

Значення фактору некрозу пухлин альфа в механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу



С. В. Зябліцев¹, О. П. Чернобривцев¹, Д. С. Зябліцев²

¹ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

² Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет», Київ

Останнім часом уже не викликає сумнівів патогенне значення прозапальних цитокінів і, у тому числі, фактора некрозу пухлин альфа (*TNFα*) для формування резистентності до інсуліну і механізмів розвитку цукрового діабету (ЦД) 2 типу [1]. Молекулярною основою цього ефекту є роль *TNFα* в передачі сигналу з інсулінового рецептору в адипоцитах: *TNFα* індукуює фосфорилування субстрату інсулінового рецептору (IRS-1) [2] за сериновими залишками 636/639 та інгібує фосфорилування тирозину, що запобігає подальшій активації шляхів PI3K/Akt- і Erk/MAP-кіназа та поглинанню глюкози [3]. Таке альтернативне фосфорилування серину/тирозинових IRS-1 в нормі регулює ефективність передачі сигналів інсуліну, тоді як при дії *TNFα* мультисайтове серин/тирозинове фосфорилування призведе до блокування взаємодії IRS-1 і пептиду юкта-мембранного домену, що переведе IRS-1 в неактивний стан і викличе резистентність до інсуліну [4].

У метааналізі [5] було встановлено наявність зв'язку алеля А промоторного поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* (ВШ = 1,63; 95 % ВІ 1,17—2,25) та генотипів за домінантною моделлю успадкування (*G/A + AA*) проти *G/G* (ВШ = 1,47; 95 % ВІ 1,17 — 1,85). Такий результат показав, що поліморфізм *rs1800629* гена *TNFα* дуже пов'язаний із ЦД 2 типу і алель А був алелем ризику. Необхідно зазначити, що поліморфізм *rs1800629* призведе до активацій експресії гена *TNFα*

та більш високому рівню у крові *TNFα*, що особливо проявляється при ЦД 2 типу [6—9].

Значення поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* було підтверджено в чисельних дослідженнях, де показана більш висока частота алеля А у хворих на ЦД 2 типу [6, 7] і особливо за наявності ускладнень — діабетичної ретинопатії [8], діабетичної виразки на стопі, що, на думку [9], було пов'язано із приростом рівнів у крові *TNFα* в таких хворих.

Разом із тим, у системному огляді публікацій із 2000 по 2016 роки, зробленим G. I. Luna та співавторами (2016), акцентовано увагу на спірності результатів визначення впливу поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* на ЦД 2 типу в різних популяціях, що, на думку авторів, пов'язано з етнічними розходженнями та диктує необхідність таких досліджень у кожній популяції окремо [10]. У роботах [11, 12] також надано суперечливі дані щодо ролі деяких біомаркерів запалення, зокрема — *TNFα*, у механізмах розвитку ЦД 2 типу та його ускладнень.

Отже, наведені дані стали підґрунтям для проведення комплексного дослідження ролі *TNFα* та генетичного поліморфізму у хворих на ЦД 2 типу з української популяції з різною тяжкістю захворювання та наявністю різних судинних ускладнень.

Мета роботи — з'ясувати значення *TNFα* і поліморфізму його гена *rs1800629* у механізмах розвитку судинних ускладнень ЦД 2 типу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідження включено дані 152 хворих із ЦД 2 типу, які не мали родинних зв'язків та були етнічними українцями. Вік пацієнтів — від 34 до 80 років, у середньому $53,9 \pm 8,4$ роки. Жінок було 95 (62,5 %), чоловіків — 57 (37,5 %). Відповідно до клінічних рекомендацій [13—16] за результатами клініко-лабораторних обстежень визначали наявність діабетичної ретинопатії, нефропатії за рівнями альбумінурії та швидкості клубочкової фільтрації, сенсорної полінейропатії, макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії. Відповідно до клінічної класифікації [13, 14] 1-й ступінь тяжкості не було виявлено в жодного пацієнта, 2-й ступінь — у 120 (78,9 %) та 3-й ступінь — у 32 (21,1 %) хворих. У цьому дослідженні хворих було розподілено на три групи. Для цього осіб із 2-м ступенем тяжкості було розподілено на дві групи: 1-у склали 57 (37,5 %) хворих та 2-у — 63 (41,4 %) хворих. Критерієм для їх розподілу було обрано рівень глікованого гемоглобіну (HbA1c): у 1-у групу були відібрані хворі з медіанним значенням рівня HbA1c 7,8 % (I і III квартилі склали 7,5 % і 8,1 %). Усі хворі 2-ї групи мали достеменно ($p = 2,5 \cdot 10^{-17}$) вищий рівень HbA1c (Me 10,0 %; I і III квартилі відповідно 9,4 % і 10,9 %). Хворі із 3-м ступенем тяжкості склали 3-ю групу. До контрольної групи було залучено 95 практично здорових осіб відповідного вікового та гендерного розподілу, які не мали порушень вуглеводного обміну. Наявність нефропатії визначали за рекомендаціями KDIGO, 2012 [15] окремо за наявністю мікроальбумінурії (більш за 30 мг/л A2, A3) та за рівнем швидкості клубочкової фільтрації (менш 60 мл/хв. $1,73 \text{ м}^2$; G2-G4; хворих із G5 у досліджуваній когорті не було).

