

На правах рукописи



ТУРКУНОВА
Мария Евгеньевна

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ МОНОГЕННЫХ ФОРМ САХАРНОГО ДИАБЕТА У
ДЕТЕЙ**

3.1.21. – Педиатрия
3.1.19. – Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Желенина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор
Дитковская Лилия Викторовна – кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Никитина Ирина Леоровна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра детских болезней лечебного факультета Института медицинского образования, заведующая

Баранов Виталий Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эндокринологии им. акад. В.Г. Баранова, профессор

Ведущая организация – федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита состоится «14» февраля 2022г. в 10-00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.062.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России (194223, Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, д.39) и на сайте ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России <http://gpmu.org>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Тыртова Людмила Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет (СД) является самым распространенным заболеванием в структуре эндокринной патологии у детей и представляет группу метаболических заболеваний, включающую в себя как полигенные (СД1 и СД2), так и моногенные формы (American Diabetes Association, 2014). Моногенный сахарный диабет (МСД) – генетически гетерогенная группа нарушений углеводного обмена (НУО) по диабетическому типу, причиной возникновения которых являются изменения в одном гене. К данной группе заболеваний относятся неонатальный сахарный диабет (НСД), MODY (акроним названия Maturity Onset Diabetes of the Young или диабет взрослого типа у молодых) и сахарный диабет в структуре генетических синдромов (Antosik K. et al., 2016).

По данным ISPAD (2018), вероятная частота МСД составляет 1-6%. Распространенность НСД варьирует от 1/300 000 до 1/500 000 живых новорожденных и существенно отличается в различных популяциях (Kylat R.I. et al., 2017; Polak M. et al., 2007).

Истинная частота МСД в настоящее время не определена и существует вероятность ошибочной диагностики СД 1 или 2 типа у пациентов с МСД, либо вовсе не диагностированных случаев при неклассической клинической картине заболевания или бессимптомной гипергликемии (Shields B.M. et al., 2010-2012).

Основной целью клиницистов является идентификация типа диабета, которая в последующем определит выбор тактики ведения, в том числе использование лекарств на основе доказанной патогенетической эффективности и позволит прогнозировать течение заболевания. Кроме того, более ранняя диагностика приводит к снижению темпов прогрессирования заболевания, позволяет избежать опасных для жизни острых и хронических осложнений и сформировать персонифицированный алгоритм ведения пациента.

Степень разработанности темы исследования

В России ДНК-диагностика пациентов с НСД, MODY и синдромальным СД малодоступна, в то время как результат исследования позволит более точно понимать патогенетические механизмы развития хронической гипергликемии, что важно для постановки диагноза, прогнозирования течения заболевания и выбора оптимальной тактики ведения в зависимости от генетической основы. Как правило, в литературе описаны причины развития МСД, но данные об особенностях манифестации и течения заболевания, терапевтических подходах немногочисленны.

В отечественной литературе имеются работы, посвященные MODY, НСД и синдромальным формам СД. Однако на сегодня, нет единых унифицированных алгоритмов выбора кандидатов для проведения молекулярно-генетического исследования.

Цель исследования

Установить частоту и оптимизировать диагностику различных форм моногенного сахарного диабета у детей на основании полученных комплексных данных клинико-anamnestического, лабораторного и молекулярно-генетического обследования.

Задачи исследования

1. Изучить частоту и структуру моногенного сахарного диабета у детей Санкт-Петербурга.
2. Исследовать клинико-anamnestические и гормонально-метаболические особенности моногенного сахарного диабета у детей.
3. Определить молекулярно-генетические варианты заболевания.
4. Выявить наиболее характерные диагностические признаки MODY у детей.
5. Предложить алгоритм диагностики различных форм моногенного сахарного диабета в детском возрасте.

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые проведено изучение частоты встречаемости МСД у детей в Санкт-Петербурге с использованием методов секвенирования нового поколения.

Изучение молекулярно-генетических характеристик СД методами секвенирования нового поколения, включая полноэкзомное секвенирование, позволило выявить 59 вариантов у пациентов с МСД, 20 из которых ранее не описаны.

Впервые в отечественной практике было проведено исследование промоторной области гена *GCK*, позволяющее дополнить представления о патогенезе MODY2.

Впервые в России описаны редкие варианты НСД у детей, обусловленные вариантами генов *GATA6*, *GCK* и СД, ассоциированный с вариантами в *SLC19A2*.

Разработана прогностическая модель для определения вероятности MODY у детей с различными вариантами НУО.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты исследования позволили разработать алгоритм диагностики МСД для пациентов детского возраста с целью раннего выявления и назначения своевременного адекватного, патогенетически обоснованного лечения. Кроме того, был разработан онлайн-калькулятор на основе прогностической модели, построенной с использованием метода бинарной логистической регрессии, для определения вероятности MODY у детей с НУО.

Показано, что у пациентов с НСД или подозрением на СД в структуре генетического синдрома полноэкзомное секвенирование, в случае отсутствия

вариантов в таргетной панели генов-кандидатов, является информативным методом диагностики заболевания.

Положения, выносимые на защиту

1. Моногенный сахарный диабет является второй по частоте, после аутоиммунного инсулита, причиной хронической гипергликемии у детей с сахарным диабетом в Санкт-Петербурге. Среди пациентов с MODY в 80% случаев установлен MODY2, в 15% – MODY3, вероятно, данные подтипы являются наиболее распространенными вариантами моногенного сахарного диабета.
2. Сахарный диабет у детей первых 6 месяцев жизни (неонатальный сахарный диабет) проявляется тяжелой гипергликемией и типичными клинико-метаболическими нарушениями, требующими инсулинотерапии. В ряде случаев гипергликемия у детей первого года может выявляться случайно и быть связана с гетерозиготными инактивирующими вариантами в гене *GCK*.
3. У большинства пациентов с MODY отмечалсяотягощенный семейный анамнез по нарушениям углеводного обмена у родственников 1 степени родства, медленно прогрессирующее снижение секреции инсулина β -клетками в течение более 2 лет, отсутствие потребности в экзогенном инсулине. Данные критерии целесообразно использовать как показания для проведения молекулярно-генетического исследования.
4. Целесообразно внесение генов *GATA6* и *SLC19A2* в таргетную панель генов-кандидатов моногенного сахарного диабета. Если варианты в таргетных панелях генов не выявляются, возможно проведение полноэкзомного секвенирования.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов обусловлена тщательным подходом к формированию выборки включенных в исследование пациентов, использованием новейших методов обследования для диагностики моногенных форм сахарного диабета, применением современных методов статистической обработки информации и углубленным анализом научно-исследовательских работ по данной тематике.

