

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

**Государственное задание Министерства здравоохранения Российской Федерации
Фундаментальные научные исследования**

по теме № 11

ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МОНОГЕННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА И УСТАНОВЛЕНИЕ ЕГО ВКЛАДА В СТРУКТУРУ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ДИАБЕТОМ У ДЕТЕЙ

Руководитель темы Гринева Е.Н.

Ответственный исполнитель Никитина И.Л.

Костарева А.А.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Старший научный сотрудник
НИЛ детской эндокринологии
института эндокринологии, к.м.н. Ю.Л. Скородок

Старший научный сотрудник
НИЛ детской эндокринологии
института эндокринологии, к.м.н. Л.В. Дитковская

Научный сотрудник
НИЛ детской эндокринологии
института эндокринологии И.Ю. Артемьева

Младший научный сотрудник
НИЛ детской эндокринологии
института эндокринологии А.М. Тодиева

Научный сотрудник
института молекулярной
биологии и генетики А.М. Золотина

Научный сотрудник

Цель работы:

Проведение молекулярно-генетического обследования в соответствии с клиническими показаниями пациентов с диабетом для установления вклада моногенного диабета (MODY1,3, неонатального диабета) в структуру заболеваемости диабетом, коррекции метаболического контроля, прогнозирования семейного генетического риска, а также уточнения влияния моногенных расстройств секреции инсулина, включая врожденный гиперинсулинизм, на различные аспекты здоровья детей.

Объектом исследования являются дети и взрослые с ранее установленным диагнозом 1 или 2 типа диабета, а также пациенты с впервые выявленным диабетом, имеющие критерии включения в исследования в соответствии с разработанным протоколом.

Изучение вклада моногенных расстройств секреции инсулина в структуру заболеваемости сахарным диабетом (подтверждение моногенного диабета) и в структуру гипогликемических состояний (подтверждение врожденного гиперинсулинизма) имеет важное практическое значение в связи с новыми терапевтическими возможностями и прогнозированием патологии среди членов семьи и в кровнородственных поколениях. При этом доступность молекулярно-генетического обследования в Северо-Западном регионе России остается крайне низкой. Моногенные варианты диабета часто маскируются диагнозом 1 или 2 типа диабета. В течение отчетного периода были проведены следующие этапы работы. Был разработан и утвержден протокол исследования. Критериями включения в исследования были приняты: наличие семейной истории диабета (2 и более родственника с диабетом по одной линии в каждом поколении), «мягкое» течение диабета с длительным периодом ремиссии у пациентов без избытка веса, с дебютом в возрасте препубертата и пубертата, либо первый критерий в сочетании с отсутствием характерных для 1 типа диабета аутоантител в дебюте заболевания при манифесте с кетоацидоза и длительно сохранной секреции инсулина. Также включались все дети с дебютом диабета в первые 6 мес. жизни; в отсутствии аутоантител – при дебюте диабета в возрасте 6 – 12 мес.

В ходе работы были разработаны показания для молекулярно-генетического

обследования больных с сахарным диабетом, проводится секвенирование генов KCNJ11, ABCC8, HNF-1альфа, HNF-4альфа, EIF2AK3 в соответствии с существующими протоколами методом двунаправленного прямого секвенирования.

Молекулярно-генетическое обследование внедрено в клиническую практику клиники Федерального центра. Также данное обследование при наличии показаний проводится пациентам других ЛПУ Санкт-Петербурга (детская городская больница №19, клиника СПбГПУ), а также пациентам, поступающим в клинику Федерального центра из других регионов.

Была выявлена «ядерная семья» с MODY3(мутация P112L в гене HNF1A), что позволило по результатам обследования одного члена семьи обследовать остальных, установить диагноз диабета у еще 2-х кровных родственников, в том числе ребенка, ранее наблюдавшегося по поводу нарушения углеводной толерантности. Раннее выявления диабета позволило спланировать мониторинг углеводного обмена у пациента детского возраста, а также осуществить генетическое консультирование с оценкой наследственного риска диабета.

В связи с тем, что мутации генов КАТФ-зависимых каналов могут быть причиной как диабета, так и врожденного гиперинсулинизма, первоначально поставленные задачи были расширены и в исследование были включены также пациенты, имеющие тяжелые гиперинсулинемические гипогликемии. Такое расширение задач стало возможным, т.к. моногенный диабет и врожденный гиперинсулинизм в настоящее время в литературе объединены в группу моногенных расстройств секреции инсулина.

