



I. A. ЗОРІЙ, Н. В. ПАШКОВСЬКА, В. М. ПАШКОВСЬКИЙ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

Клініко-діагностичні особливості дистальної симетричної полінейропатії у хворих на цукровий діабет 2 типу залежно від поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази

Мета — оцінити функціональний стан периферичних нервів та клініко-лабораторні показники у хворих на цукровий діабет (ЦД) 2 типу залежно від поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS).

Матеріали і методи. Проведено генотипування 110 хворих на ЦД 2 типу, ускладнений дистальною симетричною полінейропатією, та 80 практично здорових осіб для визначення алельного поліморфізму G894T гена eNOS. Усім пацієнтам проведено неврологічне обстеження за шкалами невропатичного симптоматичного підрахунку (NSS), модифікованого невропатичного дисфункціонального підрахунку (NDS), електронейроміографічне тестування периферичних нервів нижніх кінцівок та визначення показників вуглеводного обміну.

Результати. Встановлено асоціацію гомозиготного генотипу TT поліморфізму G894T гена eNOS з вищою оцінкою за шкалою NSS, з вищим рівнем глікозильованого гемоглобіну ($p < 0,05$) та достовірним зниженням амплітуди моторної відповіді при електронейроміографічному тестуванні периферичних нервів.

Висновки. Гомозиготність за мінорним алелем підвищує ймовірність розвитку дистальної симетричної полінейропатії на тлі ЦД 2 типу, тоді як гетерозиготність, за даними нашого дослідження, асоціюється з найнижчим ризиком розвитку тяжких ускладнень діабетичної полінейропатії.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, дистальна симетрична полінейропатія, електронейроміографічні показники, вуглеводний обмін, поліморфізм G894T гена ендотеліальної NO-синтази.

Незважаючи на значні досягнення в профілактиці, діагностиці та лікуванні цукрового діабету (ЦД), у всіх економічно розвинених країнах ця патологія залишається однією з головних причин смертності населення. За прогнозами експертів Міжнародної діабетичної федерації і ВООЗ, до 2030 р. кількість хворих на ЦД зросте до 552 млн. ЦД спричинив 4,6 млн випадків смертей у 2011 р., а витрати, пов'язані з цим захворюванням, становили 465 млрд дол. США [4, 7]. В Україні зареєстровано понад 1,3 млн хворих, з них 212 134 потребують щоденних ін'єкцій інсуліну [5].

Нині ЦД 2 типу відносять до багатофакторних полігенних захворювань, яке належить до основних причин ранньої інвалідизації та смертності хворих, що зумовлено розвитком судинних ускладнень. Діабетична полінейропатія — одне з найпоширеніших ускладнень ЦД, яке діагностують у більшості пацієнтів [1, 6]. Діабетичну полінейропатію при ЦД 2 типу лише умовно можна вважати його ускладненням, оскільки функціональні порушення периферичної нервової системи спостерігаються вже в дебюті захворювання, що пов'язано з високою чутливістю нервових клітин до підвищеної концентрації глюкози [11].

Значення генетичних чинників у розвитку ЦД та його ускладнень нині загальноновизнано. Актуаль-

© I. A. Зорій, Н. В. Пашковська, В. М. Пашковський, 2014

ність досліджень генетики ЦД 2 типу зумовлена тим, що їх результати дають змогу наблизитися до ідентифікації генів, які спричиняють розвиток ускладнень при ЦД 2 типу. У зв'язку з цим важливо вивчати генетичну схильність до розвитку діабетичної полінейропатії з використанням прогнозу перебігу захворювання [8, 9, 10]. Дані літератури щодо генетики ускладнень ЦД 2 типу, а саме поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), який може бути як потенційним модифікатором діабетичних ангіопатій, так і чинником ішемізації нервової тканини, нечисленні та суперечливі.

Мета роботи — оцінити функціональний стан периферичних нервів та клініко-лабораторні показники у хворих на цукровий діабет 2 типу залежно від поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази.

Матеріали і методи

Обстежено 110 хворих на ЦД 2 типу з дистальною симетричною полінейропатією (ДСПН) (середній вік — $(57,60 \pm 2,79)$ року), які перебували на лікуванні в Чернівецькому обласному ендокринологічному центрі, і 20 практично здорових осіб, які становили контрольну групу.