У крові імуноферментним методом визначали рівень TNF α (Bender Medsystems, Австрія). Інтенсивність забарвлення продукту ферментативної реакції кількісно вимірювали на фотометрі Multiscan EX, Thermo Electron Corp. (Фінляндія).

Аналіз поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* (SNP у промоторному регіоні — 308G/A; генна локалізація бр21.33) — проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі (контекстна послідовність GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG[A/G]GGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC) в автоматичному ампліфікаторі Gene Amp[®] PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). На першому етапі дослідження проводили виділення геномної ДНК із цільної венозної крові з використанням стандартних реактивів PureLink[®] Genomic DNA Kit For Purification of Geno-

mic DNA; виробник INVITROGEN (США). Аналіз поліморфізму здійснено з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США).

Для статистичної обробки отриманих даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA). Після проведення тестів Колмогорова—Смирнова, Андерсона—Дарлінга був встановлений χ -квадрат, відмінний від нормального, характер розподілу варіаційних рядів ($p < 0,05$) відповідно, для описової статистики кількісних даних використовували середню (M) та стандартне відхилення (SD). Незалежні вибірки порівнювали із застосуванням критеріїв Kruskal—Wallis (H) і Mann—Whitney (U). Для порівняння категоріальних змінних використовували таблиці сполучення і непараметричні критерії ксі-квадрат (χ^2) Пірсона в модифікації Йейтса. У всіх випадках статистичного оцінювання значущість відмінностей враховували при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння рівнів у крові TNF α у групах хворих наведено на рисунку 1: показане середнє (M) та стандартне відхилення (SD).

Рівень цитокіну перевищував контрольний у 1-й і в 2-й групах відповідно в 4,0 ($p = 7,0 \cdot 10^{-25}$) та 4,7 ($p = 2,3 \cdot 10^{-26}$) рази. Найбільші значення TNF α відзначені у 3-й групі, які перевищували контроль у 7,1 рази ($p = 3,2 \cdot 10^{-17}$). Такі результати вказували на залежність активації цитокінового каскаду від тяжкості ЦД 2 типу та узгоджувалися з даними [1, 7, 17, 18].

Оскільки в даному дослідженні групи хворих відображали тяжкість перебігу захворювання, тобто, по суті, прогресію його ускладнень, було висунуто припущення про наявність впливу TNF α на розвиток ускладнень ЦД 2 типу. Для цього була виконана серія однофакторних логістичних регресійних розрахунків із використанням пакета GLZ (StatSoft, Inc., USA). У таблиці 1 наведені коефіцієнти регресії і статистична значущість їх відмінностей від нульової гіпотези; у якості залежних змінних обрано наявність ускладнень, у якості предиктора — вміст у крові TNF α .

Отже, рівень у крові TNF α сильно впливав на наявність ретинопатії ($p = 0,049$), нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($p = 0,007$), артеріальної гіпертензії ($p = 0,042$) та макроангіопатії нижніх кінцівок ($p < 0,001$). Ступінь впливу був максимальним на наявність макроангіопатії нижніх кінцівок ($\beta = 0,033$). Далі по зменшенню цього показника слідували ретинопатія ($\beta = 0,012$), нефропатія за швид-

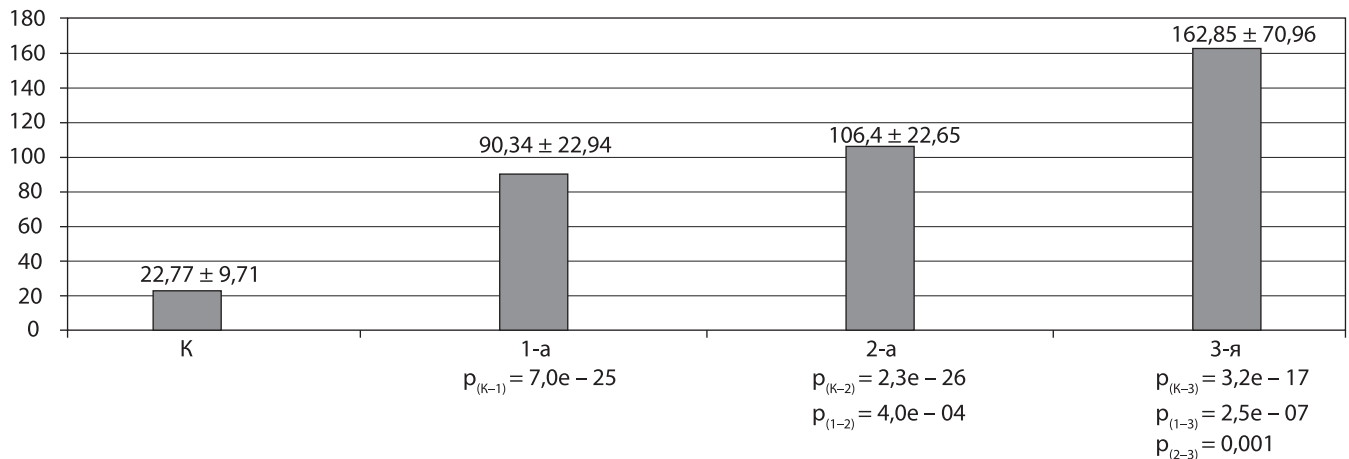


Рис. 1. Рівень у крові TNFα (нг/мл) по групах; $p(U)$ — статистична значущість розбіжностей між групами за критерієм U (Mann—Whitney U Test): K-1, K-2 і K-3 — між контролем і відповідними групами хворих; 1—2, 1—3 і 2—3 — між відповідними групами хворих.