Апробация результатов работы

Результаты исследования были доложены (в виде тезисов и трех устных докладов): на III Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, март 2015 г.); «Ежегодная школа неонатологов» (Санкт-Петербург, март 2016 г.); XI международный научный конгресс «Рациональная фармакотерапия» (Санкт-Петербург, октябрь 2016 г.); Национальный конгресс с международным участием «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, май 2018 г.); 57-м Съезде Европейского Общества Детских Эндокринологов ESPE 2018 (Афины, сентябрь 2018 г.); 12-ой международной конференции

Современные Технологии и Лечение Диабета АТТД (Берлин, февраль 2019 г.); Национальный конгресс с международным участием «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, май 2019 г.); 9-м международном конгрессе Europaediatrics (Дублин, июнь 2019 г.); в рамках цикла повышения квалификации врачей-детских эндокринологов СЗГМУ им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург, ноябрь 2019 г.).

Внедрение в практику

Научные положения и практические рекомендации, изложенные в диссертации, внедрены в учебный процесс на кафедре детских болезней им. профессора И.М. Воронцова ФП и ДПО и повседневную работу врачей-детских эндокринологов амбулаторного звена, эндокринологических отделений СПбГПМУ и ДГМКЦ ВМТ им. А.К. Раухфуса (Санкт-Петербург).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 3 в научных рецензируемых журналах, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, из них 1 публикация, включенная в международную реферативную базу данных Скопус (Scopus).

Личное участие автора в проведении исследования

Автор лично осуществлял все этапы подготовки и проведения научной работы, включавшие определение основной цели, дизайна исследования. Автором самостоятельно проведен глубокий анализ отечественной и зарубежной научной литературы, осуществлено клиническое ведение больных, анализ проведенного молекулярно-генетического исследования. Создана электронная база данных, выполнен статистический анализ, произведена оценка результатов обследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из оглавления, введения, обзора литературы, результатов собственных данных, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 164 страницах машинописного текста, иллюстративный материал представлен 21 рисунком и 21 таблицей. Список литературы включает 257 источников из них 22 отечественных и 235 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования

Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого проспективного исследования, включающего в себя аналитический метод – изучение литературных источников по данной проблеме, эмпирические методы – наблюдение, сравнение, логический анализ. Методы исследования одобрены

этическим комитетом ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол заседания этического комитета № 3/18 от 05 марта 2014 г.).

Исследовано 143 человека – 117 пробандов, 3 сибса и 23 родителя. МГИ родителям и сибсам проводили после получения результатов пробанда, с целью подтверждения или опровержения патогенности выявленного варианта. Среди 117 пациентов детского возраста с подозрением на моногенный сахарный диабет: 97 пациентов с «СД не 1 и 2 типа» (подозрением на MODY), 13 пациентов с НСД (диагностированным в первые 6 месяцев жизни), 7 пациентов с подозрением на СД в структуре генетического синдрома (сочетание СД с экстрапанкреатическими аномалиями/заболеваниям).

Для отбора пациентов-кандидатов для проведения МГИ были оценены критерии MODY согласно ISPAD 2018 и рекомендации отечественных и зарубежных авторов. Критерии были адаптированы к условиям диссертационного исследования: после формирования целевой группы, молекулярно-генетическому исследованию подлежали пациенты с наличием двух или более основных критериев включения:

1. Возраст диагностики НУО по диабетическому типу до 18 лет.
2. Неклассическое («мягкое») течение заболевания (отсутствие манифестных симптомов СД, признаков ДКА).
3. Длительность НУО по диабетическому типу 2 года и более.
4. Сохранный уровень инсулина (в случае отсутствия инсулинотерапии) или с-пептида при включении в исследование.
5. Отрицательный титр основных аутоантител к β -клеткам.
6. Отсутствие признаков инсулинорезистентности (клинические проявления, прогрессирующее ожирение, лабораторные показатели).
7. Минимальная потребность в инсулине, в случае назначения инсулинотерапии, через 2-3 года после манифестации заболевания.
8. Отягощенная наследственность по НУО.

Критерием исключения являлось значимое повышение титра основных панкреатических аутоантител.

Всем пробандам было проведено МГИ на наличие вариантов в таргетной панели 28 генов генов-кандидатов MODY, НСД и синдромальных форм СД (*GCG, GLUD1, WFS1, HNF1A, GCK, INS, HNF1B, ABCC8, HNF4A, RFX6, PTF1A, NEUROD1, AKT2, ZFP57, INSR, EIF2AK3, PPARG, PAX4, PDX1, GLIS3, KCNJ11, SLC16A1, FOXP3, BLK, CEL, KLF11, SCHAD, GCGR*). Пациентам с НСД и подозрением на синдромальные формы СД, в случае отсутствия мутаций в генах-кандидатах таргетной панели, было дополнительно проведено полноэкзомное секвенирование и установлены варианты в генах, не включенных в данную панель: *GATA6, SLC19A2*. Диагноз считался генетически подтвержденным в случае выявления варианта в генах-кандидатах МСД. Обнаруженный вариант расценивался как причастный к развитию заболевания в следующих случаях: а) изменение нуклеотидной

последовательности по умолчанию оказывает сильное влияние на функцию белка (стоп-кодон *de novo*, сдвиг рамки считывания, дефект сплайсинга); б) вариант описан в литературе у пациентов с МСД и не описан у здоровых индивидуумов; в) в обследованных семьях наблюдается сегрегация варианта с заболеванием. Оценка патогенности мутаций производилась согласно международным рекомендациям ACMG (2015). ДНК выделяли из цельной крови, готовые библиотеки секвенировали на системе высокопроизводительного секвенирования Illumina HiSeq 2500 в режиме парноконцевого секвенирования 2×100 (набор TruSeq SBS Kit v3 – HS (200-cycles)), или 2×125 (набор HiSeq® SBS Kit v4 (250 cycles)). Верификация результатов WES была выполнена с использованием прямого секвенирования по Сэнгеру GA3130xl Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, USA). Анализ промотора GCK мутации с.-71G>C проводили методом ПЦР-ПДРФ эндонуклеазы Hae III и следующих праймеров: F 5'GCATGGCAGCTCTAATGACAGG 3' и R 5'CATCCTAGCCTGCTTCCCTGG 3'. Для оценки результатов использовался электрофорез с полиакриламидным гелем.

Работа выполнена при содействии Фонда поддержки и развития филантропии «КАФ» и частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках темы фундаментальных научных исследований 2019-2021 гг. (AAAA-A19-119021290033-1).

Всем пациентам определяли уровень глюкозы в плазме венозной крови, в том числе в ходе ОГТ, уровень инсулина и/или С-пептида натощак, уровень HbA1C. Исследованы титры антител к островковым клеткам, инсулину, глутаматдекарбоксилазе (GAD) и тирозинфосфатазе (IA2).