У 34 (31 %) хворих діагностовано ДСПН легкого ступеня, у 58 (52,7 %) — середнього, у 18 (16,3 %) — тяжкого. Тривалість ЦД: до 5 років — у 41 (37,3 %) хворого, від 5 до 10 років — у 32 (29,1 %), понад 10 років — у 37 (33,6 %) хворих.

Для встановлення ступеня тяжкості ДСПН усім пацієнтам здійснювали неврологічне обстеження за шкалами невропатичного симптоматичного підрахунку (NSS), модифікованого невропатичного дисфункціонального підрахунку (NDS) [6].

Електронейроміографічне (ЕНМГ) тестування периферичних нервів нижніх кінцівок (малогомілкового та великогомілкового) проводили на комп'ютеризованому програмному комплексі M-Test (DX-системи, Україна). При дослідженні моторних нервів вивчали амплітуду потенціалів максимальної рухової відповіді (М-відповіді) на стимуляцію нерва в дистальній та проксимальній точках, термінальну латентність, резидуальну латентність, швидкість проведення збудження (ШПЗ). Виконували внутрішньом'язову голкову ЕНМГ прямого м'яза стегна з вивченням амплітуди потенціалів рухових одиниць (ПРО), тривалість ПРО, поліфаз-

ності та політурності потенціалів у відсотковому співвідношенні, а також наявності спонтанної активності у вигляді потенціалів фібриляції та позитивних гострих хвиль [2].

Рівень глікемії досліджували глюкозооксидазним методом з використанням стандартних наборів реактивів виробництва НВП «Філісіт діагностика» (Україна). Вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA_{1c}) визначали методом рідинної іонообмінної хроматографії високого тиску на автоматичному аналізаторі глікозильованого гемоглобіну D10 виробництва Bio-Rad Laboratories Inc. (Франція) з використанням реактивів «Біомедінвест» (Україна). Рівень імунореактивного інсуліну (ІРІ) і С-пептиду встановлювали імунферментним методом на аналізаторі Stat-Fax Plus-303 (США) з використанням реактивів виробництва DRG International Inc. (США).

Ступінь інсулінорезистентності встановлювали за індексом HOMA-IR з використанням програми HOMA Calculator Version 2.2 Diabetes Trials Unit University of Oxford (Велика Британія). Критичним вважали значення вище за 2,0.

ДНК виділяли з клітин крові за допомогою набору «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія). Детекцію поліморфізму G894T у гені eNOS проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Аallelний поліморфізм визначали ампліфікацією гена з наступною рестрикцією рестриктазою Eco24I. Фрагменти ампліфікованої ДНК розділяли методом гель-електрофорезу. Візуалізацію ДНК проводили за допомогою УФ-випромінювача.

Статистичну обробку здійснювали з використанням прикладних програм MS Excel 2003, Biostat, Statistica 6. Достовірність отриманих даних визначали методом парного тесту із застосуванням t-критерію Стьюдента. Вірогідну відмінність у розподілі вибірок визначали за критерієм χ^2 . Значення $p < 0,05$ вважали вірогідним.

Результати та обговорення

Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів дав змогу у зразках геномної ДНК визначити три генотипи поліморфного локуса G894T гена eNOS. Установлено, що при розподілі аallelних варіантів гена eNOS (поліморфізм G894T) частота аallelів G і T в обох групах достовірно не відрізнялася ($\chi^2 = 1,32$; $p = 0,25$) (табл. 1). Мажорним аалелем у досліджуваній групі був G: його частота

Таблиця 1

Розподіл частот генотипів залежно від поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази (поліморфізм G894T) у хворих на цукровий діабет 2 типу, ускладнений дистальною симетричною полінейропатією

Генотип	Хворі (n = 110)	Контроль (n = 20)	χ^2 ; p	Відношення шансів	95 % довірчий інтервал
GG	0,364	0,350	$\chi^2 = 6,89$; $p = 0,03$	1,06	0,58—1,94
GT	0,418	0,563		0,56	0,31—1,00
TT	0,218	0,088		2,91	1,19—7,14

становила в контрольній групі 0,631, у хворих на ЦД 2 типу, ускладнений ДСПН, — 0,573. В основній групі спостерігали підвищення частоти мінорного алеля Т (0,427 проти 0,369).

Розподіл генотипів відповідав закону Гарді—Вайнберга [3]: контрольна група — $\chi^2 = 0,94$, група хворих — $\chi^2 = 0,82$. У групі хворих спостерігали велику частку гомозигот ТТ. Частота гомозиготних генотипів GG в обох групах була майже однаковою, гетерозиготних генотипів GT — більшою у групі хворих.