кістю клубочкової фільтрації ($\beta = 0,011$) і артеріальної гіпертензії ($\beta = 0,007$).

Такі результати дозволили зробити деякі узагальнення. По-перше, ступінь збільшення рівня TNFα у крові мав патогенне значення для формування судинних ускладнень ЦД 2 типу — ретино- і нефропатії та артеріальної гіпертензії, що узгоджувалося з літературними даними [5—7]. Доведені раніше дані про високе патогенетичне значення «цитокінової бурі» [1, 7, 9] підтвердили отримані нами результати регресійного аналізу, особливо для макроангіопатії нижніх кінцівок. В американському дослідженні Victoria Van Asten та співавт. (2017) показано, що серед багатьох інших прозапальних маркерів рівень у крові TNFα мав суттєве значення для розвитку діабетичної стопи та остеомиєліту у таких хворих [11]. Дані про зв'язок TNFα з

розвитком остеомиєліту при діабетичній стопі підтверджено і в більш ранньому метааналізі [12].

Надалі було визначено зв'язок поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* з наявністю ЦД 2 типу, його ускладненнями та рівнем у крові TNFα. Поліморфізм *rs1800629* гена *TNFα* (-308G/A) представляє собою просту нуклеотидну заміну в промоторному регіоні гена, яка призводить до збільшення експресії та синтезу цього цитокіну [5, 8, 18].

Як засвідчили дані, що наведено у графічній та табличній формах на рисунку 2, у всіх хворих було відзначено значуще зменшення частоти предкового гомозиготного генотипу G/G (у 1,3 рази; $p = 0,02$) в порівнянні з контролем. Збільшення частот гетерозиготного генотипу G/A та мінорного генотипу A/A (відповідно, у 1,4 та 2,0 рази) в порівнянні з контролем

Таблиця 1

Вплив рівня у крові TNFα на наявність ускладнень ЦД 2 типу
(β -коефіцієнти регресії і статистична значущість їх відмінностей від нульової гіпотези)

Наявність ускладнення:	$\beta \pm SE$	Wald	p
— ретинопатії	0,012 ± 0,001	3,701	0,049
— сенсорної полінейропатії	0,004 ± 0,006	0,518	0,472
— нефропатії за ШКФ	0,011 ± 0,004	7,054	0,007
— нефропатії за — мікроальбумінурією	0,009 ± 0,006	2,171	0,141
— артеріальної гіпертензії	0,007 ± 0,007	3,899	0,042
— макроангіопатії нижніх — нижніх кінцівок	0,033 ± 0,007	22,116	< 0,001

Примітка. ШКФ — швидкість клубочкової фільтрації; β — коефіцієнт регресії; $\pm SE$ — стандартна похибка β -коефіцієнтів; Wald — показник Wald-статистики; p — значущість відмінності від нульової гіпотези (прийнята, якщо $p < 0,05$).

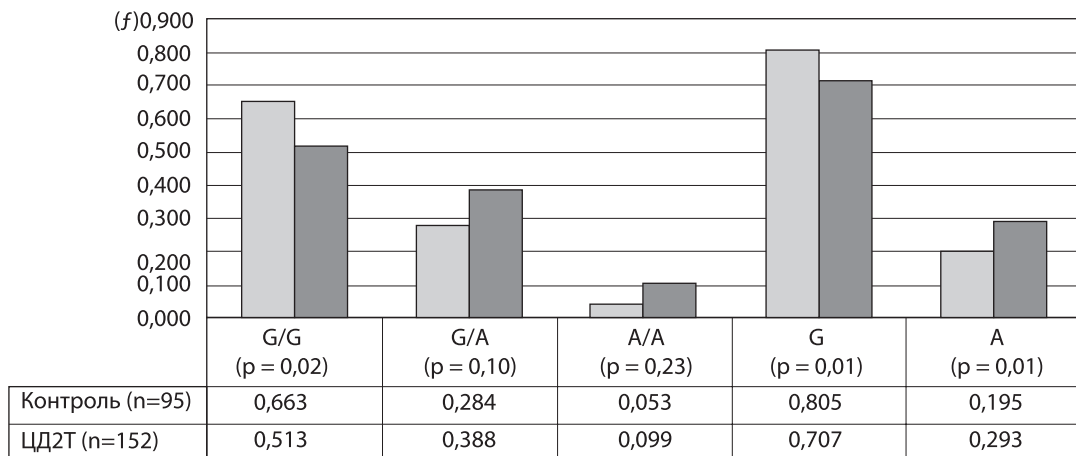


Рис. 2. Розподіл частот генотипів та алелів (f) $rs1800629$ гена $TNF\alpha$ між контрольною групою і групою хворих на ЦД 2 типу; p — статистична значущість розбіжностей частот показників між групами за двостороннім точним методом Фішера; на рисунку: за вертикальною віссю — частоти (f), за горизонтальною — генотипи і алелі.

було статистично не значущим (відповідно $p = 0,10$ та $0,24$). Також у хворих відзначено статистично значуще зменшення частоти предкового алеля G (в 1,13 рази; $p = 0,01$) та збільшення частоти мінорного алеля A (в 1,45 рази; $p = 0,01$) у порівнянні з контролем.

