На правах рукописи

Романенкова Елизавета Михайловна

Иммуногенетические основы фенотипической гетерогенности аутоиммунного сахарного диабета у детей

3.1.19. Эндокринология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Государственном научном центре Российской Федерации
Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
Лаптев Дмитрий Никитич
доктор медицинских наук, профессор РАН

Официальные оппоненты:
Петряйкина Елена Ефимовна
доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской педиатрии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Никитина Ирина Леоровна
доктор медицинских наук, профессор, заведующая научно-исследовательской лаборатории детской эндокринологии института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

Ведущая организация:
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «___» _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 в ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомится в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России - www.endocrincentr.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета, Мазурина Наталья Валентиновна
доктор медицинских наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на сложившиеся подходы к классификации и диагностике сахарного диабета у детей с отнесением всех аутоиммунных форм к одной нозологической единице, клиническая картина аутоиммунного сахарного диабета (СД) крайне гетерогенна, что, очевидно, в значительной степени детерминировано генетическими и иммунологическими особенностями индивидуума.

В настоящее время, наряду с HLA системой, определяющей более 50% генетического риска, установлено более 75 генетических маркеров сахарного диабета 1 типа (СД1). При этом у детей изучение генетических основ аутоиммунного СД в основном ограничивается прогнозированием заболевания и выявлением групп риска с целью разработки методов профилактики СД. В то же время изучение зависимости клинического течения заболевания от иммунологических и генетических характеристик могло бы предоставить дополнительные перспективы в понимании патогенеза СД1, его прогнозировании и профилактике.

Понимание молекулярно-генетических, иммунологических, биохимических, гормональных особенностей течения различных форм аутоиммунного СД послужит основой для исследования новых сигнальных путей, задействованных в патогенезе нарушения функции бета-клетки, что будет иметь как фундаментальное значение, так и может позволить усовершенствовать методы ранней диагностики и профилактики аутоиммунного СД.

После начала инсулинотерапии у 80% детей с СД1 отмечается снижение дозы инсулина или полная его отмена, и развитие клинико-лабораторной ремиссии. При длительном отсутствии потребности в инсулине в случаях ранней доклинической диагностики СД1 и при полной клинико-лабораторной ремиссии СД1 более 6 месяцев возникает вопрос о необходимости проведения дифференциальной диагностики между аутоиммунным СД и неиммунными формами СД, в первую очередь MODY. Схожесть клинической картины при СД1 и MODY приводит на догенетическом этапе как к гипердиагностике MODY и избыточному направлению на молекулярно-генетическое исследование пациентов с аутоиммунным СД, так и к недостаточному выявлению MODY.

Стандартизированных клинических подходов для дифференциальной диагностики различных форм СД в настоящее время не существует. Существующие на сегодняшний день калькуляторы риска MODY валидизированы для пациентов старше 18 лет. Создание алгоритма искусственного интеллекта, разработанного на детской популяции, поможет своевременно выявлять моногенные формы СД у детей и оптимизировать диагностику и лечение заболевания.

Цель научного исследования

Изучить клинические, генетические, иммунологические, гормональные особенности клинических фенотипов СД. Разработать алгоритмы дифференциальной диагностики различных форм СД.

Задачи научного исследования

1. Изучить секрецию С-пептида у детей с началом СД1 в пубертатном и допубертатном возрасте при различной длительности заболевания.
2. Определить особенности иммунологического профиля по наличию островковых аутоантител (ААт) у пациентов с различной длительностью заболевания и в зависимости от возраста манифестации СД1.
3. Установить клинико-лабораторные, иммунологические и генетические особенности пациентов с ремиссией СД1 и выявить предрасполагающие к ремиссии факторы.
4. Определить клинические и иммунологические критерии дифференциальной диагностики MODY диабета и СД1 в период ремиссии.
5. Разработать модель персонализированного прогнозирования MODY на основании значимых клинико-диагностических показателей.

6. Выявить генетические варианты, связанные с нарушением углеводного обмена, у пациентов с ремиссией СД1 методом полноэкзомного секвенирования

Научная новизна исследования

В данной работе впервые в российской популяции проведено изучение различных фенотипов СД1 у детей. Изучены возрастные особенности секреции С-пептида у детей при СД1, а также проведен анализ резервной функции β-клеток в зависимости от длительности заболевания. Впервые проведен сравнительный анализ частоты выявления ААт в различных возрастных группах, а также при различной длительности СД1 у детей. Впервые на большой выборке изучены клинические, лабораторные, иммунологические предикторы развития длительной ремиссии СД1 в детском возрасте. На большой выборке изучены генетические основы гетерогенности СД1 при классическом течение заболевания и при длительной ремиссии, выявлены HLA-генотипы, являющиеся возможными генетическими предикторами отсутствия длительной ремиссии СД1 у детей. Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование, в том числе полноэкзомное секвенирование, пациентам с неклассическим течением СД1, выявлены варианты в генах, ответственных за секрецию, действие инсулина, а также за развитие поджелудочной железы.

Проведена сравнительная характеристика пациентов с полной ремиссией СД1 и MODY. Впервые разработана модель клинического прогнозирования сахарного диабета MODY на педиатрической выборке пациентов.

