



УДК 616.43

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА**ANALYSIS OF GENETIC DETERMINANTS OF CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES****С.С. Сиротина, О.Н. Белоусова, И.В. Батлущая, Е.Н. Крикун
S.S. Sirotina, O.N. Belousova, I.V. Batluchaja, E.N. Krikun***Белгородский государственный национальный исследовательский университет
308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85**Belgorod National Research University
308015, Belgorod, Pobedy St., 85**e-mail: sirotina@bsu.edu.ru*

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, клинико-лабораторные показатели больных, факторы некроза опухоли.

Keywords: type 2 diabetes, clinical and laboratory parameters of patients, tumor necrosis factors

Резюме. 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. В статье изложены результаты исследования полиморфизмов генов цитокинов среди больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от клинико-лабораторных показателей больных. Установлено, что генетические варианты -308AA и -308GA TNF α маркируют повышенный уровень гликированного гемоглобина в крови и сахара в моче, сниженную канальцевую реабсорбцию. Повышенный уровень лейкоцитов, холестерина и сниженное содержание ЛПВП ассоциированы с генетическим вариантом +1663AA TNFR2. Маркером повышенного уровня гликированного гемоглобина служит +36AA TNFR1.

Summary. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) - the most common endocrine disease, which is one of the most serious health and social problems, since it leads to early disability and increased mortality among the population due to the development of various complications. The article presents the results of a study of cytokine gene polymorphisms in patients with type 2 diabetes according to the clinical and laboratory parameters of patients. The aim of the study was to investigate the relation of genetic variants of tumor necrosis factor and its receptors with clinical and laboratory parameters in patients with type 2 diabetes.

Research Group totaled 544 people: 236 patients with type 2 diabetes and 308 population controls. It included individuals of Russian nationality, who are natives of the Central Black Soil Region of Russia. The material for the study was the venous blood in the amount of 8-9 ml taken from the cubital vein of a proband. Isolation of genomic DNA from peripheral blood by standard methods. Analysis of all loci (-308G / A TNF α , + 250A / G Lta, + 36A / G TNFR1, + 1663A / G TNFR2) was performed by polymerase chain reaction (PCR). Established that genetic variants and -308AA -308GA TNF α mark elevated glyceated hemoglobin in the blood and urine sugar, a reduced tubular reabsorption. Elevated levels of leukocytes, and reduced cholesterol content of HDL are associated with a genetic variant + 1663AA TNFR2. Marker elevated levels of glyceated hemoglobin is + 36AA TNFR1.

Введение

Сахарный диабет 2 типа (СД 2) - метаболическое заболевание, характеризующееся хронической гипергликемией, развивающейся в результате нарушения взаимодействия инсулина с клетками тканей [Дедов, 2011; Hemmingsen et al., 2012]. Характерным проявлением сахарного диабета является нарушение углеводного обмена с нарастанием уровня глюкозы (сахара) в крови. Сахарный диабет – одно из наиболее распространенных эндокринных заболеваний. Частота сахарного диабета в среднем колеблется от 1.5-3%, возрастая в развитых странах мира (до 5-6%). В мире насчитывается около 200 млн. больных диабетом, при этом почти 90% из них страдают сахарным диабетом 2-го типа.

СД 2 относят к мультифакториальным заболеваниям [Sparso et al., 2008; Ellervik et al., 2011]. Согласно литературным данным роль генетических факторов в развитии СД 2 составляет 60-80% [Носиков, Серегин, 2011]. Научные исследования последних лет показали, что важное значение в развитии СД 2 играют цитокины [Bradley, 2008], которые способствуют развитию инсулинорезистентности, причем одними из ключевых медиаторов ее развития являются факторы некроза опухоли [Dehwhah 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 [Rung et al., 2009].

Цель работы

Целью исследования явилось изучение связи генетических вариантов факторов некроза опухолей и их рецепторов с клинико-лабораторными показателями пациентов с СД 2.

Материалы и методы

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).

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось стандартными методами [Mathew, 1985]. Анализ всех локусов (-308G/A TNFα, +250A/G Lta, +36A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2) осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов [Churnosov et al., 2014b]. Генотипирование ДНК-маркеров производилось методом анализа дискриминации аллелей методом Tag Man зондов (Tag Man). Ассоциации аллелей и генотипов изученных ДНК- маркеров оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности 2x2 с расчетом критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и отношения шансов (OR) с 95% доверительными интервалами (CI).

