

ЗНАЧЕННЯ ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИН АЛЬФА У РОЗВИТКУ НЕФРОПАТІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПУ

¹Зяблицев С.В. (ORCID 0000-0002-5309-3728),

¹Чернобровцев О.П.,

²Зяблицев Д.С.

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

²Київський медичний університет, Київ, Україна

zsv1965@gmail.com

Актуальність. Значення фактору некрозу пухлин альфа (TNF α) та поліморфізму його гена *rs1800629* для розвитку цукрового діабету (ЦД) 2 типу було показано у ряді досліджень, але залишається нез'ясованим механізм такого ефекту та роль у окремих етнічних популяціях хворих.

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

Матеріали та методи. До дослідження залучено дані 152 українських хворих з 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 у реальному часі (TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology; США). Для статистичної обробки даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

Результати. Рівень у крові TNF α при ЦД 2 типу значно підвищувався згідно до ступеню 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 ($\beta=0,033$; $p<0,001$). Мінорна алель *A rs1800629* збільшувала (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* сприяла зменшенню швидкості клубочкової фільтрації та мала зв'язок з розвитком 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) у порівнянні з носіями генотипу *G/G* ($p<0,001$).

Висновок. Наявність алелі *A rs1800629* є фактором розвитку діабетичної нефропатії, а одним з 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*

Актуальність. Останнім часом вже не викликає сумнівів патогенне значення прозапальних цитокінів і, у тому числі, фактору некрозу пухлин альфа (TNF β) для формуванні резистентності до інсуліну і розвитку цукрового діабету (ЦД) 2 типу [8]. Молекулярною основою цього ефекту є роль TNF α у передачі сигналу з інсулінового рецептору в адипоцитах: TNF- α індукуює фосфорилування субстрату інсулінового рецептору (IRS-1) [6] за сериновими залишками 636/639 і інгібує фосфорилування тирозину, що запобігає подальшій активації шляхів PI3K/Akt- і Erk/MAP-кіназ та поглинанню глюкози [15]. Таке альтернативне фосфорилування серину/тирозинових IRS-1 в нормі регулює ефективність передачі сигналів інсуліну, тоді як при дії TNF- α мультисайтове серин/тирозинове фосфорилування призводить до блокування взаємодії IRS-1 і пептиду юкстамембранного домену,

що переводить IRS-1 в неактивний стан і викликає резистентність до інсуліну [4].

У мета-аналізі [9] було встановлено наявність зв'язку алелі *A* промоторного поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* (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 *TNF α* сильно зв'язаний з ЦД 2 типу, і алель *A* була алеллю ризику. Необхідно зазначити, що поліморфізм *rs1800629* призводить до активації експресії гена *TNF α* та більш високому рівню у крові TNF α , що особливо проявляється при ЦД 2 типу [2, 3, 7, 13].

Значення поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* було підтверджено у чисельних дослідженнях, де показана більш висока частота алелі *A* у хворих на

ЦД 2 типу [3, 7], і особливо за наявності ускладнень – діабетичної ретинопатії [13], діабетичної виразки на стопі. Існує думка [2], що це пов'язано з приростом рівнів у крові $TNF\alpha$ у таких хворих.

Разом з тим, системний огляд публікацій з 2000 по 2016 роки звернув увагу на спірність результатів визначення впливу поліморфізму *rs1800629* гену $TNF\alpha$ на розвиток ЦД 2 типу у різних популяціях, що, на думку авторів, пов'язане з етнічними розходженнями та диктує необхідність таких досліджень у кожній популяції окремо [10]. Також і у роботах [17, 18] надані суперечливі дані щодо ролі деяких біомаркерів запалення, зокрема $TNF\alpha$, у розвитку ЦД 2 типу та його ускладнень.

Отже, наведені дані стали підґрунтям для проведення комплексного дослідження ролі $TNF\alpha$ та генетичного поліморфізму у хворих на ЦД 2 типу з української популяції з різним ступенем тяжкості захворювання та наявністю різних судинних ускладнень.