Теоретическая и практическая значимость

Выявлены факторы, влияющие на секрецию С-пептида у детей. Продемонстрированы возрастные особенности иммунологического статуса детей с СД1, а также влияние длительности заболевания на частоту серопозитивности. Определены клинические, лабораторные, генетические факторы, ассоциированные с ремиссией СД1. Разработанная модель клинического прогнозирования позволит с высокой точностью выявлять пациентов с моногенной формой СД и позволит своевременно направлять пациентов на молекулярно-генетическое тестирование для дифференциальной диагностики форм СД и назначения возможного патогенетического лечения.

Личное участие автора в получении научных результатов

Автор лично провел анализ состояния научной проблемы в мире на основании литературных данных, сформулировал цель, задачи и дизайн диссертационной работы. Принимал непосредственное участие в клинической работе с пациентами, в организации проведения лабораторных исследований. Автор подготовил базу данных, систематизировал полученные данные, проводил отбор критериев для разработки системы поддержки принятия врачебных решений (СППВР), осуществил статистический анализ, подготовил публикации по теме диссертации.

Степень достоверности

Достоверность изложенных в настоящем исследовании положений, выводов и рекомендаций подтверждаются тщательным анализом научно-исследовательских работ по гетерогенности СД; согласованностью полученных результатов с зарубежными данными; применением методов исследования с доказанной эффективностью; проведением экспериментальных методов согласно стандартам и с современными средствами измерений; применением статистического анализа для обработки полученных данных

Апробация результатов работы

Апробация диссертационной работы проведена на межкафедральном заседании сотрудников кафедр эндокринологии, диабетологии и диетологии, детской эндокринологии-диабетологии Института высшего и дополнительного профессионального образования и научных сотрудников клинических и лабораторных подразделений ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России 08 ноября 2022 года.

Фрагменты диссертационной работы были представлены на конгрессе Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD online, 2020г); XX городской научно-практической конференции «Эндокринные аспекты в педиатрии» (Москва, 2021г.); II Конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям: «Персонализированный подход в детской эндокринологии» (Москва, 2022г.); Всероссийской научно-образовательной онлайн конференции «Актуальные вопросы современной эндокринологии: от инноваций до реальной клинической практики» (Москва, 2022г.); конференции Эндокринологического сообщества (ENDO online, 2021г.); XVII Российской научно-практической конференции детских эндокринологов «Достижения науки в практику детского эндокринолога» (г. Санкт-Петербург, 2021г.); конференции Европейской ассоциации детских эндокринологов (ESPE online, 2021г.); конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием: «Достижения науки в практику детского эндокринолога» (г. Москва, 2021г.); Всероссийской онлайн-конференции «Актуальные вопросы современной эндокринологии: от инноваций до реальной клинической практики» (Москва, 2022г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 2 входят в перечень отечественных рецензируемых журналов, рекомендуемых для публикации основных результатов диссертаций.

На разработанную систему поддержки принятия врачебных решений «Калькулятор вероятности MODY» получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ (RU2023613354, дата регистрации 2023-02-14).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах печатного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений. Библиография представлена 5 отечественными и 97 зарубежными источниками. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 22 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Работа состоит из следующих блоков: исследование С-пептида в зависимости от длительности СД и возраста манифестации; исследование пациентов, соответствующих критериям ремиссии СД; пациентам с длительной ремиссией СД проведены молекулярно-генетические исследования (HLA-секвенирование, полноэкзомное секвенирование); разработка системы поддержки принятия врачебных решений.

Обследование и набор пациентов проводился в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр» Минздрава России (президент – академик Дедов И.И., директор - д.м.н., профессор, член-корр. РАН Мокрышева Н.Г.) на базе детского отделения сахарного диабета (зав. отделением д.м.н. Лаптев Д.Н.) Института Детской эндокринологии (директор – д.м.н., профессор Безлепкина О.Б.). Дополнительный набор пациентов проходил в период с 2019 по 2021 гг.

Способ формирования выборки изучаемой популяции: сплошной. Репрезентативность выборки обеспечивается способом формирования и объемом выборки. Дизайн исследования: поперечное исследование, ретроспективный анализ данных.

Критерии включения: 1) сахарный диабет, установленный на основании общепринятых критериев диагностики (ISPAD 2018г., Клинические рекомендации «Сахарный диабет 1 типа у детей», 2022г.) или сахарный диабет MODY типа, подтвержденный на основании результатов молекулярно-генетического исследования; 2) возраст от 0 до 18 лет; 3) наличие данных по оценке резервной функции β-клеток и иммунологического обследования на наличие специфических ААт.

Критерии исключения: 1) синдромальные формы СД; 2) неонатальный СД; 3) СД2

На первом этапе пациенты были распределены на две группы: пациенты с СД1 и пациенты с MODY.

В дальнейшем были отобраны 1710 пациентов с СД, которым было проведено исследование уровня С-пептида, глюкозы, ААт.

Пациенты с СД1 (n=1333) разделены на группы в зависимости от возраста манифестации и длительности СД1.