Статистическая обработка данных производилась с использованием программного пакета Microsoft Office Excel, MedCalc Software Ltd, IBM SPSS Statistics 23 и StatTech v. 1.2.0 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Работа выполнена в виде проспективного когортного исследования. Для определения наиболее значимых критериев MODY с целью создания прогностической модели был проведен анализ анамнестических, генеалогических антропометрических и клинико-лабораторных данных пациентов с подтвержденным MODY (группа 1) и пациентов без установленных вариантов в генах, обуславливающих развитие MODY (группа 2). Данные о количестве детей наблюдающихся с СД в Санкт-Петербурге были взяты из электронного федерального регистра больных сахарным диабетом. Для сравнения независимых совокупностей количественных данных использован U-критерий Манна-Уитни. Номинальные/бинарные показатели выражали в абсолютных числах с указанием процентных долей (%), для сравнения использован критерий χ^2 Пирсона. Статистически значимыми различия считали при уровне критического значения величины $p < 0,05$, на основании которого принимали решения о справедливости проверяемой гипотезы. Для создания прогностической модели использован метод бинарной логистической регрессии с отбором независимых переменных методом пошагового исключения Вальда. Для оценки качества модели использовались значения коэффициента детерминации R^2 Найджелкерка, анализ ROC-кривой и уровень статистической значимости.

Результаты молекулярно-генетического исследования

Диагноз генетически подтвержден 63 пробандам, что составило 53,85% (95% ДИ: 45,23-63,92%; 63/117). В группе пациентов с НСД и синдромальными формами СД варианты в генах, обуславливающих развитие заболевания, были обнаружены у 10 пациентов (50% случаев), в группе MODY – у 53 детей (54,64%). Среди пациентов с MODY MODY2 выявлен в 83,02% случаев (95% ДИ: 70,20-91,93%, 44/53), MODY3 – в 15,09% (95% ДИ: 6,75-27,59%, 8/53), MODY9 у 1 пробанда – 1,89%.

Согласно полученным данным, предполагаемая (минимальная) частота МСД среди детей и подростков с СД в Санкт-Петербурге составила порядка 3,12%. Для расчета данного показателя мы использовали число пациентов с МСД (n=63) и общее число пациентов детского возраста в Санкт-Петербурге наблюдающихся с диагнозом СД на начало 2020 г (n=2020: 2008 с СД1 и 12 с СД2). Кроме того, по результатам данного исследования MODY был установлен 53 пробандам, из чего следует, что на момент проведения исследования MODY встречался чаще, чем СД 2 типа.

Характеристика пациентов с MODY

Обследовано 97 детей с подозрением на MODY (54 мальчика и 43 девочки). Медиана возраста диагностики НУО составила 10 лет [4,0; 13,20] (0,08÷17,41); медиана длительности заболевания 2,17 лет [0,67; 4,0] (0,08÷12,83).

Пациенты в группах 1 и 2 имели сопоставимые показатели массы и длины тела при рождении, возраст диагностики заболевания и SDS ИМТ на момент включения в исследование.

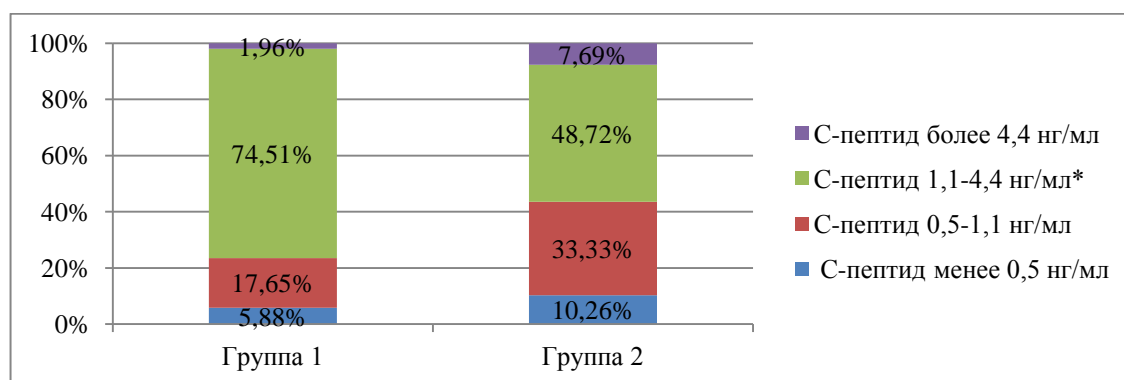
Пациенты группы 1 статистически значимо дольше наблюдались по поводу гипергликемии: медиана 2,6 года [0,9; 4,3] против 1,1 года [0,4; 2,8] среди пациентов группы 2 (p=0,009). Особенности манифестации заболевания пациентов обеих групп представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Особенности манифестации заболевания у пациентов группы 1 и 2

	Группа 1 (n=53)	Группа 2 (n=43**)	p
Большие симптомы СД	12 (22,64%)	14 (32,56%)	0,196
Признаки кетоза на момент диагностики (кетонурия)	7 (13,21%)	14 (32,56)	0,021*
Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p<0,05); ** – особенности манифестации были не известны для одного пациента из группы 2.			

Лабораторные признаки кетоза в дебюте заболевания у пациентов 1 группы встречались статистически значимо реже – в 13,21% случаев (n=7), против 32,56% (n=14) среди пациентов 2 группы (p=0,021).

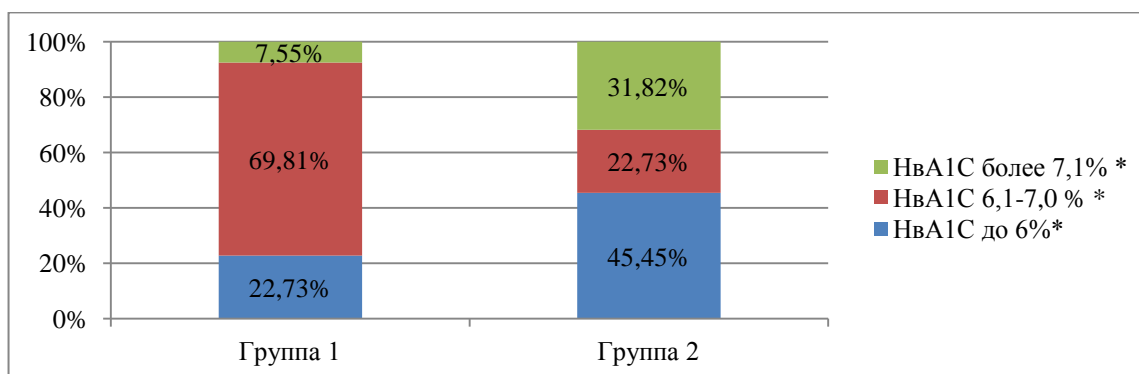
Для оценки секреторной активности β -клеток у части пациентов был определен уровень инсулина крови, данные о С-пептиде были доступны для 51 пациента из группы 1 и 39 человек из группы 2. Уровни С-пептида были сопоставимы в обеих группах: в группе 1 медиана составила 1,3 нг/мл [1,1; 2,5], в группе 2 – 1,3 нг/мл [0,7; 2,1] ($p=0,243$). При проведении частотного анализа показателей С-пептида отмечалась неоднородность распределения значений, на основании чего, были определены диапазоны для уровня С-пептида. У пациентов группы 1 в 74,51% ($n=38$) данный показатель находился в пределах от 1,1-4,4 нг/мл, в то время как у пациентов группы 2 лишь в 48,72% ($n=19$) ($p=0,010$) (рисунок 1).