Нами были рассмотрены следующие клинико-лабораторные патогенетически значимые для СД2 показатели: уровень гликемии, лейкоцитоза, холестерина и его фракций, коэффициент атерогенности, гликированного гемоглобина, эритроцитов, СОЭ, наличие сахара в моче, канальцевая реабсорбция, уровень мочевины. Так как распределение анализируемых показателей, оцененное с помощью критерия Шапиро-Уилка, не соответствует закону нормального распределения (p<0,05), для описания рассматриваемых количественных показателей применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а при сравнении индивидуумов с разными генотипами по этим показателям использовали непараметрический метод – критерий Манна-Уитни [Реброва, 2006].

Результаты и их обсуждения

Получено, что в исследуемой нами группе больных СД 2 (табл. 1) медиана уровня гликированного гемоглобина составляет 8.65 %, содержание эритроцитов равно 4.80 x 10¹²/л, лейкоцитов – 6.70 x 10⁹/л, показатель СОЭ составляет 14,00 мм/час, уровень общего холестерина равен 5.83 ммоль/л, ЛПВП- 1.23 ммоль/л, уровень сахара в моче-1.00%, показатель канальцевой реабсорбции- 99.00 %, уровень гликемии – 10.40 ммоль/л, уровень ЛПНП – 3.40 ммоль/л, коэффициент атерогенности – 3.93 ЕД и уровень мочевины – 5.70 ммоль/л.

Таблица 1
Table 1

Распределение патогенетически значимых клинико-лабораторных показателей у больных сахарным диабетом 2-го типа
Distribution of pathogenetic importance of clinical and laboratory parameters in patients with type 2 diabetes

Показатели	N*	Me*	Q25*	Q75*	W*	P*
Уровень гликированного гемоглобина, %	224	8.65	7.20	9.90	0.96	0.00
Содержание эритроцитов, 10 ¹² /л	236	4.80	4.50	5.17	0.98	0.03



Продолжение таблицы 1

Содержание лейкоцитов, 10 ⁹ /л	236	6.70	5.70	8.00	0.96	0.00
СОЭ, мм/час	236	14.00	8.50	24.00	0.92	0.00
Уровень холестерина, ммоль/л	235	5.83	5.00	6.60	0.76	0.00
Уровень ЛПВП, ммоль/л	175	1.23	1.03	1.54	0.96	0.00
Наличие сахара в моче, %	236	1.00	0.00	2.00	0.85	0.00
Показатель канальцевой реабсорбции, %	107	99.00	98.00	99.00	0.66	0.00
Уровень гликемии, ммоль/л	236	10.40	8.00	12.50	0.73	0.00
Уровень ЛПНП, ммоль/л	180	3.40	2.78	4.10	0.96	0.00
Коэффициент атерогенности, ЕД	179	3.93	3.14	4.61	0.84	0.00
Уровень мочевины, ммоль/л	236	5.70	5.00	6.94	0.69	0.00

*Примечание: указан объем выборки (N), медиана (Me), интерквартильный размах – 25-й и 75-й процентиля (Q25 и Q75), критерий Шапиро-Уилка (W) и уровень его значимости (p)

При изучении роли полиморфных вариантов генов факторов некроза опухолей и их рецепторов в формировании клинико-лабораторных показателей в группе больных СД2 установлены ассоциации генетического маркера +1663A/G TNFR2 с уровнем лейкоцитов, ЛПВП и холестерина крови.

Индивидуумы с генотипом +1663AA TNFR2 имеют более выраженный лейкоцитоз (медиана – 7.30 x 10⁹/л, нижний квартиль – 6,20 x 10⁹/л, верхний квартиль – 8,80 x 10⁹/л) по сравнению с пациентами с генотипами +1663AG и +1663GG TNFR2 (медиана – 6,50 x 10⁹/л, интерквартильный размах – 5.60–7.80 x 10⁹/л, p=0.03) (рис. 1)

В группе больных с генотипом +1663AA TNFR2 уровень ЛПВП (медиана-1.14 ммоль/л, интерквартильный размах 0.90-1.32 ммоль/л) меньше по сравнению с пациентами с генотипами +1663AG и +1663GG TNFR2 (медиана 1.26 ммоль/л, нижний квартиль 1.06 ммоль/л, верхний квартиль 1.85 ммоль/л, p=0.005) (рис. 2).

