

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Analiza wybranych polimorfizmów genów rs2476601 A/G- PTPN22, rs20541 A/G- IL13, rs29941 A/G- KCTD15 w patogenezie cukrzycy typu 1 u dzieci.

WSTĘP

Cukrzyca typu 1 (ang. diabetes mellitus type 1, T1DM) jest autoimmunologicznie uwarunkowaną chorobą charakteryzującą się uszkodzeniem komórek β trzustki, prowadzącą do niedoboru insuliny. Patogeneza autoimmunologicznej cukrzycy typu 1 jest złożonym procesem, o wciąż niejasnej, wieloczynnikowej etiologii. Istotną rolę odgrywają w nim predyspozycje genetyczne, czynniki środowiskowe oraz immunologiczne.

Aktualne badania epidemiologiczne wskazują na wzrost nowych zachorowań w Polsce na T1DM o 7% rocznie, aż do aktualnie 17.3 nowych przypadków poniżej 14 roku życia na 100 tysięcy na rok. Największy wzrost odnotowano u dzieci w przedziale wiekowym 5-9 lat, bez różnic ze względu na płeć. Z uwagi na największy wzrost zachorowalności na T1DM w grupie dzieci młodszych możemy przypuszczać, iż istotne znaczenie w patomechanizmie rozwoju cukrzycy typu 1 mają czynniki genetyczne oraz czynniki epigenetyczne wpływające na ekspresję genów.

Cukrzyca typu 1 ma wielogenowe podłoże. W około połowie ryzyko rozwoju T1DM zdeterminowane jest przez ludzkie antygeny leukocytarne (HLA). Z uwagi na zróżnicowaną rolę genów HLA zarówno w selekcji limfocytów T, prezentacji antygenów oraz odpowiedzi immunologicznej, istnieje silny związek pomiędzy HLA, a ryzykiem wystąpienia oraz progresji T1DM. Kombinacje alleli HLA DR i DQ wyznaczają predyspozycję genetyczną. Dotychczas zidentyfikowano ponad 60 regionów chromosomów związanych ze zwiększoną podatnością na zapadalność na T1DM. Wyodrębniono geny podatności rozwoju chorób autoimmunizacyjnych oraz geny immunomodulujące.

CEL PRACY

Głównym celem pracy było:

Określenie związków występowania wybranych polimorfizmów: rs2476601 genu PTPN22, rs20541 genu IL-13 oraz rs29941 genu KCTD15 z występowaniem cukrzycy typu 1 w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

Dodatkowymi celami było:

- Określenie związków występowania polimorfizmów rs2476601 genu PTPN22, rs20541 genu IL-13, rs29941 genu KCTD15 w grupie pacjentów z T1DM, a wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1.

- Określenie związków występowania polimorfizmów rs2476601 genu PTPN22, rs20541 genu IL-13, rs29941 genu KCTD15 w grupie pacjentów z T1DM, a obecnością przeciwciał przeciwcukrzycowych ICA, GAD, IA2, ZnT8, IAA.

- Określenie związków występowania polimorfizmów: rs2476601 genu PTPN22, rs20541 genu IL13, rs29941 genu KCTD15, a parametrami antropometrycznymi.

- Ocenę wartości hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w momencie rozpoznania cukrzycy typu 1 w zależności od występowania polimorfizmów rs2476601 genu PTPN22, rs20541 genu IL13, rs29941 genu KCTD15.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 183 pacjentów: 82 dziewczynki (44.8%)/101 chłopców (54.6%) z rozpoznaną cukrzycą typu 1 na podstawie wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Średnia wieku w grupie badanej wynosiła 10.35 ± 3.9 lat. Do grupy kontrolnej włączono 160 zdrowych ochotników: 75 dziewczynek (46.9%) / 85 chłopców (53.1%), niespokrewnionych z chorymi na T1DM. W badaniu wzięły udział osoby w wieku 16.3 ± 3 lat, po wyrażeniu świadomej zgody, bez towarzyszących chorób autoimmunologicznych. Rozkład płci w obu grupach był porównywalny.