*– различия показателей статистически значимы ($p<0,05$).

Рисунок 1 – Диапазоны уровней С-пептида (нг/мл) у пациентов группы 1 и 2

Уровень гликированного НвА1С сопоставим у пациентов обеих групп. Медиана НвА1С в группе 1 6,3% [6,1; 6,7], в группе 2 – 6,3% [5,6; 7,3] ($p=0,733$). При проведении частотного анализа уровня НвА1С отмечалась неоднородность распределения значений, на основании чего, были определены диапазоны для уровня НвА1С. У пациентов группы 1 статистически значимо чаще встречался НвА1С в диапазоне от 6,1 до 7% в 69,87% случаев ($n=37$) против 22,73% ($n=10$) ($p=0,000$) (рисунок 2).



*– различия показателей статистически значимы ($p<0,05$).

Рисунок 2 – Диапазон уровней НвА1С (%) у пациентов группы 1 и группы 2

По результатам оценки углеводного обмена: уровни глюкозы крови натощак и в ходе проведения ОГТ через 2 часа, были сопоставимыми в обеих группах – медиана 6,6 ммоль/л [5,9; 7,0] в группе 1 и 6,5 ммоль/л [5,59; 7,9] в группе 2 ($p=0,533$); медиана 9,5 ммоль/л [7,7; 10,5] в группе 1 против 9,7 ммоль/л [7,7; 12,0] в группе 2 соответственно ($p=0,268$).

Пациенты группы 1 с умеренно повышенным, как правило одного вида, титром специфических АТ встречались в 12,5% ($n=6$), что почти в 2 раза реже чем в группе 2 – 20,59% ($n=7$). Кроме того, в группе 1 у половины серопозитивных пациентов ($n=3$) обнаружены антитела IAA. По одному пациенту с повышением изолированно ICA и GAD, в одном случае было выявлено сочетание GAD+ICA. У пациентов группы 1 не было выявлено повышения IA2. Напротив, среди 7 серопозитивных пациентов 2 группы у 3 человек обнаружены аутоантитела к GAD, у одного пациента IA2 и у одного пациента сочетание GAD и IA2, считающиеся наиболее чувствительными при СД 1 типа.

Генеалогические данные пациентов обеих групп представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Генеалогические данные пациентов группы 1 и группы 2

	Группа 1 ($n=51^{**}$)	Группа 2 ($n=44$)	p
Отягощенная наследственность у родственников 1 степени родства	39 (76,47%)	20 (45,5%)	0,002*
Отягощенная наследственность у родственников 2 степени родства	8 (15,69%)	16 (36,36%)	0,019*
Наследственность не отягощена	3 (5,88%)	7 (15,91)	0,105
Примечание – * – различия показателей статистически значимы ($p<0,05$); ** – наследственность не известна для 2 пациентов из группы MODY.			

В группе 1 отягощенная наследственность у родственников 1 степени родства встречалась значимо чаще, чем в группе 2 – 76,47% ($n=39$ из 51 пробанда, для которых данные были доступны) против 45,45% ($n=20$) среди пациентов группы 2 ($p=0,002$). Методы лечения пациентов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Методы лечения пациентов группы 1 и группы 2

	Группа 1 ($n=53$)	Группа 2 ($n=44$)	p
Диетотерапия	41 (77,36%)	23 (52,27%)	0,009*
Лечение ПСС	5 (9,43%)	4 (9,09%)	0,618
Инсулинотерапия	7 (13,21%)	17 (38,64%)	0,004*
Доза инсулина менее 0,2 ед/кг/сут	6 (85,71%)	3 (17,65%)	0,004
Примечание – * – различия показателей статистически значимы ($p<0,05$).			

Пациенты группы 1 чаще находились на диетотерапии, чем пациенты группы 2 – 77,36% (n=41) против 52,27% (n=23) (p=0,009). Напротив, инсулинотерапию в 3 раза чаще получали пациенты группы 2 – в 38,64% случаев (n=17) в сравнении с группой 1, пациенты которой лечились инсулином в 13,21% случаев (n=5) (p=0,004). К тому же, пациентам 2 группы требовались более высокие дозы инсулина: медиана 0,36 ед/кг/сут [0,21; 0,77] против пациентов 1 группы медиана дозы инсулина у которых составляла 0,12 ед/кг/сут [0,07; 0,19] (p=0,010).

В течение 5-и лет наблюдения у 14 пациентов заключительный диагноз был СД1 типа. У 3 пациентов гипергликемия не возобновлялась и имела транзиторный характер. У 1 пациента диагностирован СД2 типа.

Разработка прогностической модели вероятности MODY у детей с сахарным диабетом

При анализе зависимости вероятности выявления MODY у пациентов с СД в зависимости от анамнестических, генеалогических, клинико-лабораторных факторов с помощью метода бинарной логистической регрессии была получена следующая модель:

$$P = 1 / (1 + e^{-z}),$$

$$z = 1,77 \times X_{\text{С-ПЕПТ}} + 2,22 \times X_{\text{НВА1С}} + 1,51 \times X_{\text{НАСЛ1}} + 1,46 \times X_{\text{ДЛИТ}} - 3,5, \quad (2)$$

где P – вероятность выявления MODY в долях единицы;

$X_{\text{С-ПЕПТ}}$ – уровень С-пептида в диапазоне от 1,1 до 4,4 нг/мл (0 – нет, 1 – да);

$X_{\text{НВА1С}}$ – диапазон уровня НВА1С от 6,1 до 7,0% (0 – нет, 1 – да);

$X_{\text{НАСЛ1}}$ – наличие родственников 1 степени родства с отягощенной по НУО наследственностью (0 – отсутствует, 1 – наличие);

$X_{\text{ДЛИТ}}$ – длительность заболевания более 2 лет 3 месяцев (0 – нет, 1 – да).

Характеристики влияния каждого фактора на шансы выявления MODY сопоставлены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристики влияния факторов, включенных в прогностическую модель, на вероятность выявления MODY

Наименование фактора	ОШ (AOR)	95% ДИ	p
Уровень НВА1С от 6,1 до 7%	8,0	2,44-26,14	0,000*
Уровень С-пептида в диапазоне 1,1-4,4 нг/мл	5,86	1,73-19,89	0,005*
Наличие родственников 1 степени родства	4,52	1,42-14,37	0,011*
Длительность заболевания 2 года 3 месяца и более	4,31	1,40-13,33	0,011*
Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p<0,05).			

Полученная прогностическая модель была статистически значимой ($p < 0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации R^2 Найджелкерка, в модели были учтены 51,2% факторов, оказывающих влияние на вероятность MODY у пациентов.