В течение отчётного периода проводился набор материала, отбор больных на исследование. Тестирование генов KCNJ11 и ABCC8 проведено 5 пациентам с неонатальным диабетом, 5 пациентам с врожденным гиперинсулинизмом. Установлена делеция одного нуклеотида в кодоне 956 с последующим сдвигом рамки считывания ($\Delta 956fsX1041$) в гене ABCC8 у пациента в диазоксидрезистентной формой врожденного гиперинсулинизма. На основании полученных данных пациент был направлен для углубления обследования — проведения ПЭТ с F-DOPA, что позволило установить фокальную форму и визуализировать очаг, который впоследствии был удален. У другого пациента с врожденных гиперинсулинизмом были выявлены косвенные признаки утраты гетерозиготности по отцовскому аллелю

(гомозиготные варианты в трех SNP в гене KCNJ11 и четыре варианта гомозиготных SNP в гене ABCC8 с единственными SNP в гетерозиготном состоянии в 2 экзоне гена ABCC8), что не исключает делецию локуса с вовлечением генов KCNJ11 и ABCC8, приводящую к развитию фокальной формы врожденного гиперинсулинизма. Данный результат является основанием для направления пациента для проведения ПЭТ с последующей коррекцией тактики ведения. Клинически в настоящее время пациент имеет форму, частично отвечающую на комбинированную терапию диазоксидом и октреотидом, при этом сохраняющиеся эпизоды гипогликемии являются основанием для продолжения поиска средств, направленных на коррекцию терапии.

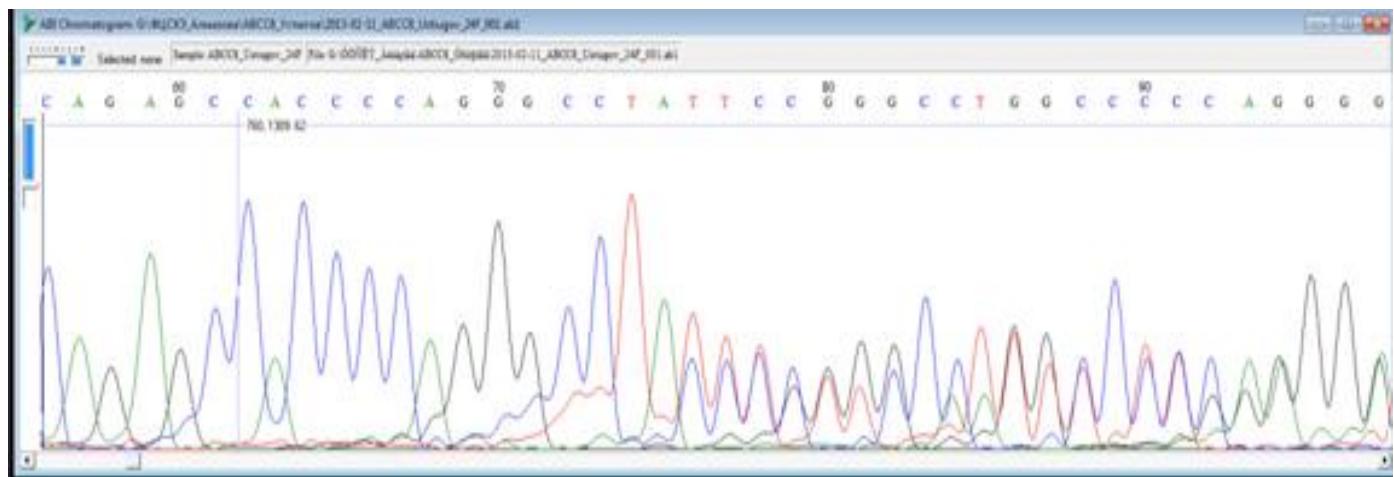
У третьего пациента — девочки 8 лет, имевшей выраженную клинику врожденного гиперинсулинизма до 4 лет, диазоксид-чувствительную форму с полной утратой потребности в диазоксиде и нормализации гликемии в возрасте 5 лет, мутаций в генах KCNJ11 и ABCC8 выявлено не было. При психологическом тестировании был установлен уровень когнитивных функций и интеллекта, соответствующий значениям для возраста, что свидетельствует об отсутствии отсроченных негативных последствий влияния гипогликемии на формирование интеллекта. Таким образом, в процессе комплексного обследования и клинического наблюдения пациентов осуществляется анализ корреляции «генотип-фенотип» в данной группе врожденной патологии, имеющей высокую вариабельность данных параметров.