На втором этапе отобраны пациенты, соответствующие критериям ремиссии СД1 (n=324): длительность СД более 6 месяцев, суточная потребность в инсулине менее 0,5 ед/кг. Группой сравнения являлись пациенты с длительностью СД1 менее 3 лет без ремиссии (n=636) с суточной потребностью в инсулине более 0,5 ед/кг, сопоставимые по длительности СД. В дальнейшем проведено сравнение пациентов с полной ремиссией СД1 (пациенты с отсутствием потребности в инсулине) (n=43) с пациентами с частичной ремиссией СД1 (n=191).

На третьем этапе 318 пациентам с СД1 (биологический материал которых был доступен: СД1 без ремиссии (n=247), СД1 с ремиссией (n=71)), проведено HLA-секвенирование.
37 пациентам с длительной ремиссией (более 1 года) проведено полноэкзомное секвенирование.

Пациенты с полной ремиссией СД1, имеющие результаты ПГТТ в 0, 30, 60, 90, 120 минутах после нагрузки глюкозой (n=43) сравнены с пациентами с MODY (n=114).

Методы исследования

Лабораторно-инструментальная диагностика. Всем пациентам был выполнен спектр лабораторно-инструментальных исследований на базе биохимической лаборатории (зав. Никанкина Л.В.) и отделения функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»: Гликированный гемоглобин (HbA1c) - определялся методом жидкостной ионообменной хроматографии на анализаторе «Diastat» («BioRad», США) с использованием набора того же производителя по унифицированной методике. Гормональные исследования крови: уровень иммунореактивного инсулина (ИРИ) и С-пептида оценивался методом усиленной хемилюминесценции на анализаторе COBAS 6000 фирмы «RocheDiagnostics» (Швейцария). Референсные значения С-пептида — 1,1–1,4 нг/мл. Уровень С-пептида менее 0,01 нг/мл оценивался как неопределяемый, более 0,01 нг/мл оценивался как определяемый, в том числе: от 0,01 до 0,5 нг/мл — как остаточный, 0,5-1,1 нг/мл — сохранный, более 1,1 нг/мл — нормальный. Иммунологическое исследование: количественное определение ААт к ICA, GADA и IAA проводилось с помощью иммуноферментных наборов «Isletest-ICA, GADA, IAA» фирмы «Biomerica», Ат к тирозинфосфатазе (IA-2A) - наборов «Medizym» фирмы «Medipan MGBH», Ат к ZnT8 – иммуноферментных наборов Zinc Transporter 8 Autoantibody Human ELISA фирмы «BioVendor». Положительным результатом считался уровень выше двух норм: ZnT8A — >15 ед/мл; IA-2A, GADA, IAA — >20 ед/мл, ICA — >2. *HLA-типирование*: Для оценки генетического вклада в состояние ремиссии при СД1, были отобраны ранее описанные в литературе предрасполагающие и протекторные DR-DQ гаплогенотипы, а также не-DR-DQ локусы в пределах HLA региона: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPB1. В анализ были включены только аллели с частотой встречаемости не менее 1,0% в общей группе. Для DR-DQ аллелей отдельно анализировались как частоты гаплотипов, так и их взаимодействий (генотипы), обладающие дополнительным риском или защитой по отношению к изолированному гаплотипу. Также для каждой группы был рассчитан показатель полигенного риска (genetic/polygenic risk score) по методологии описанной ранее. Для расчета данного показателя необходимо вычислить сумму, взвешенных на основании регрессионных коэффициентов, всех анализируемых предрасполагающих и протекторных аллелей. При этом DR-DQ гапло- и генотипы не суммируются между собой, то есть при наличии соответствующего генотипа, учитывается только его регрессионный коэффициент, а гаплотип учитывается только при отсутствии соответствующего генотипа. *Молекулярно-генетическое исследование:* в лаборатории генетики моногенных

эндокринных заболеваний ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ. Забор крови производился из локтевой вены вне зависимости от приема пищи в пробирки с консервантом этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) в концентрации 1,2–2,0 мг на 1 мл крови. Геномную ДНК извлекали роботизированной станцией Allsheng Autopure-96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., China) из периферической крови с использованием набора для выделения геномной ДНК из цельной крови NucleoMag Blood (MN). Выделенную ДНК качественно и количественно анализировали с помощью спектрофотометра Eppendorf Biospectrometer Fluorescence (Eppendorf AG, Germany) и набора Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) соответственно. *Панель «Сахарный диабет-гиперинсулинизм»:* Подготовку полногеномной библиотеки (KAPA HyperPlus, Roche, Швейцария) и обогащение матрицы ДНК (KAPA HyperCapture, Roche, Швейцария) производили в соответствии с протоколами производителя (Roche (La Roche Ltd). Кастомная панель включала в себя в том числе кодирующие области 27 генов: *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* которые, по научным литературным данным и базы данных из OMIM, были описаны при моногенных формах СД. Исследование проведено методом массового параллельного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) на платформе Illumina методом парно-концевого чтения (2x100 п.о.). *Полноэкзомное секвенирование:* Подготовку полногеномной библиотеки (KAPA HyperPlus, Roche, Швейцария) и обогащение матрицы ДНК (KAPA HyperCapture, Roche, Швейцария) производили в соответствии с протоколами производителя, используя набор зондов KAPA HyperExome (Roche, Швейцария). Исследование проведено методом массового параллельного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) на платформе Illumina методом парно-концевого чтения (2x100 п.о.). Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (HG38), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением компьютерных алгоритмов предсказания патогенности вариантов (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, Polyphen-2 HVAR, PROVEAN, CADD). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы данные международного проекта gnomAD Exomes для экзонных вариантов и базы gnomAD Genomes для интронных вариантов. Для предсказания эффекта изменений в сайтах сплайсинга и прилежащих к сайту сплайсинга интронных участках использованы программы SpliceAI и AdaBoost. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, HGMD и литературные данные. Заключение о клинической значимости найденных вариантов дано с учетом рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) и российского руководства по интерпретации данных NGS. В заключение включены только варианты, имеющие возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента. Полиморфизмы, классифицированные по различным критериям как нейтральные, не включены в заключение. Анализировались панели, средняя глубина покрытия которых была не менее 70x, процент целевых нуклеотидов с эффективным покрытием >10x – не менее 97%.