U wszystkich dzieci pobrano próbki krwi na EDTA w celu oznaczenia polimorfizmów genów PTPN22 (rs2476601), IL-13 (rs20541), KCTD15 (rs29941). Wyizolowanie genomowego DNA z leukocytów krwi obwodowej przeprowadzono metodą wysalania, tzw. "salting out", następnie przeprowadzono właściwą reakcję PCR (Life Technologies, USA). W celu określenia polimorfizmów użyto sond molekularnych typu TaqMan (Life Technologies, USA). Ponadto w analizie wzięto pod uwagę dane antropometryczne: płeć, wzrost, masę ciała, wyliczono wskaźnik BMI oraz wskaźnik odchylenia standaryzowanego BMI (BMI SDS), wiek pacjentów grupy badanej w momencie zachorowania na T1DM. Ponadto odnotowano z dokumentacji medycznej wartość hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w momencie rozpoznania T1DM oraz liczbę jednostek insuliny na kilogram masy ciała na dobę, a także odnotowano obecność poszczególnych przeciwciał przeciwcukrzycowych.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. W celu określenia siły związku pomiędzy częstościami konkretnych alleli/genotypów a występowaniem cukrzycy typu 1 przeprowadzono analizę kontyngencji. Wykorzystano do tego celu dokładny test Fisher'a. Wyznaczono dodatkowo wartość wskaźnika ilorazu szans („odds-ratio”) i związany z nim dokładny poziom ufności na poziomie 95%. Dokładny przedział ufności dla ilorazu szans oraz związaną z nim wartość prawdopodobieństwa p wyznaczano z wykorzystaniem medianowo-nieobciążonego estymatora ilorazu szans. W celu wykrycia potencjalnych związków pomiędzy allelami/genotypami a cechami numerycznymi wykorzystano test t oraz nieparametryczny test Wilcoxon. Wybór testu uwarunkowany był spełnieniem założeń: (a) rozkładu cechy zbliżonego do rozkładu normalnego, zweryfikowano testem Shapiro-Wilka; (b) homogeniczności wariancji, zweryfikowano testem Levena. W przypadku otrzymania istotnego wyniku przez test t lub Wilcoxon przeprowadzono analizę post-hoc polegającą na testowaniu par. W przypadkach wielokrotnego testowania (np. post-hoc) zastosowano poprawkę p -value – FDR. Przeprowadzono dodatkowo, jako uzupełnienie analizy kontyngencji, testy proporcji. Do obliczeń wykorzystano środowisko do obliczeń statystycznych R, a poziom istotności został ustalony na poziomie $\alpha = 0.05$.

WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonych analiz postawiono następujące wnioski dotyczące polimorfizmu:

rs29941 KCTD15

Wykazano 2.39 razy częstsze występowanie allelu A rs29941 genu KCTD15 u pacjentów z cukrzycą typu 1 względem grupy kontrolnej niż przy obecności allelu G. Stwierdzono, iż wraz ze zwiększeniem się liczby alleli G rs29941 KCTD15, zarówno dla genotypu A/G vs. genotypu A/A oraz G/G vs. A/A, maleje ryzyko wystąpienia T1DM. W grupie dziewczynek z genotypem G/G rs29941 KCTD15 oraz w grupie chłopców z genotypem G/G rs29941 KCTD15 stwierdzono rzadsze występowanie cukrzycy typu 1. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów A/A, A/G, G/G polimorfizmu rs29941 genu KCTD 15 z uwagi na płeć w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1. Dziewczynki z genotypem A/A rs 29941 genu KCTD charakteryzowały się niższym średnim wiekiem w momencie rozpoznania T1DM (8.04 lat) w porównaniu do genotypu A/G (10.72 lat). Nie stwierdzono różnic pomiędzy średnimi wartościami BMI oraz wartościami HbA1c w momencie zachorowania na T1DM, a występowaniem poszczególnych alleli rs29941 genu KCTD15. U dziewcząt z polimorfizmem rs 29941 w przypadku obecności allelu A stwierdzono istotnie większy odsetek pozytywnych przeciwciał ICA (>50%). W grupie chłopców z T1DM z polimorfizmem rs29941 KCTD15 wykazano, iż allel G częściej występuje w grupie pacjentów posiadających dodatnie przeciwciała ICA, niż w grupie z ujemnymi przeciwciałami. Wykazano iż, w przypadku polimorfizmu rs29941 KCTD15 wraz ze wzrostem liczby alleli G wzrasta szansa pojawienia się przeciwciała ICA u płci męskiej.