Таким чином, було показано, що розподіл генотипу G/G та обох алелів $rs1800629$ достеменно відрізнявся в українських хворих на ЦД 2 типу від контрольної групи. Також і в когорті польських хворих були показані аналогічні зсуви [18]. Виходячи із цього, надалі було розраховано вплив розподілу частот генотипів (табл. 2) та алелів (див. табл. 3) на наявність ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації із захворюванням. Тест Харді—Вайнберга для контролів та випадків відповідав випадковому характеру успадкування генотипів (відповідно $\chi^2 = 0,84$; $df = 1$; $p = 0,360$ та $\chi^2 = 0,60$; $df = 1$; $p = 0,438$).

Аналіз впливу генотипів по таблиці спряженості ($3 \cdot 3$) показав відсутність зв'язку із ЦД 2 типу ($\chi^2 = 5,65$; $p = 0,059$). На відміну від цього, порівняння

частот алелів за таблицею спряженості ($2 \cdot 2$) показало наявність такого впливу ($\chi^2 = 5,91$; $p = 0,015$).

Отже, алельний поліморфізм $rs1800629$ гена $TNF\alpha$ мав зв'язок із наявністю ЦД 2 типу, при цьому мінорний алель A збільшував в 1,7 рази шанси його розвитку (ВШ = 1,71; 95 % ДІ 1,11–2,65), тоді як предковий алель G такі шанси зменшував в 1,7 рази (ВШ = 0,58; 95 % ДІ 0,38—0,90).

Порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування (табл. 4) показало, що розподіл генотипів за домінантною моделлю (G/G проти $G/A+A/A$) мав статистичну значущість за критерієм χ^2 Пірсона ($\chi^2 = 5,37$; $p = 0,020$), що підтвердило наявність асоціації $rs1800629$ з ЦД 2 типу саме за умов наявності в генотипі мінорного алеля A (генотипи G/A та A/A).

Необхідно зазначити, що метааналіз Y. Zhao та співавт. (2014) [19], у який було включено 38 незалежних досліджень, підтвердив зв'язок поліморфізму $rs1800629$ гена $TNF\alpha$ із підвищеним ризиком ЦД 2 типу (ВШ = 1,21; 95 % ДІ 1,06—1,37; $p = 0,003$) саме за домі-

Таблиця 2

Вплив розподілу частот генотипів $rs1800629$ на наявність ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації із захворюванням (загальна модель успадкування)

Генотипи	ЦД 2 типу (n = 152), n (f)	Контроль (n = 95), n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
G/G	78 (0,513)	63 (0,663)	5,65	0,059	0,54	0,31—0,91
G/A	59 (0,388)	27 (0,284)			1,60	0,92—2,78
A/A	15 (0,099)	5 (0,053)			1,97	0,69—5,61

Примітка. n — кількість; f — частота; χ^2 — критерій Пірсона; p — статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ — відношення шансів; 95 % ДІ — 95 % довірчий інтервал для ВШ.

Таблиця 3

Вплив розподілу частот алелів *rs1800629* на наявність ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації із захворюванням (мультиплікативна модель успадкування)

Алелі	ЦД 2 типу (n = 304), n (f)	Контроль (n = 190), n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
G	215 (0,707)	153 (0,805)	5,91	0,015	0,58	0,38–0,90
A	89 (0,293)	37 (0,195)			1,71	1,11–2,65

Примітка. n — кількість; f — частота; χ^2 — критерій Пірсона; p — статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ — відношення шансів; 95 % ДІ — 95 % довірчий інтервал для ВШ.

нантною моделлю успадкування, особливо для азіатських носіїв мутації (GA+AA), які, як було розраховано, мали 39 % підвищення ризику ЦД 2 типу (ВШ = 1,39; 95 % ДІ 1,11—1,74; p = 0,004) у порівнянні з носіями дикого генотипу (G/G). У нашому дослідженні показано, що у хворих на ЦД 2 типу з української популяції носіїв мутаційних генотипів (GA+AA) ризик ЦД 2 типу також був суттєво підвищеним (на 87 %), що відповідало результатам цього метааналізу [19].

Логічним у цьому плані здавався подальший пошук впливу *rs1800629* на наявність окремих судинних ускладнень ЦД 2 типу, результати якого наведено в таблиці 5.

Як показали розрахунки, статистично значущий вплив генотипи *rs1800629* мали тільки на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\chi^2 = 6,38$; p = 0,041). На цей показник впливав і розподіл алелів ($\chi^2 = 6,78$; p = 0,009); на інші ускладнення розподіл генотипів (як і алелів) впливу не мав.

Виявленню зв'язку поліморфізмів генів прозапальних цитокінів (*TNFA*, *IL-6* і *IL-1 β*) із ЦД 2 типу та діабетичною нефропатією присвячено комплексне дослідження [20]. Найвищу асоціацію із ЦД 2 типу за наявності діабетичної нефропатії мав поліморфізм *rs1800629* гена *TNFA*: для генотипу A/A ВШ = 2,75 (95 % ВІ 1,64—4,59; p = 0,001). Отже, ці дані цілком збігалися

з результатами, отриманими в нашому дослідженні: в українській когорті хворих на ЦД 2 типу мінорний алель A та генотипи (G/A+A/A) були пов'язані із ЦД 2 типу та наявністю нефропатії у таких хворих.