При генетическом обследовании 5 пациентов с неонатальным диабетом мутация в гене KCNJ11 и ABCC была выявлена у одного пациента. Впоследствии у данного пациента был установлен DEND-синдром, был переведен на терапию сульфонилмочевиной, однако показал низкую чувствительность к этому препарату. Один пациент с дебютом диабета в периоде новорожденности, имел сильную семейную историю диабета — больны мама, бабушка и прадед по одной кровной линии. Остальные пациенты с неонатальным диабетом являлись единственными членами семьи с данной патологией.

В настоящее время особый интерес представляет пациент с неонатальным диабетом, выявленным в периоде новорожденности. Диабет имел «мягкое» начало, но прогредиентное течение; в динамике отмечалось присоединение других клинических синдромов — транзиторная экзокринная недостаточность, синдром эпифизарной дисплазии, задержка роста после 1 года, задержка речевого развития. В настоящее

время возраст ребенка 2 года. Совокупность симптомов характерна для редкого варианта неонатального диабета — синдрома Волкотт-Раллисон. В настоящее время осуществляется анализ гена EIF2AK3.

Делеция одного нуклеотида в кодоне 956 с последующим сдвигом рамки считывания (Δ956fsX1041) в гене ABCC8.



Также были выявлены 2 семьи с MODY.

Семья 1. Пациент Б., впервые обратился в возрасте 5 лет по поводу повышения гликемии прандиально до 8,5 ммоль/л. При обследовании установлена семейная история сахарного диабета по материнской линии— СД больны мать, тетя и бабушка. Из анамнеза пациента установлено, что он родился от 1 беременности, протекавшей на фоне СД 1, хронического пиелонефрита единственной почки, аутоиммунного тиреоидита, токсикоза, гестоза, уреаплазмоза, кандиломатоза; на сроке 6-7 нед - угроза прерывания; 17 нед - обострение хронического пиелонефрита. Роды преждевременные на сроке 35 недель, путём кесарева сечения, оценка по шкале Апгар: 7/7 б.. Длина тела при рождении: 48 см., масса тела при рождении: 2980 гр. На первом году рос и развивался по возрасту. Наблюдался неврологом по поводу перинатального поражения ЦНС. Из перенесённых состояний - в 6 месяцев острый пиелонефрит, в 2011 году впервые диагностированы нарушения ритма сердца — транзиторная а-в блокада 1-2 степени. Занимался профессионально спортом (хоккей). При обследовании имел вес 28, кг; рост 132 см; SDS роста+0,9 см; индекс массы тела 16.кг/м2. Уровень гликированного

гемоглобина 5,05%, С-пептид 3,51 (норма 1,1-4,4), глюкозурия отр., глюкозотolerантный тест: гликемия натощак 4,79 ммоль/л, инсулин 32 (17,8-173,0 пмоль/л), через 2 часа после нагрузки глюкозой — гликемия 5,07 ммоль\л, уровень инсулина 67,3 пмоль/л; по данным мониторирования уровня гликемии в том числе непрерывном суточном мониторировании системой *MiniLink*, уровень гликемии натощак 3,81-4,87 ммоль/л, постпрандиально 4,0-8,2 ммоль/л. Наблюдается в Центре в течение 2-х лет, нарушения углеводного обмена не прогрессируют.

История мамы (34 года): Дебют диабета в возрасте 13 лет случайно, при обследовании для уточнения генеза анемии. Выявленна гипергликемия 13 ммоль/л. До 17 лет находилась на диетотерапии. В возрасте 17 лет прогрессирование гипергликемии до 20-25 ммоль/л., в связи с чем присоединена инсулинотерапия (Лантус, Хумалог) в базис-бюлосном режиме, Гликированный гемоглобин 8%. Из сопутствующей патологии имеет место хронический пиелонефрит, осложнившийся в 2001 году абсцессом почки, по поводу чего была проведена левосторонняя нефрэктомия.

История бабушки (56 лет): Дебют СД в возрасте около 50 лет, находится на инсулинотерапии, имеют место длительные эпизоды самостоятельной отмены инсулинотерапии, контроль гликемии-редкий, диету не соблюдает. Углублено не обследована, данных за наличие сопутствующей патологии нет.

История матери: Дебют СД в возрасте 16 лет, инсулинотерапия с 30 лет. Строго диетические рекомендации не соблюдает, контроль гликемии не постоянный. Проживает в Германии, поэтому в настоящее время молекулярно-генетическое обследование не проведено. У ее дочери с 13 лет отмечены легкие гипогликемические состояния на фоне физической нагрузки.