Мета: з'ясувати значення $TNF\alpha$ і поліморфізму його гену *rs1800629* у розвитку ЦД 2 типу та деяких його судинних ускладнень.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

До дослідження включено дані 152 хворих з ЦД 2 типу, які не мали родинних зв'язків, та були етнічними українцями. Вік пацієнтів склав від 34 до 80 років, у середньому $53,9 \pm 8,4$ років. Жінок було 95 (62,5 %), чоловіків – 57 (37,5 %). Згідно до клінічних рекомендацій [5, 11, 12], за результатами клініко-лабораторних обстежень, визначали наявність діабетичних ретинопатії, нефропатії за рівнями альбумінурії та швидкості клубочкової фільтрації, сенсорної полінейропатії, макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії. Згідно до клінічної класифікації [11, 12], 1 ступінь тяжкості не була виявлена у жодного пацієнта, 2 ступінь – у 120 (78,9 %) та 3 ступінь – у 32 (21,1 %) хворих. У цьому дослідженні хворих було розподілено на три групи. Для цього осіб із 2 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 ступінь компенсації ЦД 2 типу за рівнем глікованого гемоглобіну ($HbA1c$): в 1-у групу були залучені хворі в стані компенсації або задовільної компенсації рівня гіперглікемії ($HbA1c$ на рівні 7-9 %); до 2-ї – з низькою якістю глікемічного контролю у стані декомпенсації ($HbA1c$ більше 9 %). Хворі з 3 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.

У крові імуноферментним методом визначали рівень $TNF\alpha$ (Bender Medsystems, Австрія). Інтен-

сивність забарвлення продукту ферментативної реакції кількісно вимірювали на фотометрі Multiscan EX, Thermo Electron Corp. (Фінляндія).

Аналіз поліморфізму *rs1800629* гену $TNF\alpha$ (SNP у промоторному регіоні -308G/A; генна локалізація 6p21.33) проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі (контекстна послідовність *GAGGCAATAGTTTTGAGGGGCATG-[A/G]GGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC*) в автоматичному ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). На першому етапі дослідження проводили виділення геномної ДНК з цільної венозної крові з використанням стандартних реактивів PureLink® Genomic DNA Kit For Purification of Genomic 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-Смірнова, Андерсона-Дарлінга і ч-квадрат був встановлений 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 у модифікації Йейтса. У всіх випадках статистичного оцінювання значущість відмінностей враховували при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння рівнів у крові $TNF\alpha$ у групах хворих наведено на рисунку 1: показана середня (M) та стандартне відхилення (SD).

Рівень цитокіну перевищував контрольний у 1-й і у 2-й групах, відповідно, у 4,0 ($p = 7,0e-25$) і 4,7 ($p = 2,3e-26$) рази. Найбільші значення $TNF\alpha$ відмічені у 3-й групі, які перевищували контроль у 7,1 рази ($p = 3,2e-17$). Такі результати вказували на залежність активації цитокінового каскаду від тяжкості ЦД 2 типу, та узгоджувалися з даними ряду дослідників [3, 8, 14, 19].

Оскільки, у даному дослідженні групи хворих відображали тяжкість перебігу захворювання, тобто, по суті, – прогресію його ускладнень, було висунуто припущення про наявність впливу $TNF\alpha$ на розвиток ускладнень ЦД 2 типу. Для цього була виконана серія однофакторних логістичних регресійних розрахунків з використанням пакета GLZ (StatSoft, Inc., USA). У таблиці 1 наведені коефіціє-