Перевірка за критерієм Mann—Whitney показала вплив алелів на швидкість клубочкової фільтрації (U = 8211; p = 0,045). При цьому її рівень був достеменно нижчим за наявності алеля ризику A проти предкового алеля G. Це безпосередньо доводило патогенетичну роль мінорного алеля A в порушенні функції нирок при ЦД 2 типу.

Вплив поліморфізму *rs1800629* на рівень TNFA подано в таблиці 6.

З'ясовано, що рівень у крові TNFA був суттєво вищим (в 1,7 рази) за наявності генотипу ризику A/A проти предкового генотипу G/G (p < 0,001). Аналогічні результати демонстрував і вплив алелів (за критерієм Mann—Whitney U = 3665): у носіїв алеля A вміст у крові TNFA був в 1,3 рази вищим, ніж у носіїв алеля G (p = 2,6E-17).

Отримані результати підтверджували дані про те, що у хворих на ЦД 2 типу-носіїв мінорного генотипу A/A *rs1800629* експресія гену *TNFA* була збільшена більш ніж у 4 рази, що супроводжувалося суттєвим збільшенням рівнів у крові TNFA [20]. У дослідженнях [18, 21] встановлено, що мінорний генотип A/A і

Таблиця 4

Домінантна та рецесивна моделі успадкування впливу *rs1800629* гена *TNFA* на наявність ЦД 2 типу

Генотипи	ЦД 2 типу (n=152), n (f)	Контроль (n=95), n (f)	χ^2	p	ВШ	95 % ВІ
Домінантна модель успадкування						
G/G	78 (0,513)	63 (0,663)	5,37	0,020	0,54	0,31—0,91
G/A+A/A	74 (0,487)	32 (0,337)			1,87	1,10—3,18
Рецесивна модель успадкування						
G/G+G/A	137 (0,901)	90 (0,947)	1,67	0,200	0,51	0,18—1,44
A/A	15 (0,098)	5 (0,053)			1,97	0,69—5,61

Примітка. n — кількість; f — частота; χ^2 — критерій Пірсона; p — статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ — відношення шансів; 95 % ДІ — 95 % довірчий інтервал для ВШ.

Вплив генотипів *rs1800629* на наявність діабетичних ускладнень

Показник	Значення	Генотипи			χ^2	p
		G/G (n = 78), n (f)	G/A (n = 59), n (f)	A/A (n = 15), n (f)		
Наявність ДР	ні	19 (0,244)	12 (0,203)	2 (0,133)	1,01	0,604
	так	59 (0,756)	47 (0,797)	13 (0,867)		
Наявність ДСПН	ні	10 (0,128)	6 (0,102)	2 (0,133)	0,26	0,877
	так	68 (0,872)	53 (0,898)	13 (0,867)		
Наявність ДН за ШКФ	ні	45 (0,577)	25 (0,424)	4 (0,267)	6,38	0,041
	так	33 (0,423)	34 (0,576)	11 (0,733)		
Наявність ДН за МАУ	ні	16 (0,205)	7 (0,119)	2 (0,133)	1,94	0,378
	так	62 (0,795)	52 (0,881)	13 (0,867)		
Наявність АГ	ні	45 (0,577)	29 (0,491)	7 (0,467)	1,28	0,530
	так	33 (0,423)	30 (0,509)	8 (0,533)		
Наявність ДМАНК	ні	60 (0,769)	50 (0,848)	10 (0,667)	2,75	0,253
	так	18 (0,231)	9 (0,152)	5 (0,333)		

Примітка. ДР — діабетична ретинопатія; ДСПН — діабетична сенсорна полінейропатія; ДН — діабетична нефропатія; ШКФ — швидкість клубочкової фільтрації; МАУ — мікроальбумінурія; АГ — артеріальна гіпертензія; ДМАНК — діабетична макроангіопатія нижніх кінцівок; n — кількість; f — частота хворих із відповідними генотипами; p — статистична значущість розбіжностей між групами за критерієм χ^2 Пірсона.

алель *A rs1800629* значно підвищували рівні у крові TNF α , що було виражено більшою мірою у хворих із нефропатією [21].

У наших інших дослідженнях [22] показано, що зв'язок із наявністю діабетичної нефропатії, визначеної за швидкістю клубочкової фільтрації, мав поліморфізм *rs1799983* гена *NOS3* ($\chi^2 = 10,15$; $p = 0,06$); алель *T* був асоційований із ступенем декомпенсації діабету, погіршенням функції нирок та артеріальною гіпертензією ($p < 0,05$). Оскільки TNF α має безпосереднє відношення до посилення ушкодження ендотелію [17], стає очевидним тісний зв'язок цих двох факторів (NO і TNF α) в патогенезі діабетичної нефропатії ще й шляхом формування ендотеліальної дисфункції.

Отже, аналіз власних та літературних даних висвітлював загальну патогенетичну закономірність: наявність мінорного алеля *A* є патогенетичним фактором діабетичної нефропатії, а одним із механізмів

розвитку цього стану може бути надлишкова експресія гена *TNF α* , що призводить до надмірного синтезу прозапального цитокіну TNF α .

