докл. / Эндокринолог. науч. центр, Рос. ассоц. эндокринологов. – М., 2010.- С.68.

3. **Белоусова, О. Н.** Влияние молекулярно-генетического маркера +1663 A/G TNFR2 на возникновение диабетической полинейропатии при сахарном диабете 2 типа / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносков // Современный взгляд на болезни внутренних органов и полиморбидность : материалы междунар. науч.-практ. конф., Белгород, 19-20 мая 2011 г. / НИУ БелГУ ; под ред. О. А. Ефремовой. – Белгород, 2011. – С. 16-17.

4. **Белоусова, О. Н.** Генетические полиморфизмы факторов некроза опухоли и его рецепторов при сахарном диабете 2 типа / О. Н. Белоусова // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье : тез. XIV всерос. мед.-биол. конф. молодых исслед. с междунар. участием, Санкт-Петербург, 16 апр. 2011 г. / С.-Петерб. гос. ун-т, Рос. физиол. о-во им. И. П. Павлова [и др.] ; гл. ред. П. К. Яблонский. – СПб., 2011. – С. 26.

5. **Белоусова, О. Н.** Оценка роли генетического полиморфизма -308 A/G TNF α в формировании сахарного диабета 2 типа / О. Н. Белоусова, Ю. Ю. Чурносков // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2011. – № 1, спец. вып. – С. 85-86.

6. Чурносков, Ю. Ю. Анализ ассоциации сахарного диабета 2 типа с молекулярно-генетическим маркером +1663 A/G TNFR2 / Ю. Ю. Чурносков, **О. Н. Белоусова** // Вестник Российского государственного медицинского университета – 2011. – № 1, спец. вып. – С. 86-87.

7. **Белоусова, О. Н.** Распределение молекулярно-генетического маркера лимфотоксина-альфа среди населения Центрального Черноземья / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносков // Университетская наука: взгляд в будущее : материалы итог. науч. конф. сотрудников КГМУ, Центр.-Чернозем. науч. центра РАМН и отд-ния РАЕН, посвящ. 76-летию Курск. гос. мед. ун-та, Курск, 2-3 февр. 2011 г. : [в 3 т.] / Курск. гос. мед. ун-т, Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН, Рос. акад. естеств. наук ; [под ред. В. А. Лазаренко и др.]. – Курск, 2011. – Т. 1. – С. 227-229.

8. **Белоусова, О. Н.** Степень тяжести сахарного диабета 2 типа и генетический полиморфизм +1663A/G TNFR2 / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносков // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии : 2 всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Курск, 17-19 мая 2010 г. : сб. материалов / КГМУ, адм. Курск. обл., Рос. акад. естеств. наук [и др.] ; [отв. ред. В. П. Иванов]. – Курск, 2011. – С. 36.

9. **Белоусова, О. Н.** Частота развития диабетической ретинопатии и генетический полиморфизм +1663A/G TNFR2 при сахарном диабете 2-го типа / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносков // Алмазовские чтения 2011 : тез. всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию со дня рождения академика РАМН В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, май 2011. – СПб., 2011. – С. 52.

10. **Белоусова, О. Н.** Оценка роли наследственных факторов в

возникновении сахарного диабета 2 типа / О. Н. Белоусова, М. И. Чурносов // Молодежная наука и современность : материалы 76-й всерос. науч. конф. студентов и молодых ученых, Курск, 19-20 апр. 2011 г. : в 3-х ч. / Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН ; Курск. гос. мед. ун-т [и др.] ; ред. кол.: В. А. Лазаренко [и др.]. – Курск, 2011. – Ч. 1. – С. 59.

11. **Белоусова, О. Н.** Степень тяжести сахарного диабета 2 типа и генетические варианты локуса -308G/A TNF α / О. Н. Белоусова // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2012. – № 1, спец. вып. – С. 101.

12. **Белоусова, О. Н.** Исследование влияния генетических полиморфизмов -308G/A TNF α и +36A/G TNFR1 на развитие вторичной инсулинопотребности у больных сахарным диабетом 2 типа / О. Н. Белоусова // Геронтологический журнал им. В. Ф. Купревича. – 2012.–№1 – 2. – С. 3. – (Геронтологические чтения-2012 : 5 междунар. науч.-практ. конф., Белгород, 6-10 февр. 2012 г.).

13. **Белоусова, О. Н.** Исследование ассоциаций генетических полиморфизмов факторов некроза опухоли и их рецепторов с формированием сахарного диабета 2 типа / О. Н. Белоусова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – Серия: Медицина, Фармация. - 2012. - №16 – С.79-85.

14. **Белоусова, О. Н.** Ассоциации генетических полиморфизмов -308G/A TNF α и +1663G/A TNFR2 на развитие диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 2 типа / О. Н. Белоусова // 66-я Итоговая научная конференция молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета / Материалы конференции – Ростов-на-Дону.: ГБОУ ВПО РостГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – С. 198.