Диагностические пробы. *Пероральный глюкозотолерантный тест.* Если пациент находился на терапии пероральными сахароснижающими препаратами, то препараты метформина отменялась за 1 неделю до проведения исследования. Проба проводилась натощак (последний прием пищи за 12 часов до пробы). Базальный образец крови забирался до завтрака, путем пункции и постановки венозного катетера. После забора крови натощак пациент должен не более чем за 5 мин выпить раствор глюкозы из расчета 1,75 гр. безводной глюкозы на кг массы тела, но не более 75 гр. Забор крови производился через 30, 60, 90 и 120 мин после нагрузки глюкозой. В ходе пробы оценивались уровни глюкозы,

инсулина и С-пептида. *Проба со стандартным жидким завтраком:* Стимулированная секреция инсулина и С-пептида оценивалась после приема специализированного питания Clinutren Junior, Nestlé Health Science (1 ккал/мл; 65% углеводов, 20% жиров и 15% белка) из расчета 6 мл препарата на кг веса, но не более 360 мл. Если пациент находился на инсулинотерапии - инсулин короткого действия не вводился в течение, как минимум, 6 часов до начала теста. Утренняя инъекция инсулина длинного действия в день проведения теста откладывалась до окончания теста (при использовании инсулиновой помпы базальная инфузия сохраняется). Если пациент получал инсулин продленного действия в вечернее время, то накануне теста он не отменялся. Если пациент находился на терапии пероральными сахароснижающими препаратами, то препараты метформина отменялась за 1 неделю до проведения исследования. Проба проводилась натощак (последний прием пищи за 12 часов до пробы). Базальный образец крови забирался до завтрака, путем пункции и постановки венозного катетера. После забора крови натощак пациент должен был выпить смесь не более, чем за 5 минут. Забор крови производился через 60 и 120 мин после завтрака. В ходе пробы оценивались уровни глюкозы, инсулина и С-пептида.

Модель клинического прогнозирования сахарного диабета MODY типа у детей. Для разработки модели был проведен ретроспективный анализ клинических данных пациентов с СД1 и СД MODY типа в возрасте от 0 до 18 лет, независимо от длительности заболевания. *Предикторы и прогнозируемые показатели:* в качестве предикторов исходно были отобраны 7 показателей, продемонстрировавших взаимосвязь с типом СД в ранее проведенных исследованиях: пол, возраст паспортный, возраст на момент манифестации СД, HbA1c, ИМТ SDS, отягощенная по СД наследственность родителей, получаемое лечение. Прогнозируемым, выходным показателем являлся тип СД: СД1 или MODY. *Подготовка данных.* Для достижения максимальной производительности и более простой реализации модели, исходный массив данных был предварительно обработан. Проведено: 1) удаление выбросов и исключение из анализа данных пациентов с более чем 30% отсутствующих значений; 2) приведение числовых значений переменных к одинаковой области их изменения с использованием алгоритма минимакс-нормализации; 3) Подстановка (замена) отсутствующих значений (для случаев с менее чем 30% отсутствующих данных) используя метод k- ближайших соседей или kNN с евклидовым расстоянием $k = \sqrt{N}$, где N размер выборки. 4) Отбор наиболее значимых признаков с использованием критерия Хи-квадрат (для бинарных признаков) и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (для непрерывных признаков). *Реализация искусственной нейронной сети:* НС представляет собой абстракцию структуры человеческого мозга и пытается имитировать ее работу [6]. НС состоит из одного входного и выходного слоя, а также одного или нескольких скрытых слоев.

Каждый слой НС включает несколько нейронов, которые выполняют разные задачи. Входной слой получает данные и, при необходимости, преобразует их в нормализованные фрагменты, подходящие для математических вычислений. Процесс вычисления происходит в скрытых слоях, которые имеют наибольшее количество нейронов и выполняют операцию вычисления на основании межнейронных связей – весов. Выходное значение нейрона определяется функцией активации в зависимости от результата взвешенной суммы входов и порогового значения. В выходном слое нейроны получают результаты вычислений слоя обработки и представляют их пользователю.