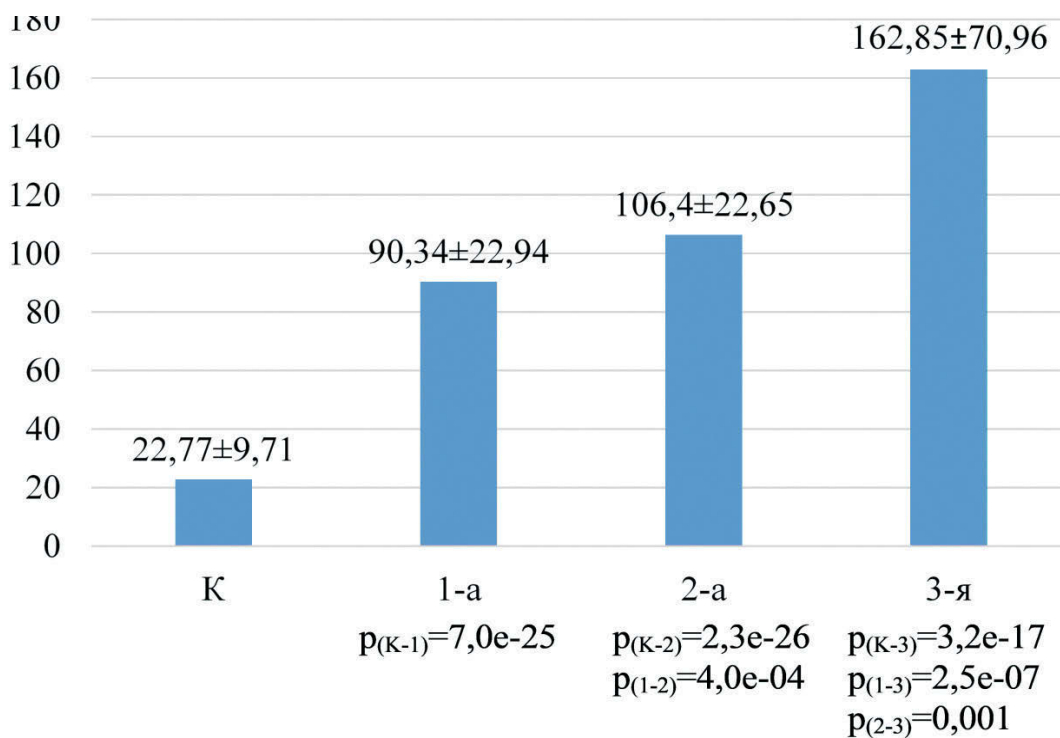


Рис. 1. Рівень у крові TNFα (пг/мл) по групам; $p_{(U)}$ – статистична значущість розбіжностей між групами за критерієм U (Mann-Whitney U Test): K-1, K-2 і K-3 – між контролем і відповідними групами хворих; 1-2, 1-3 і 2-3 – між відповідними групами хворих

нти регресії і статистична значущість їх відмінностей від нульової гіпотези; у якості залежних змінних обрано розвиток ускладнень, у якості предиктору – рівень у крові TNFα.

Отже, рівень у крові TNFβ 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 була максимальною на розвиток макроангіопатії нижніх кінцівок ($\beta=0,033$). Далі по зменшенню цього показника слідували ретинопатія ($\beta=0,012$), нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації ($\beta=0,011$) і артеріальна гіпертензія ($\beta=0,007$).

Такі результати дозволили зробити деякі узагальнення. По-перше, ступінь збільшення рівня TNFα у крові мав патогенне значення для розвитку судинних ускладнень ЦД 2 типу – ретино- і нефропатії та артеріальної гіпертензії, що узгоджувалося з літературними даними [3, 7, 9]. Доведені раніше дані про високе патогенетичне значення «цитокінової бурі» [2, 3, 8] підтвердили отримані нами результати регресійного аналізу, особливо для макроангіопатії нижніх кінцівок. У американському дослідженні 2017 року показано, що серед багатьох інших прозапальних маркерів рівень у крові TNFα мав суттєве значення для розвитку діабетичної стопи та остемієліту у таких хворих [17]. Дані про

Таблиця 1

Вплив рівня у крові TNFα на розвиток ускладнень ЦД 2 типу (в-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 мікроальбумінурєю	0,009±0,006	2,171	0,141
- артеріальної гіпертензії	0,007±0,007	3,899	0,042
- макроангіопатії нижніх кінцівок	0,033±0,007	22,116	<0,001

Примітки: ШКФ – швидкість клубочкової фільтрації; в – коефіцієнт регресії; ±SE – стандартна похибка в-коефіцієнтів; Wald – показник Wald-статистики; p – значущість відмінності від нульової гіпотези (прийнята, якщо $p<0,05$)