Таким чином, поліморфізм *rs1800629* гена *TNF α* мав зв'язок із наявністю ЦД 2 типу, а серед ускладнень — із нефропатією за швидкістю клубочкової фільтрації. Мінорний алель *A* сприяв зниженню швидкості клубочкової фільтрації, що пояснювало встановлений факт і реалізовувалося через значне підвищення рівня у крові TNF α .

ВИСНОВКИ

1. Вміст у крові TNF α при ЦД 2 типу значно підвищувався відповідно до тяжкості захворювання (максимально у 3-й стадії — у 7,1 рази; $p = 3,2e-17$), що мало зв'язок із наявністю ретинопатії ($\beta = 0,012$; $p = 0,049$), нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\beta = 0,011$; $p = 0,007$) та артеріальної гіпертензії

Вплив генотипу *rs1800629* на вміст TNF α у крові, M \pm SD

Показники	Генотипи			H	p
	G/G (n = 78)	G/A (n = 59)	A/A (n = 15)		
TNF α , пг/мл	98,02 \pm 52,22	116,93 \pm 20,96	167,96 \pm 46,12	67,42	< 0,001

Примітка. H — критерій Kruskal—Wallis; p — статистична значущість розбіжностей між групами.

($\beta = 0,007$; $p = 0,042$); максимальним він був для макроангіопатії нижніх кінцівок ($\beta = 0,033$; $p < 0,001$).

2. У хворих на ЦД 2 типу розподіл алелів *rs1800629* гена *TNFA* був пов'язаний із наявністю захворювання ($\chi^2 = 5,91$; $p = 0,015$). Мінорний алель *A* збільшував в 1,7 рази (ВШ = 1,71; 95 % ВІ 1,11—2,65) шанси ЦД 2 типу. Зв'язок із захворюванням за домінантною моделлю успадкування (*G/G* проти *G/A+A/A*) довів, що патогенна дія *rs1800629* проявлялася саме за умов наявності в генотипі мінорного алеля *A* (ВШ = 1,87; 95 % ВІ 1,10—3,18; $p = 0,020$).

3. Присутність алеля *A* сприяла зменшенню клубочкової фільтрації, що пояснювало зв'язок *rs1800629* із наявністю нефропатії ($\chi^2 = 6,38$; $p = 0,041$) та було обумовлено більш високими рівнями у крові TNF α в носіїв генотипів *G/A* (у 1,2 рази) та *A/A* (у 1,7 рази) в порівнянні з носіями предкового генотипу *G/G* ($p < 0,001$).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мали конфлікту інтересів при написанні цієї статті.

Джерела фінансування. Робота виконана в рамках держбюджетної НДР кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Роль генетичних поліморфізмів у патогенезі метаболічних порушень при цукровому діабеті 2 типу», № держреєстрації 0115U005799, строки виконання 2016—2017 рр.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2016 Oct;86:100-109. doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.028.
- IRS1 — Insulin receptor substrate 1 — Homo sapiens (Human) — IRS1 gene & protein». www.uniprot.org. Retrieved 2016-04-21.
- Takaguri A. [Elucidation of a new mechanism of onset of insulin resistance: effects of statins and tumor necrosis factor- α on insulin signal transduction]. *Yakugaku Zasshi*. 2018;138(11):1329-1334. doi: 10.1248/yakushi.18-00116. [In Japanese].
- Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine / threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012; 55(10):2565-2582. doi: 10.1007/s00125-012-2644-8.
- Liu ZH, Ding YL, Xiu LC, Pan HY, Liang Y, Zhong SQ, Liu WW, Rao SQ, Kong DL. A meta-analysis of the association between TNF- α -308G>A polymorphism and type 2 diabetes mellitus in Han Chinese population. *PLoS One*. 2013;8(3):e59421. doi: 10.1371/journal.pone.0059421.
- Jamil K, Jayaraman A, Ahmad J, Joshi S, Yerra SK. TNF- α -308G/A and -238G/A polymorphisms and its protein network associated with type 2 diabetes mellitus. *Saudi J Biol Sci*. 2017 Sep;24(6):1195-1203. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.05.012.
- Doody NE, Doweiko MM, Akam EC, Cox NJ, Bhatti JS, Singh P, Mastana SS. The role of TLR4, TNF- α and IL-1 β in type 2 diabetes mellitus development within a North Indian population. *Ann Hum Genet*. 2017 Jul;8 (4):141-146. doi: 10.1111/ahg.12197.
- Sesti LF, Crispim D, Canani LH, Polina ER, Rheinheimer J, Carvalho PS, Gross JL, Santos KG. The -308G>A polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes. *Invest*. 2015 Jan 29;56(2):1184-1190. doi: 10.1167/iovs.14-15758.
- Dhamodharan U, Viswanathan V, Krishnamoorthy E, Rajaram R, Aravindhan V. Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. *Gene*. 2015 Jul1;565(1):62-67. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.063.
- Luna GI, da Silva IC, Sanchez MN. Association between -308G/A TNFA polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Diabetes Res*. 2016. ID 6309484, 6 pages. doi: http://dx.doi.org/10.1155/2016/6309484.
- Van Asten VS A, Nichols A, La Fontaine J, Bhavan K, Peters EJ, Lavery LA. The value of inflammatory markers to diagnose and monitor diabetic foot osteomyelitis. *Int Wound J*. 2017 Feb;14(1):40-45. doi: 10.1111/iwj.12545.
- Van Asten VS A, Peters GE J, Xi Y, Lavery LA. The role of biomarkers to diagnose diabetic foot osteomyelitis. A meta-analysis. *Current Diabetes Rev*. 2016;12(4):396-402.
- Order of the Ministry of Health of Ukraine; dated December 21, 2012, No. 1118 «On Approval and Implementation of Medical-Technological Documents for the Standardization of Medical Aid in Type 2 Diabetes». Unified clinical protocol for primary and secondary (specialized) medical aid «Diabetes type 2». 2012. Kyiv. [In Ukrainian].
- Паньків ВІ. Цукровий діабет: діагностичні критерії, етіологія і патогенез. Міжнародний ендокринологічний журнал. 2013;8(56):53-64.
- KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(1):1-150.
- IDF Diabetes Atlas Eighth Edition, 2017:149. http://www.diabetesatlas.org/.
- Sinyachenko OV, Ziablitsev SV, Chernobryvtsev PA. [Endothelial dysfunction in glomerulonephritis]. Donetsk: New World, 2006:152. [In Russian].