Пороговое значение логистической функции P составило 0,5 (рисунок 3). Площадь под ROC-кривой составила $0,87 \pm 0,04$ (95% ДИ: 0,79-0,94). При значениях $p < 0,5$ прогнозировался низкий риск выявления MODY. При значениях $p \geq 0,5$ – высокий риск выявления MODY. При заданном пороговом значении чувствительность модели составила 79,6% (39 верных прогнозов среди 49 пациентов с MODY), специфичность составила 79,5% (31 верных прогнозов среди 39 пациентов без установленных вариантов в генах обуславливающих MODY).

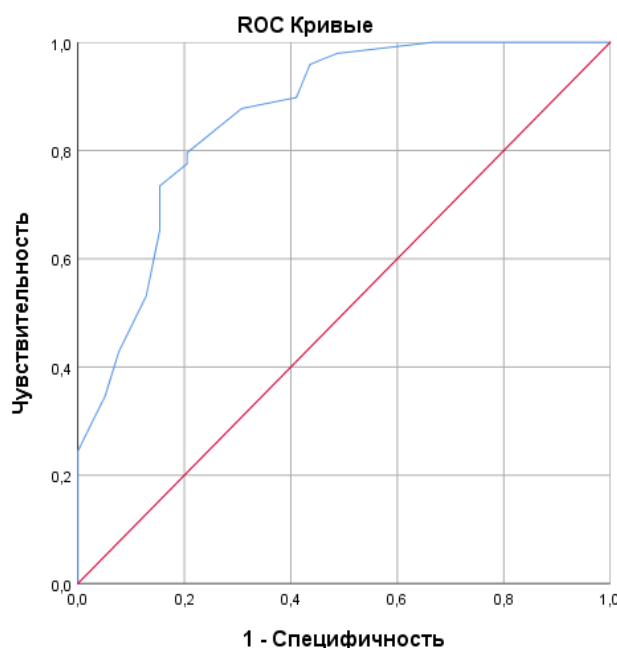


Рисунок 3 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности выявления MODY от значений логистической функции p

Для более доступного и рутинного использования предложен онлайн-калькулятор (<https://medstatistic.ru/calcs/mody1.html>).

Для оценки модели были использованы данные пациентов с СД 1 типа ($n=17$) и установленным MODY (не вошедших в настоящее исследование) ($n=13$). Вероятность диагноза MODY выражалась в долях %, менее 50% – низкая вероятность, более – высокая. Прогностическая ценность положительного результата (PPV) составила – 68,8% (95% ДИ: 50,4-82,6%), прогностическая ценность отрицательного результата (NPV) – 85,7% (95% ДИ: 61,8-95,7%); чувствительность 84,6% (95% ДИ: 54,6-98,1) и специфичность 70,6 (95% ДИ: 44,0-89,7%). Безусловно, для апробации модели требуется большее количество наблюдений в будущем.

Клинико-лабораторная и молекулярно-генетическая характеристика пациентов с *GCK-MODY*

Данный подтип *MODY* был установлен на основании наличия мутации в гене *GCK* в гетерозиготном состоянии. *MODY2* диагностирован 44 пациентам в настоящем исследовании, из них 24 мальчика и 20 девочек. Медиана длительности заболевания 2,67 года [0,88; 4,29]. С ожирением было включено 3 пациента, медиана SDS ИМТ составила 0,19 [-0,19; 1,21].

При манифестации заболевания «большие симптомы СД» отмечались у 11,36% пациентов (n=5), признаки кетоза (кетонурия) были выявлены у 4,55% пациентов (n=2).

Среди 44 пациентов с вариантами в гене *GCK* 37 человек получали диету (84,1%), 7 пациентов медикаментозное лечение (15,9%), в том числе 3 инсулин и 4 метформин. Коррекция терапии после получения результатов МГИ была проведена 7 пациентам и не привела к ухудшению компенсации СД, что было оценено по уровню HbA1C.

Всего было выявлено 40 мутации в гене: 14 патогенных, 20 вероятно патогенных и 6 мутаций с неизвестным клиническим значением; 10 из них ранее не описаны.

Типы выявленных мутаций представлены на рисунке 4.

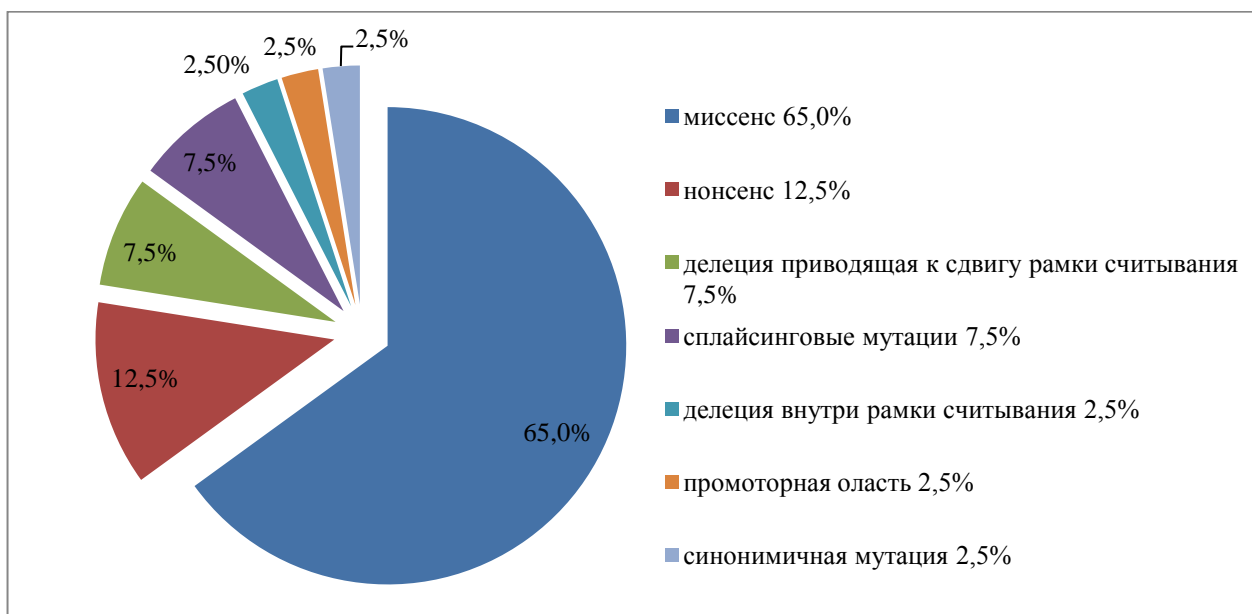


Рисунок 4 – Типы выявленных вариантов в гене *GCK*

Локализация мутаций представлена на рисунке 5.