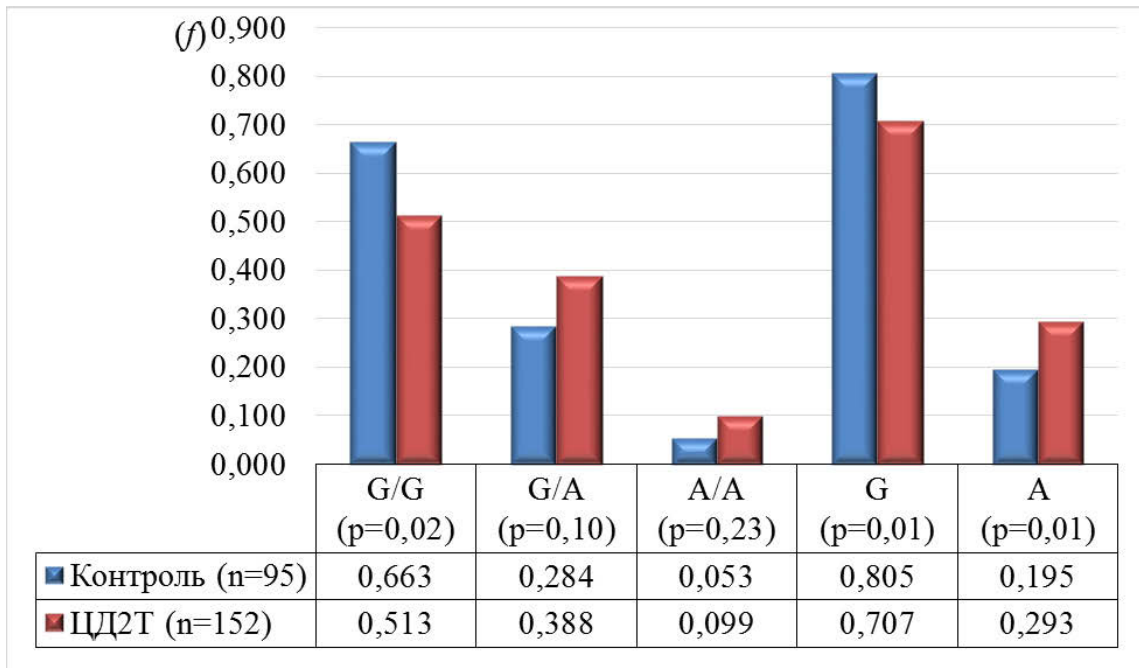


Рис. 2. Розподіл частот генотипів і алелей (f) $rs1800629$ гена $TNF\alpha$ між контрольною групою і групою хворих на ЦД 2 типу; p – статистична значущість розбіжностей частот показників між групами за двостороннім точним методом Фішера; на рисунку: за вертикальною віссю – частоти (f), за горизонтальною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

зв'язок $TNF\alpha$ з розвитком остеомієліту при діабетичній стопі підтверджено і у більш ранньому мета-аналізі [18].

Надалі було визначено зв'язок поліморфізму $rs1800629$ гена $TNF\alpha$ з розвитком ЦД 2 типу, його ускладненнями та рівнем у крові $TNF\alpha$. Поліморфізм $rs1800629$ гена $TNF\alpha$ (-308G/A) представляє собою просту нуклеотидну заміну у промоторному регіоні гена, яка призводить до збільшення експресії та синтезу цього цитокіну [9, 13, 19].

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

(відповідно, у 1,4 та 2,0 рази) у порівнянні з контролем було статистично не значущим (відповідно, $p=0,10$ та $0,24$). Також у хворих відмічено статистично значуще зменшення частоти предкової алелі G (у 1,13 рази; $p=0,01$) та збільшення частоти мінорної алелі A (у 1,45 рази; $p=0,01$) у порівнянні з контролем.

Таким чином, було показано, що розподіл генотипу G/G і обох алелей $rs1800629$ достеменно відрізнявся в українських хворих на ЦД 2 типу від контрольної групи. Також і у когорті польських хворих були показані аналогічні зсуви [19]. Виходячи з цього, надалі було розраховано вплив розподілу частот генотипів (табл. 2) та алелей (табл. 3) на розвиток ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації з захворюванням. Тест Харді-Вайнберга для контролів та ви-

Таблиця 2
Вплив розподілу частот генотипів $rs1800629$ на розвиток ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації з 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

Примітки: n – кількість; f – частота; χ^2 – критерій Пірсона; p – статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ – відношення шансів; 95 % ВІ – 95 % довірчий інтервал для ВШ

Таблиця 3

Вплив розподілу частот алелей *rs1800629* на розвиток ЦД 2 типу і ступінь їх асоціації з 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

Примітки: ті самі, що у таблиці 2

Таблиця 4

Домінантна та рецесивна моделі успадкування впливу *rs1800629* гена *TNFA* на розвиток 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

Примітки: n – кількість; f – частота; χ^2 – критерій Пірсона; p – статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ – відношення шансів; 95 % ВІ – 95 % вірогідний інтервал для ВШ

Таблиця 5

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)		

Примітки: 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 з відповідними генотипами; p – статистична значущість розбіжностей між групами за критерієм χ^2 Пірсона

падків 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 (3×3) показав відсутність зв'язку з ЦД 2 типу ($\chi^2=5,65$; p=0,059). На відміну від цього, порівняння частот алелей за таблицею спряженості (2×2), показало наявність такого впливу ($\chi^2=5,91$; p=0,015).