При молекулярно-генетическом исследовании всех кодирующих экзонов гена *HNF-1α* методом прямого двунаправленного секвенирования на аппарате *ABI PRISM 3130* после выделения ДНК из лимфоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции обнаружена мутация **rs137853243 P112L**, ассоциированная с диабетом типа *MODY3*. Данная мутация обнаружена у пациента Б, его мамы и бабушки. Известно, что при данной мутации, приводящей к потере функции белка, снижается его способность специфично связываться с сайтом на ДНК, что приводит к подавлению транскрипции локуса-мишени. (Рис.1,2).

Таким образом, в результате подтверждения вышеназванной мутации у пациента — ребенка 5 лет — на доклинической стадии был диагностирован моногенный диабет (MODY 3), что позволило спланировать программу мониторинга гликемии, возможных микроангиопатий, а также определить комплекс рекомендаций по образу жизни и диетотерапии, направленных на предотвращение манифестации диабета.

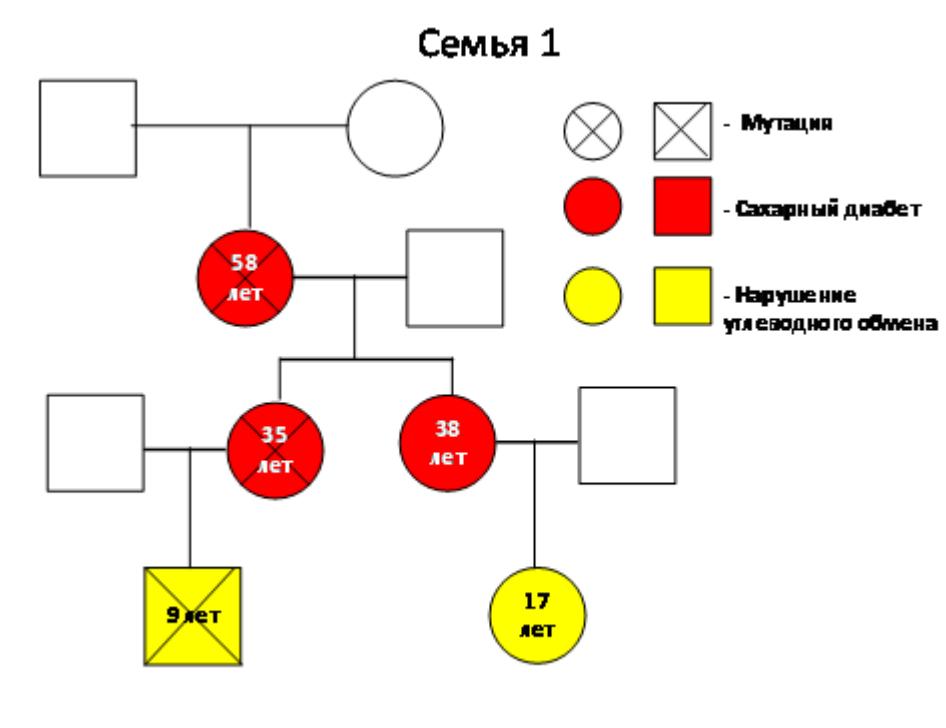


Рис.1. Семья 1. - наследование мутации rs137853243 P112L среди кровных родственников.