В этом исследовании, с использованием открытой библиотеки Keras 2.9.0, на языке программирования Python 3.10.2, была реализована НС прямого распространения – многослойный перцептрон. Keras — это API глубокого обучения, написанный на Python и работающий поверх платформы машинного обучения TensorFlow.

В качестве функции активации нейронов скрытых слоев использовалась функция ReLu (rectified linear unit). Для коррекции весов нейронов НС при обучении модели использовался оптимизированный метод стохастического градиентного спуска Adam –

ADAptive Momentum. В качестве функции потерь использовалась категориальная перекрестная энтропия.

Гиперпараметры НС подбирались эмпирически до получения наилучшей конфигурации НС, с учетом оптимальной скорости обучения и производительности. Для сравнения различных конфигураций использовалась площадь под ROC кривой (AUC-ROC) и показатели матрицы несоответствий (таблицы кросс-табуляции).

Система поддержки принятия врачебных решений. Финальная математическая модель НС была реализована в виде программы для ЭВМ (IBM PC-совместимый ПК), в качестве СППВР для определения вероятности у пациента MODY диабета. Программа реализована на языке программирования Python 3.10.2 с использованием открытых библиотек PySimpleGUI 4.60.3 и Keras 2.9.0.

Оценка производительности НС. Для построения модели и оценки её качества, общая выборка разделена на тренировочную и тестовую в соотношении 80%:20%. При обучении НС тренировочная выборка была также разделена на непосредственно тренировочную и валидационную в соотношении 80%:20%.

Для оценки конфигурации НС были проанализированы показатели матрицы несоответствий (таблицы кросс-табуляции):

1) Специфичность: TN / (TN + FP)
2) Чувствительность или полнота (recall): TP / (TP + FN)
3) Прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) или точность (precision) с поправкой на преваленс: Чувствительность · Частота MODY/[Чувствительность · Частота MODY + (1 − Специфичность) · (1 − Частота MODY)].
4) Прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР) с поправкой на преваленс: Специфичность · (1 − Частота MODY)/[Специфичность · (1− Частота MODY)+(1− Чувствительность) · Частота MODY].
5) Доля правильных ответов или общая точность (accuracy): (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)

Где истинно положительные (TP) и истинно отрицательные (TN) — случаи MODY и СД1, правильно, а ложноотрицательные (FN) и ложноположительные (FP) — неправильно классифицированные моделью.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка проводилась в Python 3.10.2 с использованием открытых библиотек: statsmodels 0.13.2 (Seabold, Skipper, and Josef Perktold. “statsmodels: Econometric and statistical modeling with python.” Proceedings of the 9th Python in Science Conference. 2010), SciPy 1.9.1. Количественные признаки, независимо от распределения, описывались при помощи медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3). Различие между количественными признаками в независимых выборках оценивалось с помощью критерия Манна–Уитни. В случае множественных сравнений использовалась поправка Бонферрони. Качественные данные представлены в виде абсолютных значений (n) и/или частот (%). Доверительный интервал для биноминальных пропорций (частот) рассчитывался методом Агрести – Коулла. Для сравнения частот в каждой изучаемой группе использовались таблица кросстабуляции и статистика $\chi 2$ с поправкой на непрерывность, когда это необходимо (количество ожидаемых наблюдений в любой из ячеек <5). При оценке риска генетического вклада в развитие состояния ремиссии при СД1 проводилась корректировка на конфаундеры (пол и возраст манифестации СД) с использованием логистической регрессии, поправка Бонферрони на множественные сравнения не применялась из-за ее чрезмерно консервативного характера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сахарный диабет 1 типа у детей

Проанализированы клинико-лабораторные данные 1333 детей с сахарным диабетом 1 типа, кому проводилось исследование уровня С-пептида и специфических островковых ААт ZnT8A, IA-2A, GADA, IAA.

Клинико-лабораторная характеристика представлена в табл.1.

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов

	Всего 1333 ребенка
Возраст, лет	10,5 [6,6;14,1]
Длительность диабета, лет	1,8 [0,8;3,9]
Возраст манифестации, лет	7,0 [3,7;10,5]
Соотношение полов, м/ж	662/671
Гликированный гемоглобин, %	7,6 [6,6;7,8]
С-пептид, нг/мл	0,22 [0,01;0,729]
Неопределяемый уровень С-пептида (<0,01 нг/мл), %	31,5 [29,1-34,0]
Определяемый уровень С-пептида (>0,01 нг/мл), %	68,5 [66,0-70,9]
Остаточный уровень С-пептида (0,01-0,5 нг/мл), %	32,5 [30,0-35,1]
Сохранный уровень С-пептида (0,05-1,1 нг/мл), %	20,9 [18,8-23,2]
Нормальный уровень С-пептида (>1,1 нг/мл), %	15,1 [13,3-17,1]

Примечания. *Описательная статистика количественных признаков представлена медианами, интерквартильными интервалами - Me [Q1; Q3], качественных признаков - относительными частотами, их 95% доверительными интервалами - % [95% ДИ].*

При анализе функции β-клеток определяемая секреция С-пептида отмечалась у 68,5% [66.0-70.9] пациентов (медиана длительности заболевания 1,8 лет [0,8;3,9]).