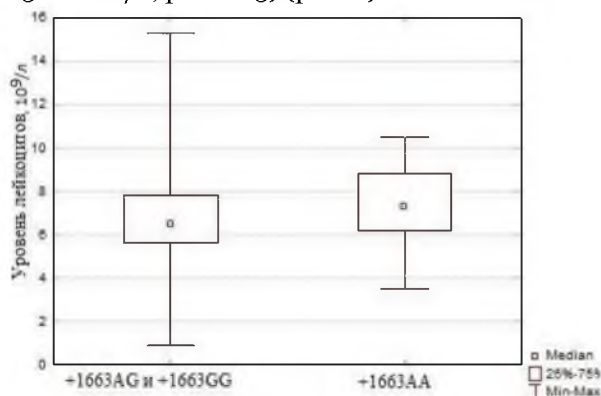


Рис. 1. Ассоциации генетического полиморфизма +1663A/G TNFR2 с уровнем лейкоцитов у больных СД2
Fig.1. Association of genetic polymorphism + 1663A / G TNFR2 with the level of white blood cells in patients with type 2 diabetes

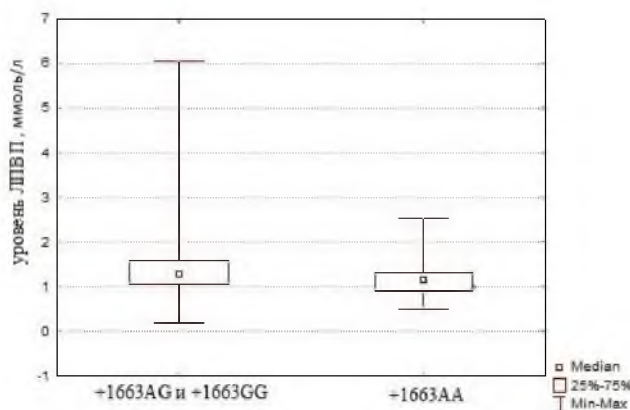


Рис.2. Уровень ЛПВП у больных СД2 в зависимости от генетических вариантов локуса +1663A/G TNFR2
Fig.2. HDL levels in patients with type 2 diabetes according to the genetic options locus + 1663A / G TNFR2



Также выявлено, что у больных СД2 с генотипом +1663AA TNFR2 уровень холестерина в крови (медиана – 5.90 ммоль/л, нижний квартиль – 4.99 ммоль/л, верхний квартиль – 6.30 ммоль/л) статистически достоверно ($p=0.005$) превышает аналогичный показатель индивидуумов с генотипами +1663AG и +1663GG TNFR2 (медиана – 5.81 ммоль/л, интерквартильный размах – 5.00-6.70 ммоль/л). (рис.3).

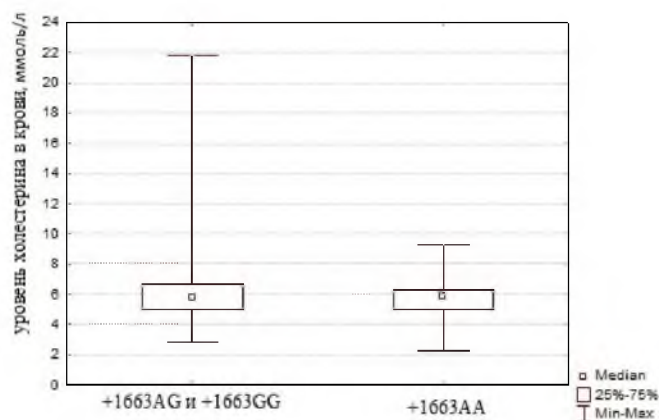


Рис. 3. Ассоциации генетического полиморфизма +1663A/G TNFR2 с уровнем холестерина у больных СД2

Fig.3. Association of genetic polymorphism +1663A/G TNFR2 with cholesterol levels in patients with type 2 diabetes

Наряду с этим выявлены ассоциации генетических вариантов локуса -308 G/A фактора некроза опухоли α с уровнем гликированного гемоглобина, сахара в моче и показателем канальцевой реабсорбции у больных СД 2.

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%, интерквартильный размах – 98.00-99.00 %) по сравнению с пациентами с генотипом -308GG TNF α (медиана – 8.50%, интерквартильный размах – 7.10-9.76%, $p=0.03$, и медиана – 99.00%, интерквартильный размах – 98.80-99.00%, $p=0.02$, соответственно) (рис.4, рис.5).