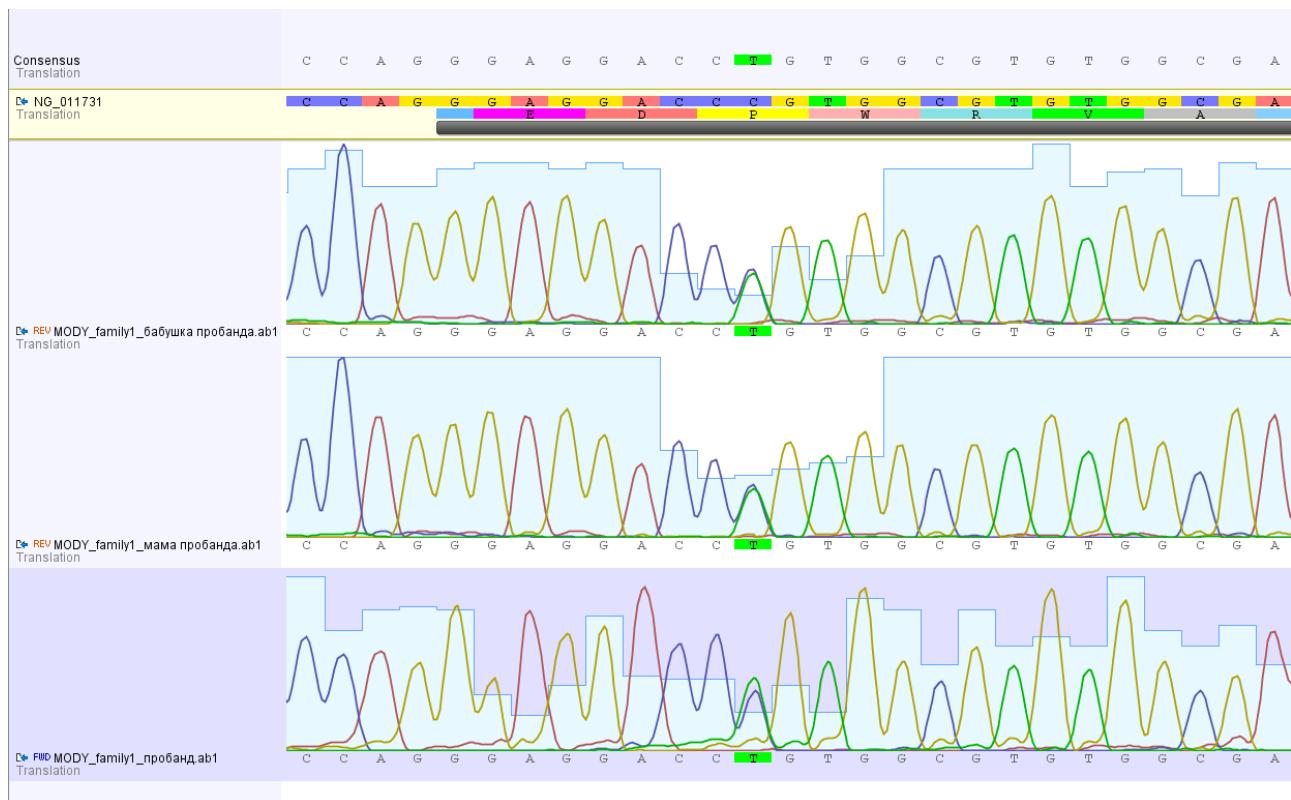


Рис. 2. Семья 1. Результаты сиквенса гена HNF-1 α - мутация rs137853243 P112L

Семья 2. Пациентка А, 4 лет, наблюдается в клинике с сентября 2013г. Обратилась с жалобами на нестабильный уровень гликемии с целью уточнения генеза патологии, подбора терапии и определения дальнейшей тактики ведения. Из анамнеза: от третьей нормально протекавшей беременности, третьих срочных оперативных родов. При рождении масса тела 3300 гр, длина тела 50 см. Период новорожденности без особенностей. Росла и развивалась по возрасту. Из перенесенных состояний — редкие ОРВИ. Обращала внимание сильная семейная история нарушений углеводного обмена по отцовской линии (дед, прадед, двоюродная бабушка имели диагноз сахарный диабет, тип 1; у отца и тёти имеют место гипергликемии до 10 ммоль/л — не обследованы, диагноз не уточнён, терапии не получали).

Впервые обратились к эндокринологу в январе 2013 в связи со случайно выявленной глюкозурией (2,8 ммоль/л) в общем анализе мочи. Далее при контроле гликемии была установлена гипергликемия натощак 7,1 ммоль/л в июне 2013г, сопровождавшаяся

глюкозурией 2,8 ммоль/л, на фоне чего общее состояние ребёнка оставалось удовлетворительное. При углубленном обследовании КОС: рН 7,37, ВЕ 4,7 ммоль/л., уровень HbA1c 10,5%, инсулин 2,0 мкЕ/мл(снижен), С-пептид 0,8 нг/мл (снижен). Выполнен стандартный пероральный глюкозо-толерантный тест: гликемия натощак 4,67 ммоль/л, через 2 часа после нагрузки глюкозой 8,62 ммоль/л. Диагностирован СД 1 тип, после короткого курса инсулинотерапии вследствии гипогликемий отменен инсулин, рекомендована диета и мониторинг гликемии.

Наблюдается в эндокринологическом отделении ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» с сентября 2013г. Клинически: состояние удовлетворительное. Конституция нормостеническая. Состояние питания удовлетворительное: Вес 18,1 кг; SDS веса +0,5; Рост 104,5 см; SDS роста -0,2; индекс массы тела 16,57. Половое развитие по Таннер: Ma1, Ax1, P1, Me (-). По органам и системам без особенностей. По данным проведённого обследования: гликированный гемоглобин 6,25%, по данным мониторирования уровня гликемии, в том числе непрерывным суточным мониторированием системой MiniLink: глюкоза крови натощак в пределах 5,9-6,73 ммоль/л, посттрандиально — 6,0-9,9 ммоль/л. Была назначена инсулинотерапия (инс. Хумулин NPH в дозе 1 ЕД), на фоне чего контроль гликемии удовлетворительный. При контрольном обследовании в марте 2014г клинически: Вес 17,5 кг; Рост 108 см; + 3,5 см за прошедшие 6 мес.; SDS роста -0,2 см; индекс массы тела 14,57. Лабораторно: гликированный гемоглобин 6,12%, уровень холестерина нормализовался (3,8 ммоль/л), гликемии натощак 4,52-6,3 ммоль/л, посттрандиально — 6,1-10,1 ммоль/л. Пациентка продолжает в течение получать инсулинотерапию, доза постепенно повышается, была переведена на базис-болясный режим.