Динамика уровня С-пептида в зависимости от возраста манифестации и длительности СД1

Пациенты были распределены на 3 группы в зависимости от длительности СД1: 1 группа – длительность менее 1 года, 2 группа - от 1 года до 5 лет, 3 группа - более 5 лет. Группы пациентов разделены на подгруппы по стадии полового созревания на момент манифестации СД1: допубертат (А) и пубертат (2-5 стадии полового развития по Таннеру) (Б). Клинико-лабораторная характеристика пациентов представлена в табл.2.

Неопределяемый уровень С-пептида (<0,01 нг/мл) статистически значимо чаще во всех группах (1-3) отмечался у детей с манифестацией СД1 в допубертатном возрасте: при длительности СД1 менее 1 года в 13% [9,3-17,8] (группа 1 А) и 5% [2,5-9,3] (группа 1Б) (p=0,039), при длительности СД1 от 1 до 5 лет – 51% [46,0-56,0] (группа 2А) и 14% [10,6-18,3] (группа 2Б) (p<0,001), при длительности СД1 более 5 лет – 82% [74,8-87,5] (группа 3А) и 50% [37,8-62,2] (группа 3Б) (p=0,001) (рис 1А).

Таблица 2. Характеристика групп пациентов в зависимости от возраста манифестации и длительности СД1.

Показатели	**Длительность СД1**					
	Группа 1 (< 1 года)		**Группа 2 (1 год - 5 лет)**		**Группа 3 (>5 лет)**	
	Возраст манифестации СД1					
	А. Допубертат n=245	**Б. Пубертат n=182**	**А. Допубертат n=383**	**Б. Пубертат n=319**	**А. Допубертат n=143**	**Б. Пубертат n=61**
Возраст, лет	4,5 [2,8–6,5]	13,1 [10,9–15]	7,2 [5,2–9,1]	13,8 [12,3–15,6]	11,7 [9,4–14,1]	16,6 [15,3–17,3]
Длительность диабета, лет	0,5 [0,4–0,8]	0,6 [0,3–0,8]	2,2 [1,5–3,2]	2,2 [1,4–3,1]	6,3 [6–7,4]	6,1 [5,5–7,3]
Возраст манифестации, лет	4,1 [2,2–6]	12,3 [10,2–14,5]	4,8 [2,8–6,5]	11,5 [9,8–13,1]	4,2 [2,5–6,9]	9,6 [9,1–10,7]
Соотношение полов, м/ж	128/117	81/101	197/186	147/172	68/75	21/40

Гликированный гемоглобин, %	7,2 [6,4–8,6]	7,2 [6,4–8,6]	7,3 [6,6–8,2]	7,8 [6,8–9,3]	8,2 [7,5–8,9]	8,4 [7,3–10,1]
С-пептид, нг/мл	0,38 [0,1–0,63]	1,02 [0,61–1,51]	0,01 [0,01–0,15]	0,5 [0,13–1,07]	0,01 [0,01–0,01]	0,01 [0,01–0,23]

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3].*

Остаточная секреция С-пептида (>0,01-0,5 нг/мл) при манифестации СД1 у детей в допубертатном возрасте в сравнении с пубертатом, значимо чаще отмечалась при длительности СД1 менее 1 года – 52% [45,8-58,2] (группа 1А) против 17% [12,2-23,2] (группа 1Б) (p<0,001), при длительности СД1 от 1 года до 5 лет достоверных различий не получено: 2А – 35% [30,4-39,9], 2Б – 36% [30,9-41,4] (p=0,861). При длительности СД1 более 5 лет статистически значимо чаще остаточная секреция выявлялась у пациентов с манифестацией заболевания в пубертатном возрасте: 3А – 14% [9,2-20,7], 3Б – 30% [19,9-42,5] (p=0,039) (рис 1Б).

Сохранная секреция С-пептида (>0,5-1,1 нг/мл) значимо чаще отмечалась у пациентов с манифестацией заболевания в пубертатном возрасте при длительности СД1 от 1 до 5 лет: 2А – 12% [9,1-15,7], 2Б – 25% [20,6-30,0] (p=0,001). Тогда как в группах с длительностью СД1 менее 1 года и более 5 лет статистически значимых различий не получено:1А – 29% [23,7-35,0], 1Б – 34% [27,5-41,2] (p=0,43); 3А – 2% [0,4-6,1], 3Б – 9% [3,7-19,2] (p=0,102) (рис 1В).

Нормальный уровень С-пептида (>1,1 нг/мл) также значимо чаще отмечался у детей с манифестацией СД1 в пубертатном возрасте во всех группах: 1А – 6% [3,6-9,8], 1Б – 44% [37,0-51,3] (p<0,001); 2А – 2% [0,9-4,0], 2Б – 25% [20,6-30,0] (p<0,001); 3А – 2% [0,4-6,1], 3Б – 11% [5,0-21,6] (p=0,033) (рис 1Г).