Отже, алельний поліморфізм *rs1800629* гена *TNFA* мав зв'язок із розвитком ЦД 2 типу, при цьому мінорна алель A збільшувала у 1,7 рази шанси розвитку ЦД 2 типу (ВШ=1,71; 95% ВІ 1,11-2,65), тоді як предкова алель G такі шанси зменшувала у 1,7 рази (ВШ=0,58; 95% ВІ 0,38-0,90).

Порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування (табл. 4) показало, що розподіл гено-

Таблиця 6

Вплив генотипу *rs1800629* на вміст TNF β 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

Примітки: H – критерій Kruskal-Wallis; p – статистична значущість розбіжностей між групами

типів 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 у генотипі мінорної алелі A (генотипи G/A та A/A).

Необхідно зазначити, що мета-аналіз [20], в який було включено 38 незалежних досліджень, підтвердив зв'язок поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* з підвищеним ризиком розвитку ЦД 2 типу (ВШ=1,21; 95% ВІ 1,06-1,37; $p=0,003$) саме за домінантною моделлю успадкування, особливо, для азійських носіїв мутації (GA+AA), які, як було розраховано, мали 39 % підвищення ризику ЦД 2 типу (ВШ=1,39; 95 % ВІ 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 мета-аналізу [20].

Логічним у цьому плані здавався подальший пошук впливу *rs1800629* на розвиток окремих судинних ускладнень ЦД 2 типу, результати якого наведено у 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 самий показник впливав і розподіл алелей ($\chi^2=6,78$; $p=0,009$); на інші ускладнення розподіл генотипів (як і алелей) впливу не мав.

Виявленню зв'язку поліморфізмів генів прозапальних цитокінів (*TNF α* , *IL-6* і *IL-1 β*) з ЦД 2 типу і діабетичною нефропатією присвячено комплексне дослідження [4]. Найвищу асоціацію з ЦД 2 типу за наявності діабетичної нефропатії мав поліморфізм *rs1800629* гена *TNF α* : для генотипу A/A ВШ=2,75 (95% ВІ 1,64-4,59; $p=0,001$). Отже, ці дані цілком збіглися з результатами, отриманими у нашому дослідженні: в українській когорті хворих на ЦД 2 типу мінорна алель A та генотипи (G/A+A/A) були пов'язані з ЦД 2 типу та розвитком нефропатії у таких хворих.

Перевірка за критерієм Mann-Whitney показала наявність впливу алелей на швидкість клубочкової фільтрації (U=8211; $p=0,045$). При цьому її рівень був достеменно нижчим за наявності алелі ризику A

проти предкової алелі G. Це безпосередньо доводило патогенетичну роль мінорної алелі A у порушенні функції нирок при ЦД 2 типу.

Вплив поліморфізму *rs1800629* на рівень TNF β подано у таблиці 6.

З'ясовано, що рівень у крові TNF α був суттєво вищим (у 1,7 рази) за наявності генотипу ризику A/A проти предкового генотипу G/G ($p<0,001$). Аналогічні результати демонстрував і вплив алелей (за критерієм Mann-Whitney U=3665): у носіїв алелі A вміст у крові TNF α був у 1,3 рази вищим, ніж у носіїв алелі 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 гена *TNF α* була збільшена більш ніж у 4 рази, що супроводжувалося суттєвим збільшенням рівнів у крові TNF α [4]. У дослідженнях [16, 19] встановлено, що мінорний генотип A/A і алель A *rs1800629* значно підвищували рівні у крові TNF α , що було виражено більшою мірою у хворих з нефропатією [16].