У двух близких родственников (отца 39 лет и его сестры, 37 лет) выявлена гипергликемия до 12-15 ммоль/Л, диагностирован СД. Ранее оба родственника не обследовались, клинические симптомы отсутствовали. Также была обследована младшая сестра пациентки в возрасте 1 года — нарушений углеводного обмена у нее выявлено не было.

«Мягкое» течение сахарного диабета, длительная низкая потребность в инсулинотерапии, сильная семейная история диабета по отцовской линии явились основанием для проведения молекулярно-генетического обследования. Среди родственников второй семьи у двух сестер, отца и матери был обнаружен

однонуклеотидный полиморфизм в гене **HNF-1 α rs1169288 I27L**. В случае диабета типа **MODY** данный полиморфизм описан как один из наиболее широко встречающихся в популяции. Однако, существует ряд данных свидетельствующих в пользу серьезной предрасположенности у носителей данного полиморфизма к диабету второго типа в более позднем возрасте (Рис.3,4).

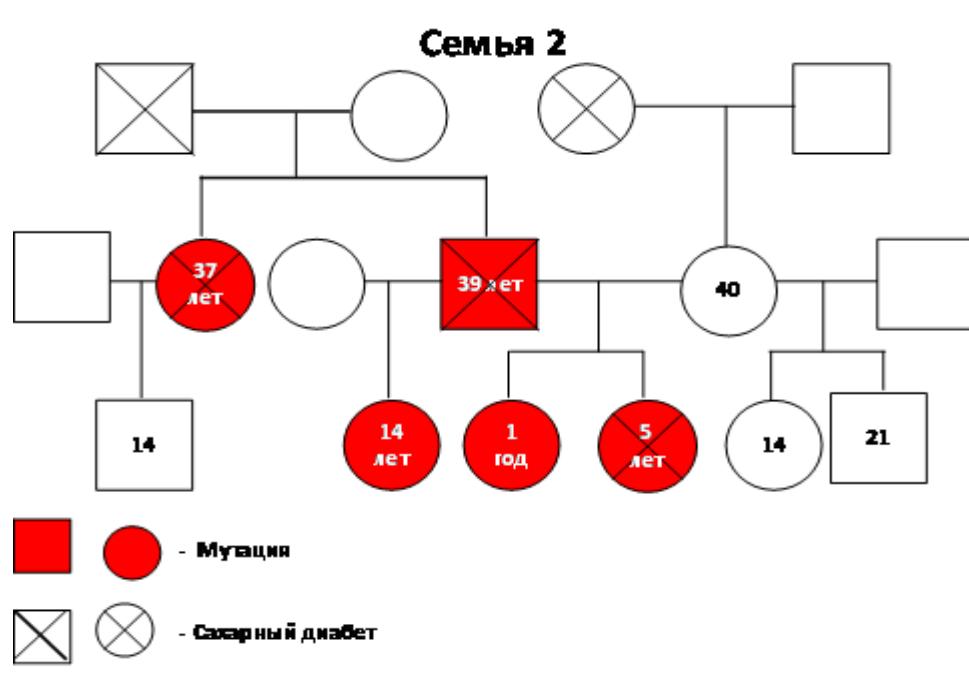


Рис. 3. Семья 2 — выявление однонуклеотидного полиморфизма rs1169288 I27L среди кровных родственников.