169 пациентам с определяемым базальным уровнем С-пептида (>0,01нг/мл) исследованы стимулированные уровни С-пептида в ходе пробы со стандартным жидким завтраком. Уровень С-пептида натощак и в ходе стимуляции был выше у детей с манифестацией СД1 в пубертатном возрасте вне зависимости от длительности СД1 (рис 2).

У детей с длительностью СД1 менее 1 года (рис. 2А) в обеих подгруппах, ожидаемо выше секреция С-пептида как натощак (подгруппа 1А – 1,0 нг/мл [0,34;1,0], подгруппа 1Б – 1,42 нг/мл [0,89;2,13]) (p=0,000), так и на фоне стимуляции через 60 мин (подгруппа 1А – 2,3 нг/мл [0,9;2.9], подгруппа 1Б – 3,42 нг/мл [2,5;4,6]) (p=0,006) и 120 минут (подгруппа 1А – 1,99 нг/мл [1,0;2,5], подгруппа 1Б – [3,37 нг/мл [2,0;5,1]) (p=0,001).

Во второй группе (рис. 3Б) медиана базальной секреции в подгруппе 2А составила 0,42 нг/мл [0,15;0,75], в подгруппе 2Б – 1,05 нг/мл [0,7;1,81] (p=0,001), медиана секреции через 60 минут в подгруппе 2А – 1,2 нг/мл [0,35;2,47], подгруппа 2Б – 2,52 нг/мл [1,5;4,4]) (p=0,001), через 120 минут –в подгруппе 2А – 1,13 нг/мл [0,3;3,22], подгруппа 2Б – 2,77 нг/мл [1,36;3,88] (p=0,001).

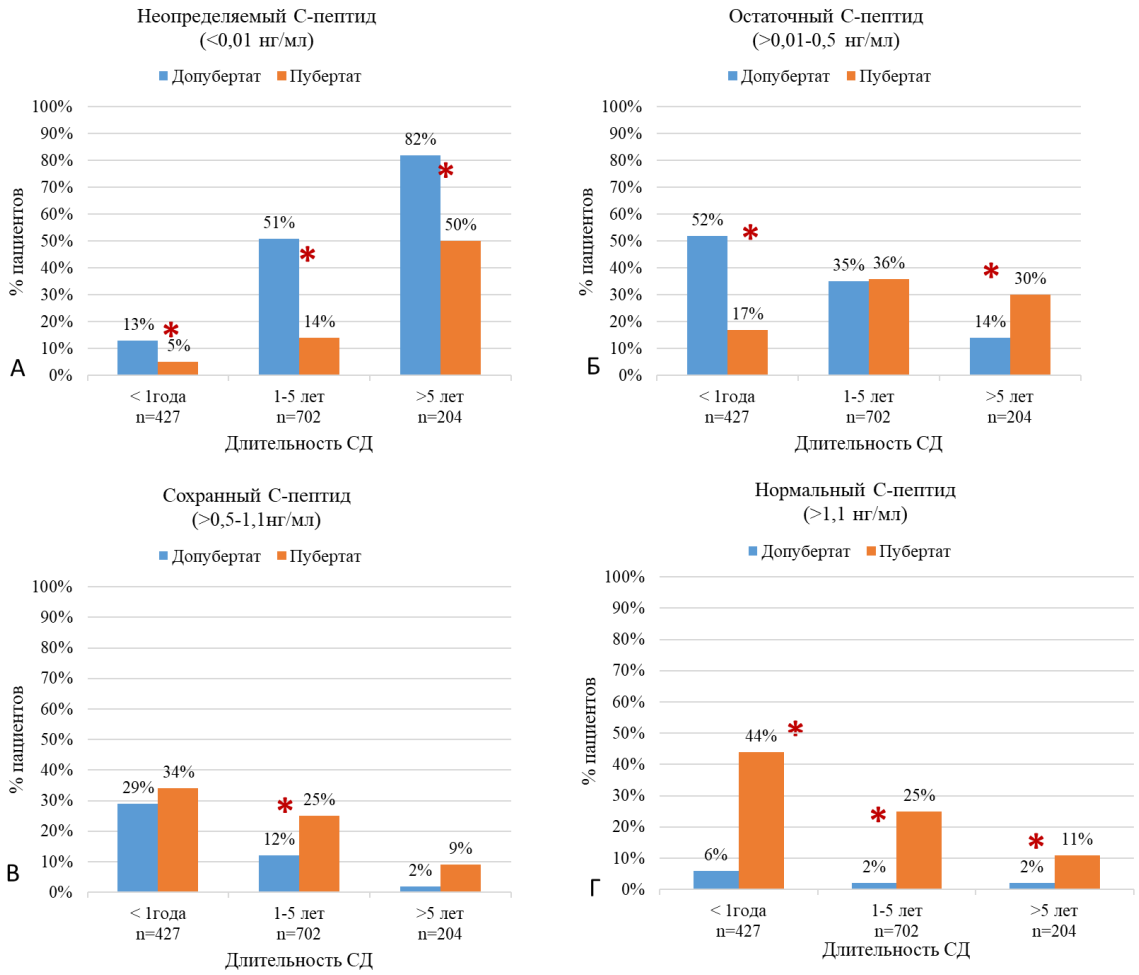

Рисунок 1. Уровень секреции С-пептида в зависимости от возраста манифестации и длительности СД1. А – неопределяемый уровень С-пептида (<0,01нг/мл); Б – остаточный уровень С-пептида (>0,01-0,5 нг/мл); В – сохранный уровень С-пептида (>0,5-1,1 нг/мл); Г – нормальный уровень С-пептида (>1,1 нг/мл). *Для сравнения групп использовались критерий Хи-квадрат. * - p<0,05.*