Гомозиготність за мінорним алелем Т підвищує ймовірність розвитку ДСПН на тлі ЦД 2 типу ($p < 0,05$), гомозиготність за мажорним алелем GG не має достовірного впливу на розвиток діабетичних неврологічних ускладнень у хворих на ЦД 2 типу, гетерозиготність, за даними нашого дослідження, асоціюється з найвищим ризиком розвитку синдрому діабетичної стопи.

Клінічні, біохімічні та функціональні показники у хворих на ЦД 2 типу, ускладнений ДСПН, стратифіковані за поліморфізмом G894T гена eNOS (табл. 2).

Вік хворих на ЦД 2 типу, носіїв трьох досліджених генотипів (GG, GT та TT), не відрізнявся. Не спо-

стерігали також значущих відмінностей за тривалістю ЦД.

При аналізі показників за шкалами NSS та NDS встановлено достовірно вищу на 26% оцінку за шкалою NSS у хворих з гомозиготним генотипом TT порівняно з носіями гетерозиготного генотипу. Оцінки за шкалою NDS у всіх носіїв досліджених генотипів достовірно не відрізнялися, однак найвищий показник спостерігали у хворих з генотипом TT.

Загальновідомо, що діабетична полінейропатія є наслідком насамперед метаболічних порушень у периферичних нервах, зокрема, спричинених гіперглікемією, активацією поліолового шляху обміну глюкози з накопиченням у нервових клітинах осмотично активних речовин; оксидантного стресу зі збільшенням утворення вільнорадикальних сполук; підвищення неферментативного глікозильовання білків нервів, ішемії нерва й іншими чинниками [6].

При вивченні особливостей вуглеводного обміну в основній групі хворих залежно від розподілу генотипів (див. табл. 2) встановлено, що в усіх обстежених показники глікемії натще були вірогідно вищими порівняно з контрольною групою, проте не

Таблиця 2

Клініко-лабораторні та функціональні характеристики хворих на цукровий діабет 2 типу з дистальною симетричною полінейропатією залежно від розподілу алельних варіантів гена ендотеліальної NO-синтази (поліморфізм G894T)

Показник	Генотип			Контроль (n = 20)
	GT (n = 46)	GG (n = 40)	TT (n = 24)	
Вік на час обстеження, роки	58,4 ± 1,5	57,2 ± 1,7	58,1 ± 2,0	55,8 ± 2,2
Тривалість ЦД, роки	6,9 ± 1,4	8,7 ± 1,0	8,1 ± 1,2	—
Шкала NSS, бали	5,1 ± 0,4	6,0 ± 0,6	6,9 ± 0,6 [#]	—
Шкала NDS, бали	5,0 ± 0,4	5,1 ± 0,4	5,3 ± 0,6	—
Глюкоза натще, ммоль/л	10,53 ± 1,87*	11,06 ± 1,07*	10,86 ± 1,07*	5,14 ± 0,36
Глікозильований гемоглобін, HbA _{1c} , %	8,35 ± 0,24*	9,65 ± 1,00*	9,98 ± 0,85**	5,72 ± 0,79
HOMA-IR	8,05 ± 0,32*	8,84 ± 0,69*	9,35 ± 0,76*	1,31 ± 0,18
Імунореактивний інсулін, мкОд/мл	24,78 ± 2,00*	27,00 ± 2,19*	27,58 ± 1,90*	12,92 ± 1,08
C-пептид, нг/мл	2,79 ± 0,06*	2,90 ± 0,028*	3,15 ± 0,26*	1,34 ± 0,14
Стимуляційна ЕНМГ				
Амплітуда моторної М-відповіді, мВ	6,50 ± 1,86*	5,80 ± 1,91*	4,80 ± 0,56**	9,50 ± 0,52
ШПЗ моторним волокном, м/с	41,20 ± 5,16*	37,20 ± 3,15*	37,10 ± 6,45*	53,50 ± 1,08
Голкова ЕНМГ				
Амплітуда ПРО, мкВ	587,1 ± 11,7*	571,3 ± 12,6*	589,6 ± 10,4*	432,0 ± 8,2
Тривалість ПРО, мс	13,7 ± 0,6*	14,1 ± 0,6*	13,8 ± 0,2*	11,6 ± 0,7
Поліфазність ПРО, %	53,8 ± 1,9*	48,5 ± 2,4*	52,6 ± 1,9*	18,2 ± 1,5

* Різниця щодо контрольної групи статистично значуща ($p < 0,05$).