rs20541 IL-13

Pacjenci z polimorfizmem rs20541 genu IL-13 z allelem G mieli większe średnie dobowe dawki insuliny (j. insuliny/kg masy ciała/dobę) niż pacjenci z allelem A, odpowiednio 0.84 j./kg masy ciała/dobę vs. 0.66j./kg masy ciała/dobę. Chłopcy z genotypem G/G rs20541 byli średnio o 3 lata młodsi w momencie rozpoznania T1DM w porównaniu do osób z genotypem A/A rs20541, odpowiednio 10.47 lat vs. 13.24 lat. W przypadku obecności allelu G rs20541 w grupie dziewczynek stwierdzono istotnie większy odsetek (>50%) pozytywnych przeciwciał ICA oraz ZnT8 niż w przypadku obecności allelu A.

rs2476601 PTPN22

Stwierdzono, iż wraz z pojawieniem się allelu A rs2476601 genu PTPN22 ryzyko rozwinięcia cukrzycy typu 1 stanowi 1.93 x ryzyka zachorowania przy obecności allelu G. U dziewcząt wraz z wystąpieniem allelu A rs2476601 ryzyko zachorowania stanowi 2.23 ryzyka zachorowania przy obecności allelu G. W zestawieniu poszczególnych genotypów rs2476601 genu PTPN22 w grupie dziewczynek, wykazano istotną statystycznie różnicę w średnim wieku zachorowania u osób z genotypem A/A wynoszącym średnio 6.5 roku vs. genotypem G/G wynoszącym średnio 10.3 lat. Porównując średnie BMI w momencie rozpoznania cukrzycy typu 1, wykazano, iż genotyp AA rs 2476601 PTPN 22 charakteryzował się wyższym średnim BMI w grupie chłopców niż genotyp GG, odpowiednio 25.6 kg/m² vs. 19.41 kg/m². Stwierdzono istotnie większy odsetek dodatnich przeciwciał (>50%) ICA w grupie dziewczynek z T1DM z allelem G. Natomiast w grupie chłopców wykazano, iż wraz z pojawieniem się allelu A rs 24766012 PTPN 22 wzrasta prawdopodobieństwo wystąpienia przeciwciał ICA.

WNIOSKI

Wszystkie trzy badane polimorfizmy, rs2476601, rs29941, rs20541, w przedstawionej przeze mnie pracy wskazują na ich udział w patogenezie cukrzycy typu 1.

Polimorfizm rs 2476601 genu PTPN 22 bierze udział w patogenezie cukrzycy typu 1 u dzieci. Allel A rs 2476601 wykazuje działanie predysponujące do zachorowania na T1DM, predyspozycja szczególnie jest wyrażona u płci żeńskiej. Natomiast allel G rs 2476601 genu PTPN 22 wykazuje działanie ochronne.

Polimorfizm rs29941 KCTD 15 ma udział w patogenezie cukrzycy typu 1. Allel G wykazuje działanie ochronne przed rozwojem cukrzycy typu 1. Zależność zaznaczona zarówno w rozkładzie alleli oraz genotypów, bez różnic w zależności od płci. W grupie dzieci z T1DM wykazano istotnie częstsze występowanie allelu A polimorfizmu rs20541 genu Interleukiny-13, w porównaniu do grupy osób zdrowych.

W grupie dziewczynek z T1DM z genotypem A/A rs 2476601 obserwuje się istotnie niższy średni wiek zachorowania w porównaniu do genotypu G/G, 6.5 vs. 10.3 lat. W grupie chłopców z T1DM z genotypem G/G rs 20541 IL-13 obserwuje się znamienne niższy średni wiek zachorowania na T1DM, o 3 lata, w porównaniu do genotypu A/A rs 20541, odpowiednio 10.47 vs. 13.24lat. Dziewczynki z polimorfizmem rs 29941 z genotypem A/A zachorowały o ponad 2 lata wcześniej na T1DM w porównaniu do genotypu A/G.

Prawdopodobieństwo wystąpienia przeciwciał ICA jest większe w przypadku płci męskiej z polimorfizmem rs2476601 wraz z pojawieniem się allelu A, podobnie w przypadku płci żeńskiej z polimorfizmem rs2476601 z allelem G oraz w przypadku polimorfizmu rs20541 z allelem G. rs20541 z allelem G koreluje z częstszym występowaniem przeciwciał ZnT8 niż w grupie z allelem A.

Korelacje polimorfizmów rs2476601, rs20541 oraz 29941 z odchyleniem standardowym BMI, wykazały, iż genotyp A/A rs2476601 PTPN22 charakteryzował się istotnie wyższym średnim BMI w grupie chłopców w porównaniu do genotypu GG. Stwierdzono, iż ze zwiększeniem się liczby alleli G zmniejsza się ryzyko wystąpienia otyłości w porównaniu do allelu A.