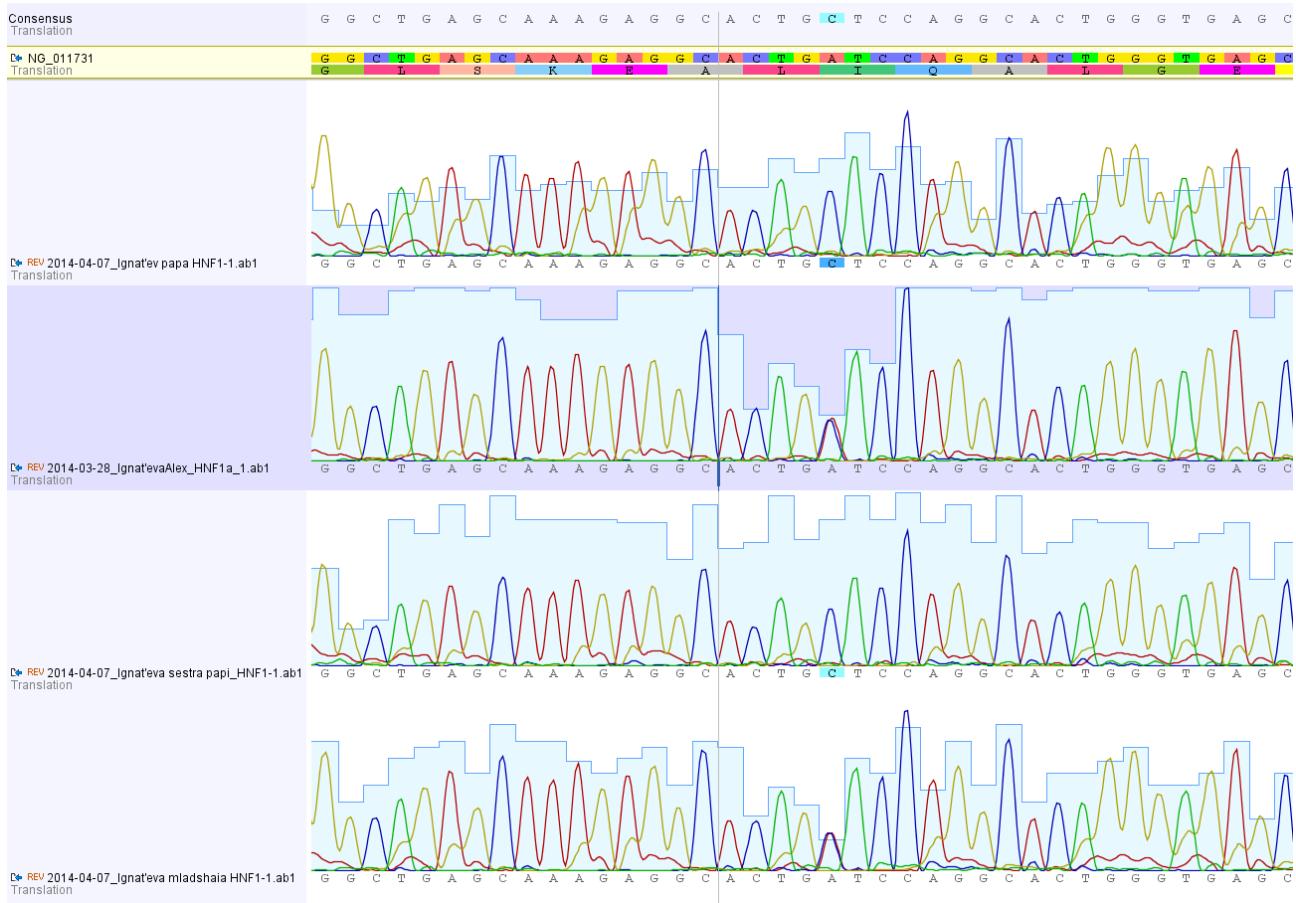


Рис. 4. Семья 2. Результаты сиквенса гена HNF-1 α - однонуклеотидный полиморфизм в гене HNF-1 α rs1169288 I27L

История второй семьи свидетельствует об особенностях дебюта и течения MODY3 - «мягком», клинически малосимптомном начале, длительно сохраняющейся низкой потребности в инсулине у лиц без избытка массы тела. Данные особенности могут привести к поздней диагностике заболевания, высокому риску микро- и макроангиопатий, которые могут оказаться первым проявлением данного заболевания. При этом знания о полиморфизме, предрасполагающем к снижению инсулиновой секреции, и передающемся в поколениях, способны повысить настороженность в отношении контроля гликемии, соблюдения предосторожностей в питании и образе жизни, способных предотвратить манифестацию заболевания.

В заключение следует подчеркнуть, что уточнение этиологического типа диабета, выявление моногенных его вариантов способно не только объяснить некоторые клинические особенности течения заболевания и метаболического контроля, но и дать возможность, путем обследования кровных родственников,

выявлять заболевание на ранней, доклинической стадии, осуществлять программы, направленные на превенцию и отдаление клинической манифестации болезни, неизбежно сопряженной с риском специфических сосудистых осложнений диабета. В представленных нами клинических наблюдениях установление диагноза MODY привело к доклинической диагностике у наиболее юных членов семьи и установлению диагноза манифестного диабета у более старших родственников, уже имевших значимую гипергликемию, но не обследованных ранее в связи со скучностью клинических проявлений. Более того, подтверждение синдромального варианта MODY 3 объяснило ренальную патологию у одного члена первой семьи и обозначило настороженность в этом отношении для всех остальных членов, имеющих подтвержденную мутацию в аффектном гене.