Різниця щодо носіїв гетерозиготного генотипу статистично значуща ($p < 0,05$).

мали суттєвих відмінностей залежно від генотипу. Рівні ІРІ і С-пептиду у хворих з генотипом GT підвищувалися на 47,6 і 51,8% порівняно з контрольною групою, у хворих з генотипом GG — відповідно на 52,5 та 55,1%, у хворих з генотипом TT зазначені показники були найвищими і перевищували на 53,1 і на 62,8% відповідно контрольні значення. Індекс HOMA-IR у хворих з генотипом TT був найвищим порівняно з хворими з генотипами GT і GG, однак різниця була статистично недостовірною. При аналізі показників HbA_{1c} достовірне підвищення на 10,5% рівня HbA_{1c} відзначено у хворих з генотипом TT порівняно з групою пацієнтів з генотипом GT.

Аналіз функціонального стану периферичних нервів у хворих на ЦД 2 типу з ДСПН залежно від розподілу алельних варіантів гена ендотеліальної NO-синтази (G894T поліморфізму) (див. табл. 2) показав, що у пацієнтів з гомозиготним генотипом TT були найвираженішими ознаки аксонопатії, про що свідчило вірогідне зниження амплітуди моторної відповіді при ЕНМГ-тестуванні малоомілкового та великогомілкового нервів на 26,1% порівняно з носіями гетерозиготного генотипу ($p \leq 0,05$) та швидкості проведення збудження на 9,85% ($p > 0,05$).

При голковій ЕНМГ у 54,2% хворих на ЦД 2 типу з ДСПН зареєстровано аксонально-демієлізуювальний тип ураження нервових волокон, про що свідчило достовірне збільшення амплітуди і тривалості ПРО, а також поява великих поліфазних та

псевдополіфазних потенціалів порівняно із контрольною групою. При аналізі з урахуванням варіанта поліморфізму G894T гена eNOS достовірних відмінностей між носіями трьох генотипів в основній групі хворих не виявлено.

Таким чином, у результаті вивчення поліморфних варіантів G894T гена ендотеліальної NO-синтази у комплексі з клініко-лабораторними та функціональними показниками у хворих на ЦД 2 типу, ускладнений ДСПН, виявлено ймовірний вплив поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази на формування фенотипу, схильного до розвитку діабетичної полінейропатії.

Висновки

У хворих на ЦД 2 типу, ускладнений ДСПН, встановлено асоціацію гомозиготного генотипу TT поліморфізму G894T гена ендотеліальної NO-синтази з вищою оцінкою за шкалою NSS ($p < 0,05$), а також з показниками вуглеводного обміну (зростання рівня глікозильованого гемоглобіну) ($p < 0,05$).

Генетично зумовлений ризик появи виражених ознак діабетичної полінейропатії у хворих на ЦД 2 типу ($p \leq 0,05$) асоційований з наявністю гомозиготного генотипу TT, про що свідчать найвираженіші ЕНМГ-ознаки аксонопатії.

Гомозиготність за мінорним алелем підвищує ймовірність розвитку ДСПН на тлі ЦД 2 типу, тоді як гетерозиготність, за даними нашого дослідження, асоціюється з найнижчим ризиком розвитку тяжких ускладнень діабетичної полінейропатії.