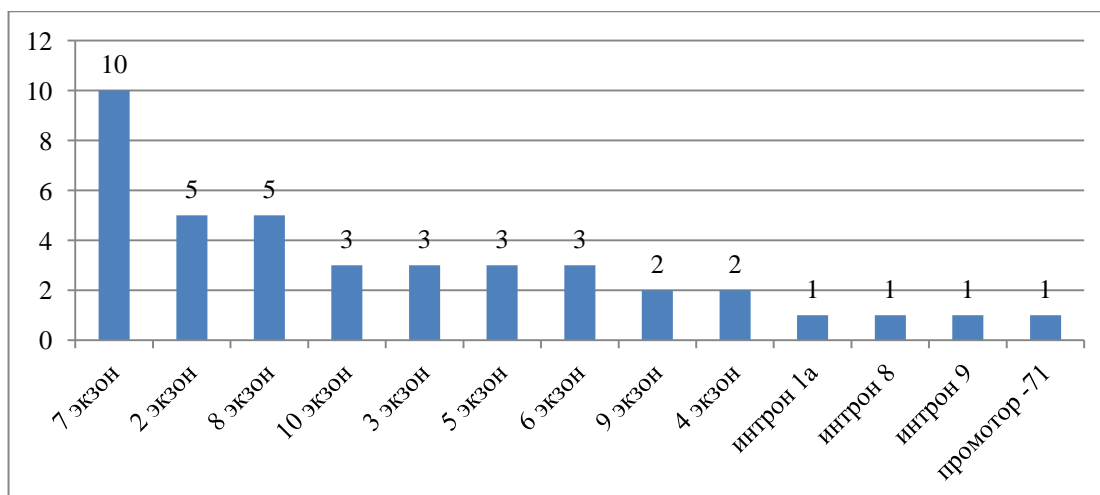


Рисунок 5 – Локализация мутаций в гене *GCK*

Кроме того, у 29 пациентов с установленным MODY (из них 16 пациентов с MODY2) была исследована промоторная область гена *GCK* на наличие варианта с.-71G>C. Генетическое изменение в данном регионе было выявлено у одного пациента в сочетании с ранее описанной мутацией в *GCK* с.754T>C (p.Cys252Ar). За время 5 лет наблюдения у пациента отмечалось классическое течение MODY2.

Клинико-лабораторная и молекулярно-генетическая характеристика пациентов с *HNF1A* –MODY

Данный подтип MODY был установлен на основании наличия мутации в гене *HNF1A* в гетерозиготном состоянии, диагностирован у 8 пациентов, из них 2 мальчика и 6 девочек. Медиана длительности заболевания 1,91 года [0,88; 3,63]. Медиана SDS ИМТ 0,06 [-0,92; 1,04].

В дебюте заболевания большие симптомы СД и лабораторные признаки кетоза (кетонурия) отмечались у 75,0% пациентов (n=6) и 50,0% (n=4) соответственно. Глюкозурия в дебюте заболевания была выявлена у 62,5% (n=5) пациентов с MODY3.

Среди 8 пациентов с вариантами в *HNF1A* 4 человек получали диету (50,0%), 4 пациентов медикаментозное лечение, в том числе 3 инсулин и 1 метформин. Согласно многочисленным литературным данным, пациентам с вариантами в указанном гене возможен перевод на препараты СМ. Одной пациентке была проведена коррекция лечения в связи с нежеланием соблюдать режим инсулинотерапии и отсутствием компенсации на фоне нерегулярных подкожных инъекций. Компенсации СД удалось достичь на дозе глибенкламида 4,375 мг/сут. Попытка перевода пациентки получавшей метформин на СМ оказалась unsuccessful в связи с развитием нежелательных явлений – легких гипогликемий.

Всего было выявлено 6 мутаций в гене: 1 патогенная, 3 вероятно патогенных и 2 мутации с неизвестным клиническим значением; 1 из них ранее не описана. Преобладали миссенс мутации (n=5), у двух пациентов выявлена дупликация гена. Варианты были локализованы в 1, 2, 3, 4 и 7 экзонах.

Особенности возрастной структуры у пациентов с MODY2 и MODY3

При анализе возраста манифестации заболевания в 13,95% случаев ($n=7$) гипергликемия у пациентов с MODY2 была выявлена в возрасте до года, медиана возраста диагностики составила 7,7 года [2; 12], в то время как при MODY3 нарушения углеводного обмена диагностировали чаще в подростковом возрасте – медиана возраста диагностики 14,83 года [13,58; 15,62], данные различия были статистически значимы ($p=0,002$). (рисунок 6).

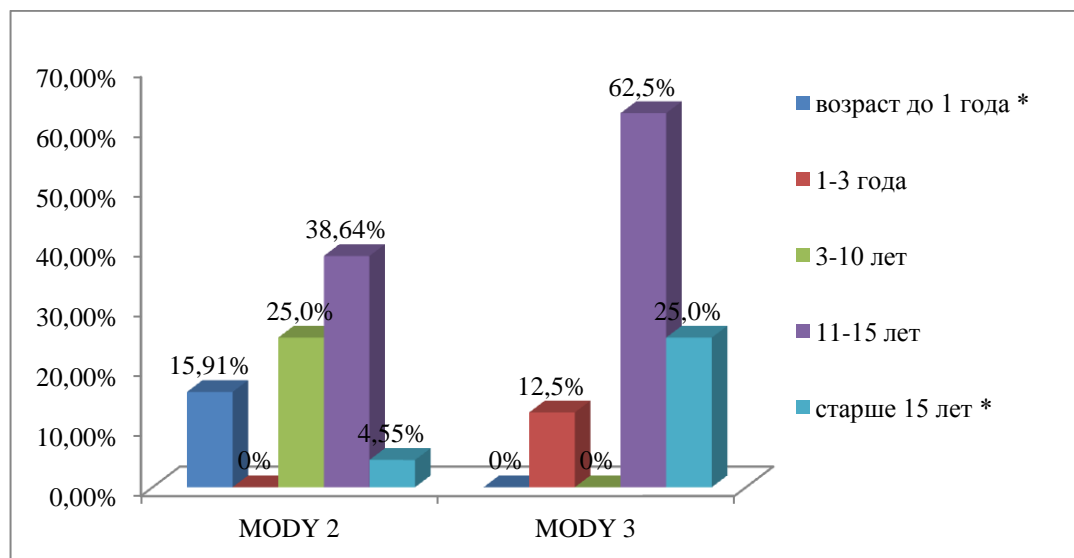


Рисунок 6 – Возрастная структура пациентов с MODY2 и MODY3

Характеристика пациентов с неонатальным сахарным диабетом и с сахарным диабетом в структуре генетических синдромов

В группу пациентов НСД были включены случаи СД манифестировавшего в первые 6 месяцев жизни ($n=13$) и подозрением на СД в структуре генетических синдромов ($n=7$). Основные данные пациентов с подтвержденной генетической этиологией представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Характеристика пациентов с НСД и СД в структуре генетических синдромов

Ген	Возраст манифестации и НУО	НУО у родителей	Уровень С-пептида (нг/мл)	Сопутствующая патология	Лечение
<i>GATA6</i>	2 сутки жизни	нет	2,18	стеноз нисходящего отдела аорты, открытый артериальный проток 2,5 мм	инсулин
<i>GCK</i>	1 сутки жизни	СД	1,2	нет	инсулин
<i>KCNJ11</i>	2 месяца	нет	0,22	нет	инсулин