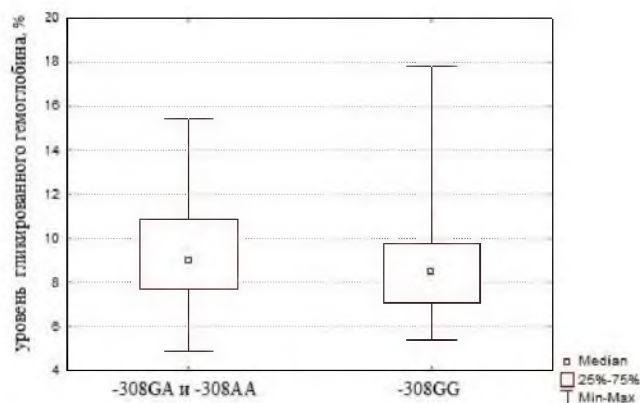


Рис.4. Уровень гликированного гемоглобина у больных СД2 в зависимости от генотипов локуса -308 G/A TNF α

Fig.4. The level of glycosylated hemoglobin in patients with type 2 diabetes according to locus genotypes of -308 G / A TNF α

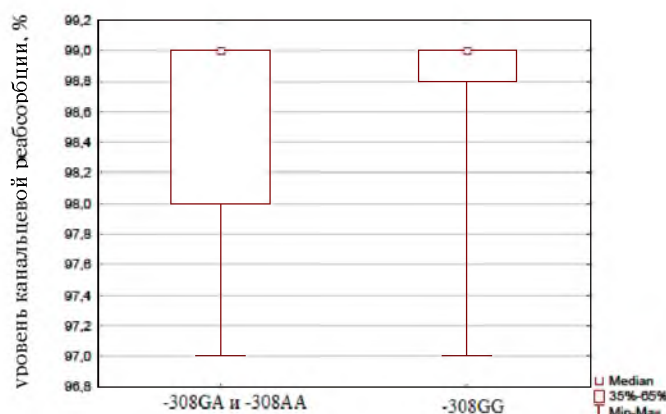


Рис.5. Ассоциации молекулярно-генетического маркера -308G/A TNFα с уровнем канальцевой реабсорбции у больных СД2

Fig.5. Association of molecular genetic markers -308G / A TNFα the level of tubular reabsorption in patients with type 2 diabetes

Молекулярно-генетический маркер +36A/G TNFR1 ассоциирован с уровнем гликированного гемоглобина у больных СД 2. 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) (рис.6).

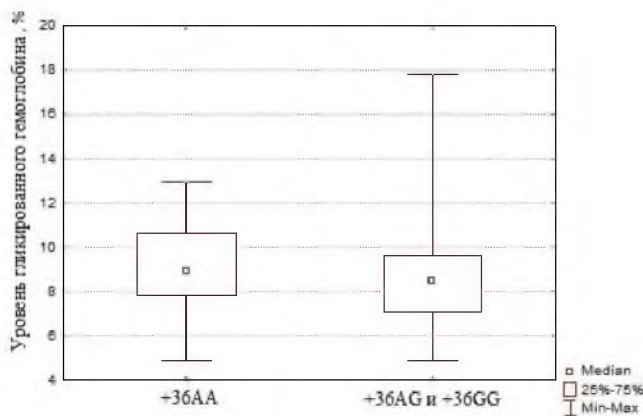


Рис.6. Ассоциации генетического полиморфизма +36A/G TNFR1 с уровнем гликированного гемоглобина у больных СД2

Fig.6. Association of genetic polymorphism + 36A / G TNFR1 the level of glycosylated hemoglobin in patients with type 2 diabetes

Заключение

Таким образом, резюмируя полученные данные, следует отметить, что генетические полиморфизмы - 308G/A фактора некроза опухоли α, +36A/G рецептора фактора некроза опухоли 1-го типа, +1663A/G рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа имеют важное патогенетическое значение при сахарном диабете 2 типа. Получено, что, во-первых, генетический полиморфизм -308G/A TNFα ассоциирован с уровнем гликированного гемоглобина в крови, сахара в моче, показателями канальцевой реабсорбции. Генетические варианты -308AA и -308GA TNFα маркируют повышенный уровень гликированного гемоглобина в крови и сахара в моче, сниженную канальцевую реабсорбцию. Во-вторых, генетический полиморфизм +1663A/G TNFR2 связан с уровнем лейкоцитов, ЛПВП и холестерина крови. Повышенный уровень лейкоцитов, холестерина и сниженное содержание ЛПВП ассоциированы с генетическим вариантом +1663AA TNFR2. В-третьих, полиморфный маркер +36A/G TNFR1 ассоциирован с уровнем гликированного гемоглобина у больных СД2. Маркером повышенного уровня гликированного гемоглобина служит +36AA TNFR1.



Согласно литературным данным [Churnosov et al., 2014a] 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 [Урбанова, Галстян, 2008; Гумилевский, Гумилевская, 2010].

Благодарности

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента РФ.