Література

1. Власенко М. В. Ускладнення цукрового діабету — діабетична дистальна полінейропатія: патофізіологія і варіант патогенетичного лікування // Міжнар. ендокринолог. журн. — 2011. — № 7 (39). — С. 44—49.
2. Гриб В. А., Левицький В. А., Перцович В. М. та ін. Електроенцефалографічні показники у хворих на цукровий діабет 2-го типу, ускладнений полінейропатією, та їх морфологічні паралелі // Арх. клін. мед. — 2011. — № 1. — С. 20—25.
3. Лепендіна І. Н., Балановська Е. В., Чурносів М. І. Генетична структура населення Белгородської області. Розподіл і частота алельних варіантів біомаркерів генов // Генетика. — 2008. — Т. 44, № 3. — С. 1—15.
4. Майоров А. Ю. Конгрес IDF—2011: представлений новий алгоритм лікування хворих на СД 2 типу // Ефективна фармакотерапія. — 2012. — № 1. — С. 2—4.
5. Офіційні дані МЗ України (<http://www.moz.gov.ua>).
6. Скрипник Н. В. Особливості патогенезу та лікування діабетичної невропатії (огляд літератури) // Ендокринолог. — 2013. — Т. 18, № 1. — С. 64—68.
7. Abbott C. A., Malik R. A., Ross E. R. E. et al. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U. K. // Diabetes Care. — 2011. — N 34 (10). — P. 2220—2224.
8. Jira M., Zavadná E., Honzilková N. et al. Association of eNOS gene polymorphisms T-786C and G894T with blood pressure variability in man // Physiol. Res. — 2011. — Vol. 60. — P. 193—197.
9. Monti L. D., Barlassina C., Citterio L. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 1270—1275.
10. Ritt M., Ott C., Delles C. et al. Impact of the endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism on renal endothelial function in patients with type 2 diabetes // Pharmacogen. and Genom. — 2008. — Vol. 18, N 8. — P. 699—707.
11. Tesfaye S. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments // Diabetes Care. — 2010. — Vol. 33. — P. 2285—2293.

И. А. ЗОРИЙ, Н. В. ПАШКОВСКАЯ, В. М. ПАШКОВСКИЙ
Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы

Клинико-диагностические особенности дистальной симметричной полинейропатии у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы

Цель — оценить функциональное состояние периферических нервов и клинико-лабораторные показатели у больных сахарным диабетом (СД) 2 типа в зависимости от полиморфизма G894T гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS).

Материалы и методы. Проведено генотипирование 110 больных СД 2 типа, осложненным дистальной симметричной полинейропатией, и 80 практически здоровых лиц для определения аллельного полиморфизма G894T гена eNOS. Всем пациентам проводили неврологическое обследование по шкалам невропатического симптоматического подсчета (NSS), модифицированного невропатического дисфункционального подсчета (NDS), электронейромиографическое тестирование периферических нервов нижних конечностей и определяли показатели углеводного обмена.

Результаты. Установлена ассоциация гомозиготного генотипа TT полиморфизма G894T гена eNOS с более высокой оценкой по шкале NSS, с высоким уровнем гликозилированного гемоглобина ($p < 0,05$) и достоверным снижением амплитуды моторного ответа при электронейромиографическом тестировании периферических нервов.

Выводы. Гомозиготность по минорному аллелю повышает вероятность развития дистальной симметричной полинейропатии на фоне сахарного диабета 2 типа, тогда как гетерозиготность, по данным нашего исследования, ассоциируется с более низким риском развития тяжелых осложнений диабетической полинейропатии.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, дистальная симметричная полинейропатия, электронейромиографические показатели, углеводный обмен, полиморфизм G894T гена эндотелиальной NO-синтазы.

I. A. ZORIY, N. V. PASHKOVSKA, V. M. PASHKOVSKY
Bukovinian State Medical University, Chernivtsi

Clinical-diagnostic peculiarities of distal symmetrical polyneuropathy in patients with diabetes mellitus type II depending on polymorphism of endothelial NO-synthase gene

Objective — to study the peripheral nerves functional state and clinical-laboratory findings in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (DM), type II, depending on polymorphism of endothelial NO-synthase (eNOS) G894T gene.

Methods and subjects. Genetic typing of 110 patients with DM type II, complicated with distal symmetrical polyneuropathy, and 80 practically healthy individuals has been performed to detect allelic polymorphism of eNOS G894T gene. All the patients were examined by means of Neuropathy Symptomatic Scale (NSS) score, modified Neuropathy Dysfunctional Scale (NDS) score, electroneuromyographic testing of the peripheral nerves of the lower limbs, and the values of carbohydrate metabolism were detected.

Results. Association of homozygotic TT genotype by the unique polymorphism allele of eNOS G 894T gene with higher values of NSS-score, increasing of glycated hemoglobin level ($p < 0.05$) and a reliable decrease of motor response amplitudes detected by electroneuromyographic testing of the peripheral nerves has been found.

Conclusions. Homozygosis by a minor allele increases a probable development of distal symmetrical polyneuropathy against the ground of DM type II. At the same time, according to the findings of our research heterozygosis possesses the lowest risk of development of severe complications due to diabetic polyneuropathy.

Key words: non-insulin-dependent diabetes mellitus, type II, distal symmetrical polyneuropathy, electroneuromyographic values, carbohydrate metabolism, G894T gene polymorphism, endothelial NO-synthase.