Продолжение таблицы 6

Ген	Возраст манифестации НУО	НУО у родителей	Уровень С-пептида (нг/мл)	Сопутствующая патология	Лечение
<i>KCNJ11</i> 1	4 месяца	нет	0,1	нет	инсулин
<i>ABCC8</i>	3,5 месяца, рецидив в 12 лет	нет	0,8	нет	инсулин
<i>FOXP3</i>	12 лет	нет	4,9	ювенильный полиартрит, РФ-, псориаз	диета
<i>SLC19A2</i>	4 года	нет	1,1	ацетонемические рвоты, альтернирующее расходящееся косоглазие, макулопатия (абиотрофия сетчатки OU?)	диета
<i>EIF2AK3</i> 3	3 месяца	нет	0,2	токсический гепатит, низкорослость тяжелой степени	инсулин
<i>ALMS1</i>	7 лет	нет	инсулин 35,6 мкЕд/мл	ожирение 3 степени двусторонний крипторхизм, гипоплазия дисков зрительных нервов обоих глаз, расходящееся косоглазие, слабовидение.	метформин 2000 мг/сут

Всего выявлено 12 мутаций, 7 из них патогенные, 3 вероятно патогенные, 2 с неизвестным клиническим значением; 9 вариантов в литературе не описаны.

Согласно многочисленным данным литературы, у пациентов с вариантами в *KCNJ11* отмечается чувствительность к препаратам СМ. В настоящем исследовании варианты в указанном гене выявлены у 2 человек. В первом случае (с.988T>C (p.Tyr330His)) перевод пациентки в возрасте 4 месяцев с инсулина на глибенкламид (максимальная используемая доза 1,3 мг/кг/сут) был неэффективен. Во втором случае (с.133_135del (p.Ala45del)) подобная попытка перевода пациента 1 года на глибенкламид (максимальная используемая доза 0,7 мг/кг/сут), сопровождалась развитием аллергического дерматита в тяжелой форме,

потребовавшего отмены препарата. Инсулинотерапия была возобновлена; проводится углубленное аллергологическое обследование.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведение молекулярно-генетического исследования с использованием секвенирования нового поколения в группе пациентов с подозрением на МСД является новейшим и высоко эффективным методом диагностики в практике врачей-детских эндокринологов. Использование данного метода открывает новые возможности выявлять редкие и мало изученные варианты заболевания. Установка точного диагноза позволяет разработать схему патогенетически обоснованного лечения и сформировать персонифицированный алгоритм ведения для каждого конкретного пациента. Дальнейшее изучение особенностей пациентов с MODY и формирование более крупных баз данных позволит усовершенствовать алгоритмы дифференциальной диагностики и предложенной прогностической модели в будущем.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что моногенный сахарный диабет составляет 3,12% от всех случаев сахарного диабета у детей в Санкт-Петербурге и является вторым по частоте специфическим типом данного заболевания. Самым распространенным вариантом моногенного сахарного диабета является MODY2 (83,0% случаев), реже встречается MODY3 (15,1%), очень редко – прочие типы (менее 2%).

2. Выявлено, что у детей первого года жизни причиной хронической гипергликемии являются такие формы моногенного сахарного диабета, как неонатальный сахарный диабет и MODY2, причем единственным проявлением MODY2 может быть повышение уровня глюкозы крови.

3. Определено, что наиболее чувствительными маркерами MODY являются: отягощенный семейный анамнез, сохранный уровень С-пептида (1,1-4,4 нг/мл), медленно прогрессирующее течение заболевания (HbA1C 6-7,1%) и отсутствие потребности в инсулинотерапии.

4. Показано, что такие симптомы сахарного диабета, как снижение массы тела, кетонурия, потребность в экзогенном инсулине не всегда исключают диагноз MODY.

5. Чувствительность и специфичность предложенной прогностической модели дифференциальной диагностики MODY составили более 75%.

6. Доказано, что при использовании предложенного алгоритма диагностики моногенных форм сахарного диабета у детей диагноз генетически подтвержден в 53,8% случаев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с сахарным диабетом, манифестировавшим в первые 6 месяцев жизни, а так же тем детям, у которых гипергликемия выявлена случайно на 1 году жизни рекомендовано исключение МСД или рекомендовано проведение МГИ для исключения МСД.

2. Детям с MODY2 рекомендована монотерапия диетой. При вариантах в гене *HNFI1A* (MODY3) и генах АТФ-зависимых калиевых каналов (*KCNJ11* и *ABCC8*) рекомендовано рассмотреть вопрос об изменении лекарственной терапии сахарного диабета – переводе на препараты сульфонилмочевины.

3. В случае отсутствия вариантов в таргетной панели генов, ассоциированных с моногенным сахарным диабетом, целесообразно проведение полноэкзомного секвенирования, расширяющего диагностические возможности. Алгоритм представлен на рисунке 7.

4. Рекомендовано использовать прогностическую модель для дифференциальной диагностики MODY, которая в виде онлайн-калькулятора доступна по ссылке <https://medstatistic.ru/calcs/mody1.html>