18. Zagozda M, Sarnecka A, Staszczak Z, Gałkowska H, Andziak P, Olszewski WL, Durlak M. Genetic polymorphism and messenger ribonucleic acid concentrations of TNF α and TGF β genes in patients with chronic lower limb infections. *Surg Infect (Larchmt)*. 2015 Dec;16(6):822-828. doi: 10.1089/sur.2014.205.
19. Zhao Y, Li Z, Zhang L, Zhang Y, Yang Y, Tang Y, Fu P. The TNF-alpha -308G/A polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014 Jan;41(1):73-83. doi: 10.1007/s11033-013-2839-1.
20. Hameed I, Masoodi SR, Malik PA, Mir SA, Ghazanfar K, Ganai BA. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. *Gene*. 2018 Jun 30;661: 51-59. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.095.
21. Umapathy D, Krishnamoorthy E, Mariappanadar V, Viswanathan V, Ramkumar KM. Increased levels of circulating (TNF- α) is associated with (-308G/A) promoter polymorphism of TNF- α gene in Diabetic Nephropathy. *Int J Biol Macromol*. 2018 Feb;107(Pt B):2113-2121. doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2017.10.078.
22. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;4(64):35-44.

РЕЗЮМЕ

Значення фактору некрозу пухлин альфа в механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу

С. В. Зяблицев, О. П. Чернобривцев, Д. С. Зяблицев

Значення фактору некрозу пухлин альфа (TNF α) та поліморфізму його гена *rs1800629* для цукрового діабету (ЦД) 2 типу було показано в деяких дослідженнях, але не зовсім з'ясований механізм такого ефекту та роль в окремих етнічних популяціях хворих.

Мета роботи — з'ясувати значення TNF α і поліморфізму його гена *rs1800629* у механізмах розвитку судинних ускладнень ЦД 2 типу.

Матеріали та методи. До дослідження залучено дані 152 українських хворих із ЦД 2 типу віком від 34 до 80 років ($53,9 \pm 8,4$ років) та 95 практично здорових осіб (контроль). За результатами клініко-лабораторних обстежень визначали наявність ускладнень та встановлювали стадію захворювання. Рівень у крові TNF α визначали імуноферментним методом (Bender Medsystems, Австрія); поліморфізм *rs1800629* — методом полімеразної ланцюгової

реакції в реальному часі (TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology; США). Для статистичної обробки даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

Результати та обговорення. Рівень у крові TNF α при ЦД 2 типу значно підвищувався відповідно до тяжкості захворювання (максимально у 3-й стадії — у 7,1 рази; $p = 3,2e-17$), що впливало на розвиток ретинопатії ($\beta = 0,012$; $p = 0,049$), нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\beta = 0,011$; $p = 0,007$) та артеріальної гіпертензії ($\beta = 0,007$; $p = 0,042$); максимальним був вплив на розвиток макроангіопатії нижніх кінцівок ($\beta = 0,033$; $p < 0,001$). Мінорний алель *A rs1800629* збільшував (ВШ = 1,71; 95 % ВІ 1,11-2,65; $p = 0,015$) ризик ЦД 2 типу. Для генотипів зв'язок із захворюванням підтверджено за домінантною моделлю успадкування (G/G проти G/A+A/A; ВШ = 1,87; 95 % ВІ 1,10-3,18; $p = 0,020$). Алель *A* сприяв зменшенню швидкості клубочкової фільтрації та мав зв'язок із наявністю нефропатії ($\chi^2 = 6,38$; $p = 0,041$). Це могло бути обумовлено більш високими рівнями у крові TNF α у носіїв генотипів G/A (у 1,2 рази) та A/A (у 1,7 рази) в порівнянні з носіями генотипу G/G ($p < 0,001$).

Висновки. Наявність алеля *A rs1800629* є фактором розвитку діабетичної нефропатії, а одним із механізмів розвитку судинних ускладнень ЦД 2 типу може бути надлишкова експресія гену *TNF α* , що призводить до надмірного синтезу TNF α .

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, нефропатія, TNF α , *rs1800629*.