Таким образом, работа на отчетном этапе исследования проводилась в соответствии с планом, и основные задачи данного этапа были выполнены. Проведен обзор современного состояния проблемы, определена актуальность научных исследований и значимость внедрения их результатов в практическое здравоохранение. Разработан и утвержден протокол, регламентирующий дизайн исследования. Продолжается набор клинического материала, параллельно которому проводится отработка методик молекулярно-генетического тестирования заявленных генов методом прямого двунаправленного секвенирования, полностью завершен данный процесс для генов KCNJ11, ABCC8, HNF-1альфа, HNF-4альфа. Исследование названных генов внедрено в клиническую практику, при этом производится не только для пациентов клиники Федерального центра, но и для других лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга, Ленинградской области и городов Северо-Западного региона. Получены результаты, позволяющие проводить анализ корреляции «генотип-фенотип» для мутаций данных генов при неонатальном диабете, врожденном гиперинсулинизме, MODY3. В связи с клиническими показаниями расширена программа генетического обследования — начато внедрение протокола сиквенса гена EIF2AK3. Расширение области исследований на другие формы моногенных нарушений секреции инсулина позволили корректировать терапевтическую тактику пациентов с врожденным гиперинсулинизмом. Полученные результаты и выявление мутаций аффектных генов имеет большое практическое значение, так как позволяет совершенствовать тактику ведения больных и

осуществлять генетическое консультирование. Так, подтверждение мутации HNF-1альфа у члена семьи больной диабетом (ребенка, еще не имеющего гипергликемии, соответствующей критериям сахарного диабета), позволило рано установить у него диагноз моногенного диабета и спланировать тактику, направленную на метаболический контроль и предупреждение сосудистых осложнений. Результаты работы широко представлены в виде публикаций статей, в том числе в рейтинговых журналах, а также в виде устных и постерных докладов на международных митингах и отечественных симпозиумах с международным участием. Руководителями темы заложены основы международного сотрудничества, в рамках которого проводится обмен опытом, обучение и консультации специалистов Центра за рубежом, в центрах, имеющих опыт диагностики и лечения моногенных расстройств секреции инсулина.

В соответствии с планом опубликованы статьи:

1. Никитина И.Л., Скородок Ю.Л., Дитковская Л.В., Тодиева А.М., Демчук Ю.А. Оценка эффективность помповой инсулиновтерапии у детей школьного возраста с сахарным диабетом. - Лечение и профилактика. – 2013. - №1 (5). – С.26-30. (ИФ 0,361).
2. Никитина И.Л., Костарева А.А., Скородок Ю.Л., Гринева Е.Н Врожденные нарушения секреции инсулина – теоретические и практические аспекты //Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского – 2013. - №2. – С.127-140.(ИФ 0,661).
3. Nikitina IL Platonov VV Kostareva AA Skorodok JL Grineva EN Case of permanent neonatal diabetes mellitus caused by Y33OH KCNJ11 gene mutations: genotype-phenotype correlations. – Diabetes. – 2013, V.62, S1 – P.715-716. (ИФ 8,2).
4. Никитина И.Л., Костарева А.А., Платонов В.В., Скородок Ю.Л. Неонатальный диабет в практике детского эндокринолога // Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А.Алмазова. — 2012г. - №4. - С.15-20.
5. Никитина И.Л., Артемьева И.Ю., Тодиева А.М., Баиров В.Г., Щёголева Н.А., Костарева А.А., Гуркина Е.Ю., Гринёва Е.Н. Гипогликемические состояния у детей — от теории к практике // Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А.Алмазова. — 2012г. - №1. - С.38-48.
6. Никитина И.Л., Артемьева И.Ю., Ходюченко Т.А., Васичкина Е.С., Костарева А.А. Моногенный диабет в структуре диабета у детей — диагностика, генетическое прогнозирование//Трансляционная медицина. - 2014. — №3. - С. 16-22.

На ежегодном конгрессе American Diabetes Association (Чикаго, июнь 2013) был представлен постерный доклад: Case of permanent neonatal diabetes mellitus caused by Y330H KCNJ11 gene mutations: genotype-phenotype correlations.

Сотрудничество: исполнители темы имеют сотрудничество с Kovler Diabetes Center Университета Чикаго (США). Осуществляются совместные обсуждения клинических случаев; были получены протоколы генов ABCC8, EIF2AK3.