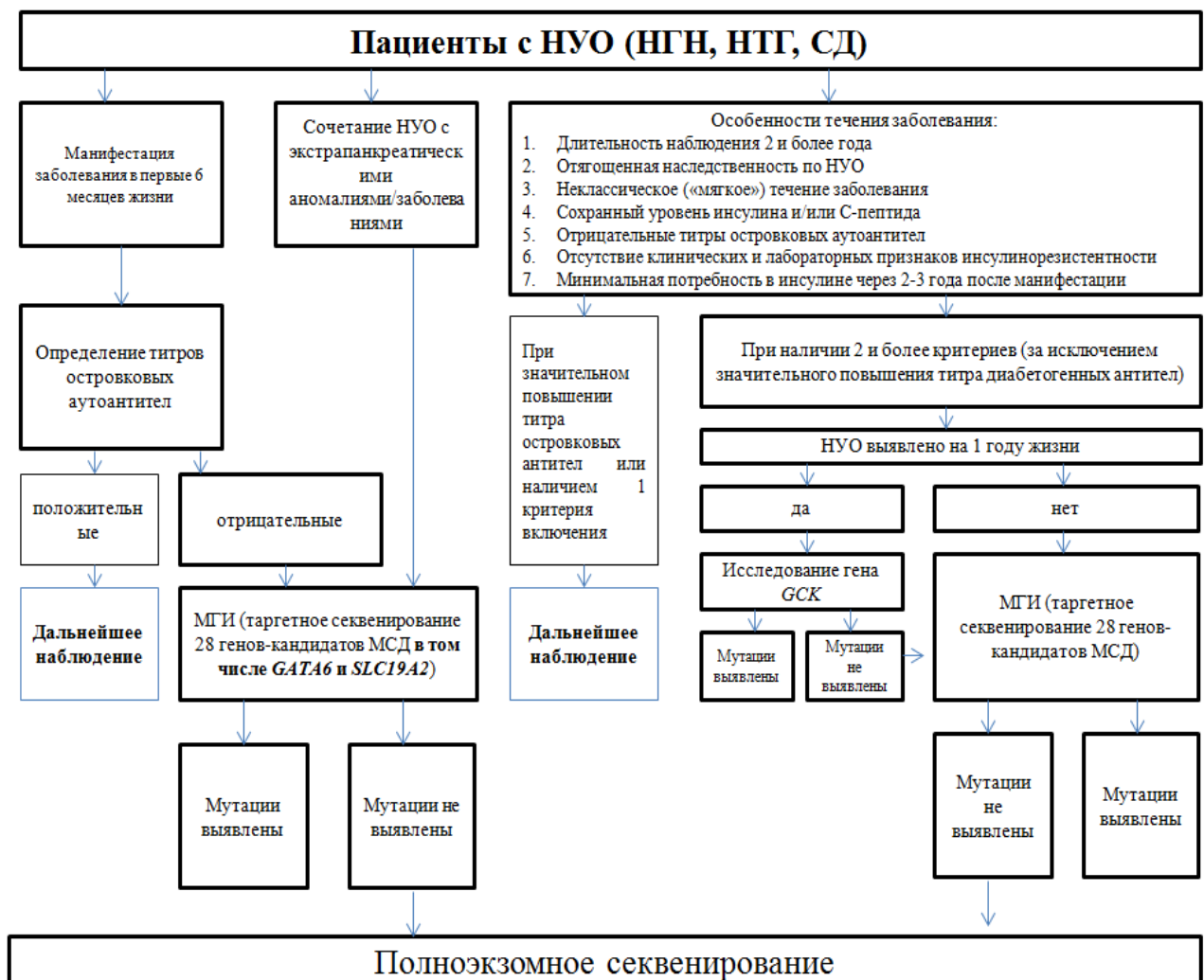


Рисунок 7 – Алгоритм дифференциальной диагностики различных вариантов моногенного сахарного диабета у детей

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дитковская, Л.В. Неонатальный сахарный диабет вследствие мутации в гене глюкокиназы (*GCK*) / Л.В. Дитковская, Ю.Л. Скородок, Л.В. Тыртова, Е.Н. Суспицын, Л.А. Желенина, М.Е. Туркунова // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. – 2016. – Т. 95, № 1. – С. 82-85.
2. Глотов, О.С. Анализ экзотов у детей с *MODY* диабетом / О.С. Глотов, А.С. Глотов, Е.А. Серебрякова, Е.Б. Башнина, О.С. Берсенева, М.Е. Туркунова [и др.] // *Молекулярная диагностика 2017 : сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. – Москва, 2017. – С. 442-443.
3. Туркунова, М.Е. Молекулярно-генетическая диагностика моногенных форм сахарного диабета у детей / М.Е. Туркунова, Е.Б. Башнина, Л.А. Желенина [и др.] // *Генетика человека и патология : сборник научных трудов. Выпуск 11 / под редакцией В.А. Степанова*. – Томск, 2017. – С. 216-217.
4. Туркунова, М.Е. Неонатальный сахарный диабет в структуре *IPRX*-синдрома / М.Е. Туркунова, Л.В. Дитковская, Е.Н. Суспицын [и др.] // *Педиатр*. – 2017. – Т. 8, № 2. – С. 99-104.
5. Туркунова, М.Е. Полноэкзомное секвенирование в алгоритме диагностики сахарного диабета типа *MODY9*. Описание клинического случая / М.Е. Туркунова, О.С. Глотов, Е.А. Серебрякова, А.С. Глотов [и др.] // *Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере: сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции, Сургут, 21 октября 2017 г. / Сургут. Гос. Ун-т, Медицинский институт*. – Сургут, 2017. – С. 233-240.
6. Туркунова, М.Е. Частота встречаемости наследственных вариантов сахарного диабета (*MODY*) у детей в Санкт-Петербурге / М.Е. Туркунова, Е.Б. Башнина, Л.А. Желенина [и др.] // *Сахарный диабет – пандемия XXI: сборник тезисов VIII (XXV) Всероссийского диабетологического конгресса с международным участием. ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России; ОО «Российская ассоциация эндокринологов»*. – Москва, 2018. – С. 153-154.
7. Туркунова, М.Е. Подтверждение патогенетической гетерогенности сахарного диабета у детей / М.Е. Туркунова, Л.В. Дитковская, Е.Б. Башнина [и др.] // *Медицина: теория и практика*. – 2019. – Т. 4, № 5. – С. 551-552.
8. Глотов, О.С. Применение NGS для повышения эффективности молекулярно-генетической диагностики моногенных форм сахарного диабета у детей / О.С. Глотов, Е.А. Серебрякова, М.Е. Туркунова [и др.] // *Медицинская генетика*. – 2020. – Т. 19, № 5 (214). – С. 86-88.
9. Glotov, O.S. Exome sequencing in infants with monogenic diabetes mellitus in Russia / O.S. Glotov, A.S. Glotov, E.A. Zukova, E.B. Bashnina, O.S. Beresneva, М.Е. Turkunova [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. – 2016. – Vol. 24, № S1. – P. 142.
10. Glotov, O.S. Whole-exome sequencing in Russian children with non-type 1 diabetes mellitus reveals a wide spectrum of genetic variants in *MODY*-related

and unrelated genes / O.S. Glotov, E.A. Serebryakova, M.E. Turkunova [et al.] // Mol. Med Rep. – 2019. – Vol. 20, № 6. – P. 4905-4914.

11. **Turkunova. M.E.** Confirmation of pathogenetic heterogeneity of diabetes mellitus in children using whole-exome sequencing / M.E. Turkunova, L.V. Ditkovskaya, E.B. Bashnina [et al.] // Archives of Disease in Childhood. – 2019. – Vol. 104, № S3. – C. A84-A85.
12. **Turkunova. M.E.** Whole-exome sequencing for monogenic diabetes in Russian children reveals high frequency of genetic variants in MODY-related and unrelated genes / M.E. Turkunova, E.B. Bashnina, L.V. Ditkovskaya [et al.] // Diabetes Technology and Therapeutics. – 2019. – Vol. 21, № S1. – C. 335.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИМТ	– индекс массы тела
МГИ	– молекулярно-генетическое исследование
МСД	– моногенный сахарный диабет
НГН	– нарушенная гликемия натощак
НСД	– неонатальный сахарный диабет
НТГ	– нарушение толерантности к глюкозе
НУО	– нарушение углеводного обмена
ОГТ	– оральный глюкозотолерантный тест
ПСС	– пероральные сахароснижающие средства
СД	– сахарный диабет
СМ	– сульфонилмочевина
GAD	– антитела к глутаматдекарбоксилазе
НвА1С	– гликированный гемоглобин А1С
IAA	– антитела к инсулину
IA2	– антитела к тирозинфосфатазе
ICA	– антитела к β -клеткам