РЕЗЮМЕ

Значение фактора некроза опухоли альфа в механизмах развития нефропатии при сахарном диабете 2 типа

С. В. Зяблицев, А. П. Чернобривцев, Д. С. Зяблицев

Значение фактора некроза опухолей альфа (TNF α) и полиморфизма его гена *rs1800629* для сахарного диабета (СД) 2 типа было показано в некоторых исследованиях, но не совсем выяснен механизм такого эффекта и роль в отдельных этнических популяциях больных.

Цель работы — выяснить значение TNF α и полиморфизма его гена *rs1800629* в механизмах развития сосудистых осложнений СД 2 типа.

Материалы и методы. К исследованию привлечены данные 152 украинских больных с СД 2 типа в возрасте от 34 до 80 лет ($53,9 \pm 8,4$ лет) и 95 практически здоровых лиц (контроль). По резуль-

татам клініко-лабораторних обстежень визначали наявність ускладнень і встановлювали стадію захворювання. Рівень в крові TNF α визначали імуноферментним методом (Bender Medsystems, Австрія) поліморфізм *rs1800629* — методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology; США). Для статистичної обробки даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

Результати і обговорення. Рівень в крові TNF α при СД 2 типу значно підвищувався, що відповідає ступеню тяжкості захворювання (максимально в 3-й стадії — в 7,1 раз; $p = 3,2 \times 10^{-17}$) і впливало на розвиток ретинопатії ($\beta = 0,012$; $p = 0,049$), нефропатії по швидкості клубочкової фільтрації ($\beta = 0,011$; $p = 0,007$) і артеріальної гіпертензії ($\beta = 0,007$; $p = 0,042$), найбільш впливало на розвиток макроангіопатій нижніх кінцівок ($\beta = 0,033$; $p < 0,001$). Мінорний алель *A rs1800629* збільшував (ОШ = 1,71; 95 % ВІ 1,11-2,65; $p = 0,015$) ризик СД 2 типу. Для генотипів зв'язок з захворюванням підтверджено в домінуючій моделі успадкування (*G/G* проти *G/A+A/A*; ОШ = 1,87; 95 % ДІ 1,10-3,18; $p = 0,020$). Алель *A* сприяв зменшенню швидкості клубочкової фільтрації і мав зв'язок з наявністю нефропатії ($\chi^2 = 6,38$; $p = 0,041$). Це могло бути обумовлено більш високими рівнями в крові TNF α у носіїв генотипів *G/A* (в 1,2 раз) і *A/A* (в 1,7 раз) порівняно з носіями генотипу *G/G* ($p < 0,001$).

Висновки. Наявність алеля *A rs1800629* є фактором розвитку діабетическої нефропатії, а одним з механізмів розвитку судинних ускладнень СД 2 типу може бути надмірна експресія гена *TNF α* , що призводить до надмірного синтезу TNF α .

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, нефропатія, TNF α , *rs1800629*.

SUMMARY

Significance of the tumor necrotic factor alpha in mechanisms of nephropathy development in type 2 diabetes mellitus

S. V. Ziablitsev, O. P. Chernobrytsev, D. S. Ziablitsev

The value of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and the polymorphism of its gene *rs1800629* for development of type 2 diabetes mellitus (DM) has been shown

in some studies but the mechanism of this effect and its role in some ethnic populations of patients is not fully understood.

Objective — to determine the value of TNF α and the polymorphism of its gene *rs1800629* in mechanisms of vascular complications development in type 2 diabetes.

Materials and methods. The study involved data from 152 Ukrainian patients with type 2 DM, aged 34—80 years (53.9 ± 8.4 years) and 95 healthy persons (control). According to the results of clinical and laboratory examinations, the presence of complications was determined and the stage of the disease was established. The blood level of TNF α was determined by the immunoenzyme method (Bender Medsystems, Austria); polymorphism *rs1800629* — by real time polymerase chain reaction (TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology, USA). Statistical data processing was performed by Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

Results and discussion. The blood level of TNF α in type 2 DM significantly increased in accordance with the severity of the disease (the maximum in the third stage — 7.1 times; $p = 3.2 \times 10^{-17}$), which influenced the development of retinopathy ($\beta = 0.012$; $p = 0.049$), nephropathy by glomerular filtration rate ($\beta = 0.011$; $p = 0.007$) and arterial hypertension ($\beta = 0.007$; $p = 0.042$); the maximum was the effect on the development of macroangiopathy of the lower extremities ($\beta = 0.033$; $p < 0.001$). Minor allele *A rs1800629* increased (OR = 1.71; 95 % CI 1.11-2.65; $p = 0.015$) risk of type 2 DM. For genotypes the connection with the disease is confirmed by the dominant model of inheritance (*G/G* versus *G/A+A/A*; OR = 1.87; 95 % CI 1.10-3.18; $p = 0.020$). Allele *A* contributed to decrease of glomerular filtration rate and was associated with nephropathy ($\chi^2 = 6.38$; $p = 0.041$). This could be due to higher TNF α levels in *G/A* genotypes-carriers (1.2 times) and *A/A* (1.7 fold) compared to genotype *G/G*-carriers ($p < 0.001$).

Conclusion. The presence of allele *A rs1800629* was an important factor in the diabetic nephropathy development; one of the mechanisms of the vascular diabetic complications development was excessive expression of the *TNF α* gene, resulting in excessive synthesis of TNF α .

Key words: type 2 diabetes mellitus, nephropathy, TNF α , *rs1800629*.

Дата надходження до редакції 28.01.2019 р.