Таким чином, аналіз власних та літературних даних висвітлював загальну патогенетичну закономірність: наявність мінорної алелі A є патогенетичним фактором розвитку діабетичної нефропатії, а одним з механізмів розвитку цього стану може бути надлишкова експресія гена *TNF α* , що призводить до надмірного синтезу прозапального цитокіну TNF α .

Отже, поліморфізм *rs1800629* гена *TNF β* мав зв'язок з розвитком ЦД 2 типу, а серед ускладнень – з розвитком нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації. Мінорна алель A сприяла зниженню швидкості клубочкової фільтрації, що пояснювало встановлений факт і реалізувалося через значне підвищення рівню у крові TNF α .

ВИСНОВКИ

1. Рівень у крові TNF α при ЦД 2 типу значно підвищувався згідно до ступеню 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 ($\beta=0,033$; $p<0,001$).

2. У хворих на ЦД 2 типу розподіл алелей *rs1800629* гена *TNF α* був пов'язаний з розвитком захворювання ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$). Мінорна алель *A* збільшувала у 1,7 рази (ВШ=1,71; 95 % ВІ 1,11-2,65) шанси розвитку 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 у генотипі мінорної алелі *A* (ВШ=1,87; 95 % ВІ 1,10-3,18; $p=0,020$).

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

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів.

Джерела фінансування. Робота виконана у 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 р.р.

REFERENCES

- Copps K.D., White M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2 // *Diabetologia*. 2012; 55 (10): 2565-82. DOI: 10.1007/s00125-012-2644-8.
- 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; 565 (1): 62-7. DOI: 10.1016/j.gene.2015.03.063.
- Doody N.E., Doweiko M.M., Akam E.C., Cox N.J., Bhatti J.S., Singh P., Mastana S.S. 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; 81 (4): 141-6. DOI: 10.1111/ahg.12197
- Hameed I., Masoodi S.R., Malik P.A., Mir S.A., Ghazanfar K., Ganai B.A. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression // *Gene*. 2018; 661: 51-9. DOI: 10.1016/j.gene.2018.03.095.
- IDF Diabetes Atlas Eighth Edition // 2017. 149. Access mode: <http://www.diabetesatlas.org/>
- IRS1 – Insulin receptor substrate 1 – Homo sapiens (Human) – IRS1 gene & protein”. Access mode: www.uniprot.org. Retrieved 2016-04-21.
- Jamil K., Jayaraman A., Ahmad J., Joshi S., Yerra S.K. TNF-alpha -308G/A and -238G/A polymorphisms and its protein network associated with type 2 diabetes mellitus // *Saudi J Biol Sci*. 2017; 24 (6): 1195-203. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.05.012
- 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; 86: 100-9. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.06.028.
- Liu Z.H., Ding Y.L., Xiu L.C., Pan H.Y., Liang Y., Zhong S.Q., Liu W.W., Rao S.Q., Kong D.L. 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.
- Luna G.I., da Silva I.C., Sanchez M.N. Association between -308G/A TNFA polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a systematic review // *J Diabetes Res*. 2016. DOI: 2016:6309484
- 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]
- Pankiv V.I. Diabetes mellitus: diagnostic criteria, etiology and pathogenesis // *International Endocrinology Journal*. 2013; 8 (56): 53-64. [In Ukrainian]. Access mode: <http://www.mif-ua.com/archive/article/37775>
- Sesti L.F., Crispim D., Canani L.H., Polina E.R., Rheinheimer J., Carvalho P.S., Gross J.L., Santos K.G. The -308G>A polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56 (2): 1184-90. DOI: 10.1167/iovs.14-15758.
- Sinyachenko O.V., Ziablitsev S.V., Chernobryvtsev P.A. [Endothelial dysfunction in glomerulonephritis] / Donetsk: New World, 2006. 152 s. [In Russian]. Access mode: http://www.bookvamed.com.ua/product_info.php?products_id=114
- 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): 1329-34. [In Japanese]. DOI: 10.1248/yakushi.18-00116.
- Umapathy D., Krishnamoorthy E., Mariappanadar V., Viswanathan V., Ramkumar K.M. 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; 107 (Pt B): 2113-21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.078.
- Van Asten V.S.A., Nichols A., La Fontaine J., Bhavan K., Peters E.J., Lavery L.A. The value of inflammatory markers to diagnose and monitor diabetic foot osteomyelitis // *Int Wound J*. 2017; 14 (1): 40-5. DOI: 10.1111/iwj.12545.
- Van Asten V.S.A., Peters G.E.J., Xi Y., Lavery L.A. The role of biomarkers to diagnose diabetic foot osteomyelitis. A meta-analysis // *Curr Diabetes*