Литература

- Гумилевский Б. Ю. Гумилевская О. П. 2010. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при хроническом отторжении ренального трансплантата. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, 3(1): 62-65.
- Дедов И. И. 2011. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Сахарный диабет, 3(5):72.
- Носиков В. В. Серегин Ю. А. 2010. Молекулярная генетика сахарного диабета типа 1: достижения и перспективы. Лики Украины, 1:42-51.
- Реброва О. Ю. 2006. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М., Медиа Сфера, 315.
- Урбанова К. А., Галстян, Г. Р. 2008. Изменение чувствительности к инсулину у лиц с различными нарушениями углеводного обмена. IV Всероссийский диабетологический конгресс, (Москва, 19-22 мая 2008 г.): 81-82.
- Bradley J. R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. J. Pathol., 214(2):149-160.
- Churnosov M. I., Altuchova O. B., Demakova N. A., Evdokimov V. I., Sorokina I. N. 2014a. Analysis of involvement of cytokine genetic polymorphisms in development of genital endometriosis. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical, 5(5):1027-1031.
- Churnosov M. I., Altuchova O. B., Demakova N. A., Krivoshei I. V., Evdokimov V. I., Batlutskaya I. V., Polonikov A. V. 2014b. Associations of cytokines genetic variants with myomatous knots sizes. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical, 5(6):1344-1347.
- Dehwhah, M., Wang M., Huang Q. 2010. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. Genet. Mol. Res, 9(2):1109-1120.
- Ellervik C., Mandrup-Poulsen T., Andersen H. 2011. Elevated transferrin saturation and risk of diabetes: three population-based studies. Diabetes Care, 34(10):2256-2258.
- Hemmingsen B., Christensen L., J. Wetterslev. 2012. Comparison of metformin and insulin versus insulin alone for type 2 diabetes: systematic review of randomised clinical trials with meta-analyses and trial sequential analyses. BMJ, 344(5):1771.
- Mathew C. G. 1985. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. Methods. Mol. Biol., 2:31-34.
- Rung J., Cauchi S., Albrechtsen A. 2009. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. Nature genetics, 41(10):1110-1115.
- Sparso T., Andersen G., Burgdorf K. 2008. The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. Diabetologia, 51(1):70-75.

Literature

- Gumilevskij B. Ju. Gumilevskaja O. P. 2010. Allel'nyj polimorfizm genov citokinov pri hronicheskom ottorzhennii renal'nogo transplantata. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo me-dicinskogo universiteta, 3(1): 62-65 (in Russian).
- Dedov I. I. 2011. Algoritmy specializirovannoj medicinskoj pomoshhi bol'nym caharnym diabetom. Saharnyj diabet, 3(5):72 (in Russian).
- Nosikov V. V. Seregin Ju. A. 2010. Molekuljarnaja genetika saharnogo diabeta tipa 1: dostizhe-nija i perspektivy. Liki Ukrainy, 1:42-51 (in Russian).
- Rebrova O. Ju. 2006. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa pri-kladnyh programm Statistica. M., Media Sfera, 315 (in Russian).
- Urbanova K. A., Galstjan, G. R. 2008. Izmenenie chuvstvitel'nosti k insulinu u lic s razlich-nymi narushenijami uglevodnogo obmena. IV Vserossijskij diabetologicheskij kongress, (Moskva, 19-22 maja 2008 g.): 81-82 (in Russian).
- Bradley J. R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. J. Pathol., 214(2):149-160.



Churnosov M. I., Altuchova O. B., Demakova N. A., Evdokimov V. I., Sorokina I. N. 2014a. Analysis of involvement of cytokine genetic polymorphisms in development of genital endometriosis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 5(5):1027-1031.

Churnosov M. I., Altuchova O. B., Demakova N. A., Krivoshei I. V., Evdokimov V. I., Batlutskaya I. V., Polonikov A. V. 2014b. Associations of cytokines genetic variants with myomatous knots sizes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 5(6):1344-1347.

Dehwah, M., Wang M., Huang Q. 2010. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. *Genet. Mol. Res*, 9(2):1109-1120.

Ellervik C., Mandrup-Poulsen T., Andersen H. 2011. Elevated transferrin saturation and risk of diabetes: three population-based studies. *Diabetes Care*, 34(10):2256-2258.

Hemmingsen B., Christensen L., J. Wetterslev. 2012. Comparison of metformin and insulin versus insulin alone for type 2 diabetes: systematic review of randomised clinical trials with meta-analyses and trial sequential analyses. *BMJ*, 344(5):1771.

Mathew C. G. 1985. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Methods. Mol. Biol.*, 2:31-34.

Rung J., Cauchi S., Albrechtsen A. 2009. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nature genetics*, 41(10):1110-1115.

Sparso T., Andersen G., Burgdorf K. 2008. The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51(1):70-75.