- Rev. 2016; 12 (4): 396-402. DOI: 10.2174/1573399811666150713104401
19. Zagozda M., Sarnecka A., Staszczak Z., Gaikowska H., Andziak P., Olszewski W.L., 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; 16 (6): 822-8. DOI: 10.1089/sur.2014.205.
20. 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; 41 (1): 73-83. DOI: 10.1007/s11033-013-2839-1

Отримано: 07.12.2018

ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА В РАЗВИТИИ НЕФРОПАТИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

¹Зяблицев С.В., ¹Чернобривцев А.П., ²Зяблицев Д.С.

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

²Киевский медицинский университет, Киев, Украина

Актуальность. Значение фактора некроза опухолей альфа (TNF α) и полиморфизма его гена *rs1800629* для развития сахарного диабета (СД) 2 типа было показано в ряде исследований, но остаётся не выясненным механизм такого эффекта и роль в отдельных этнических популяциях больных.

Цель: выяснить значение TNF α и полиморфизма его гена *rs1800629* в развитии СД 2 типа и его сосудистых осложнений.

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 результатам клинико-лабораторных обследований, определяли наличие осложнений и устанавливали стадию заболевания. Уровень в крови TNF α определяли иммуноферментным методом (Bender Medsystems, Австрия) полиморфизм *rs1800629* – методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology; США). Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

Результаты. Уровень в крови TNF α при СД 2 типа значительно повышался, что соответствовало степени тяжести заболевания (максимально в 3-й стадии – в 7,1 раза; $p=3,2e-17$), что влияло на развитие ретинопатии ($\beta=0,012$; $p=0,049$), нефропатии по скорости клубочковой фильтрации ($\beta=0,011$; $p=0,007$) и артериальной гипертензии ($\beta=0,007$; $p=0,042$), максимальным было влияние на развитие макроангиопатий нижних конечностей ($\beta=0,033$; $p<0,001$). Минорная аллель *A rs1800629* увеличивала (ОШ=1,71; 95 % ВИ 1,11-2,65; $p=0,015$) риск СД 2 типа. Для генотипов связь с заболеванием подтверждена в доминантной модели наследования (*G/G* против *G/A+A/A*; ОШ=1,87; 95 % ДИ 1,10-3,18; $p=0,020$). Аллель *A* способствовала уменьшению скорости клубочковой фильтрации и имела связь с развитием нефропатии ($\chi^2=6,38$; $p=0,041$). Это могло быть обусловлено более высокими уровнями в крови TNF α у носителей генотипов *G/A* (в 1,2 раза) и *A/A* (в 1,7 раза) по сравнению с носителями генотипа *G/G* ($p<0,001$).

Выводы. Наличие аллели *A rs1800629* является фактором развития диабетической нефропатии, а одним из механизмов развития сосудистых осложнений СД 2 типа может быть избыточная экспрессия гена *TNF α* , что приводит к чрезмерному синтезу TNF α .

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, нефропатия, TNF α , *rs1800629*.

SIGNIFICANCE OF THE TUMOR NECROTIC FACTOR ALPHA IN DEVELOPMENT OF NEPHROPATHY IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

¹Ziablitsev S.V., ¹Chernobrytsevs O.P., ²Ziablytsev D.S.

¹ Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

² Kyiv Medical University, Kyiv, Ukraine

zsv1965@gmail.com

Relevance. The value of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and the polymorphism of its gene *rs1800629* for the development of type 2 diabetes mellitus (DM) has been shown in some studies but the mechanism of such an effect and role in some ethnic populations of patients is not fully understood.

Objective: to find out the value of TNF α and polymorphism of its gene *rs1800629* in the development of type 2 DM and its vascular complications.

Materials and methods. The study involved data from 152 Ukrainian patients with type 2 DM, aged 34-80 years (53.9 \pm 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 used by Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

Results. 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; $p=3,2e-17$), 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 a decrease in the velocity of glomerular filtration and was associated with the development of 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 the 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 .

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