По данным нашего исследования, при длительности СД1 более 5 лет (рис. 2В) у 23% пациентов также сохранялась определяемая секреция С-пептида

Натощак (подгруппа 3А – 0,15 нг/мл [0,1;0,4], подгруппа 3Б – 0,83 нг/мл [0,27;1,2]) (p=0,001) и на фоне стимуляции (через 60 минут - подгруппа 3А – 0,49 нг/мл [0,21;0,63], подгруппа 3Б – 1,76 нг/мл [0.2;3.2] (p=0,001), через 120 минут - подгруппа 3А – 0,45 нг/мл [0,19;0,58], подгруппа 3Б – 1,97 нг/мл [0,3;3,4]) (p=0,001).

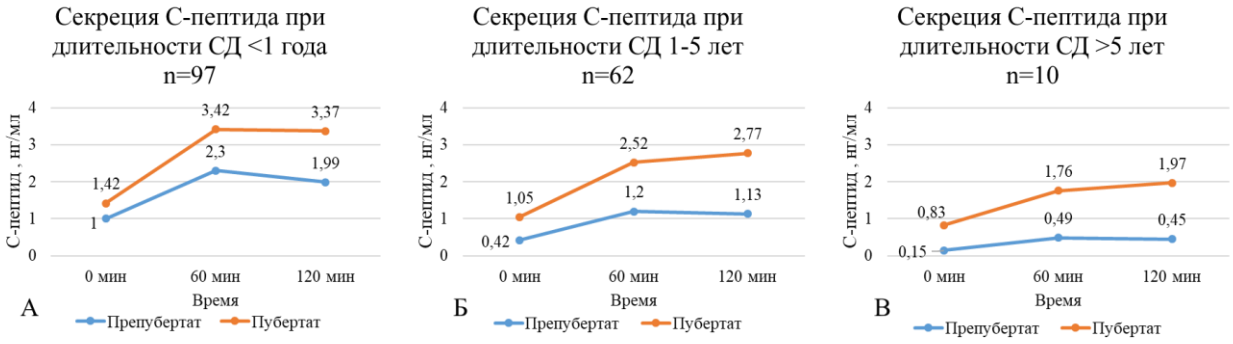

Рисунок 2. Секреция С-пептида в ходе пробы со стандартным жидким завтраком. А – группа пациентов с длительность СД1 менее 1 года, Б – группа пациентов с длительностью СД1 от 1 до 5 лет, В – группа пациентов с длительность СД1 более 5 лет.

Особенности иммунологического статуса детей в зависимости от возраста манифестации и длительности СД1

Медиана длительности заболевания в общей группе (табл. 1) всех пациентов составила 1,8 лет [0,8;3,9]. Среди них серопозитивность (ААт+), то есть положительный результат по одному или более виду ААт, встречалась у 1017 пациентов (76,3% [73,9-78,5]), в то время как у 316 детей (23,7% [21,5- 26,1]) ААт не выявлялись.

Среди пациентов с длительностью СД1 менее 1 года частота серопозитивного статуса встречалась у 74% [69,6-77,9], что предсказуемо выше, чем в группах с большей длительностью СД1. С увеличением продолжительности заболевания отмечается тенденция к снижению количества ААт+ пациентов в группах: при длительности от 1 года до 5 лет – 69% [65,5-72,3], при длительности СД1 более 5 лет – 48% [41,2-54,8].

Серопозитивность по одному или более виду ААт в подгруппах 1А и 1Б встречается в 71% [65,0-76,3] и 80% [73,6-85,2] случаев (p=0,024), соответственно. При анализе данных в 2А и 2Б подгруппах получены статистически значимые различия – 64% [59,1-68,6] и 76% [71,0-80,4], соответственно (p<0,001). В подгруппах 3А и 3Б также получены статистически значимые различия – 49% [40,9-57,1] и 54% [48,5-59,4] соответственно (p<0,001).

Частота положительного уровня ААт к ZnT8 в 1А и 1Б подгруппах статистически значимо не различалась – 60% и 67% (p=0,154), тогда как в подгруппах 2Б и 3Б положительный уровень ААт к ZnT8 встречался статистически значимо чаще – 64% [53,8-65,9] и 47% [35,0-59,3], против 51% [46,0-56,0] и 33% [25,8-41,1] в подгруппах 2А и 3А, соответственно.

Исследование ААт к IA-2 в подгруппах 1 и 2 показало наличие статистически значимых различий в частоте положительного уровня IA-2A в зависимости от стадии полового развития – в подгруппах 1А и 1Б 48% [41,8-54,2] и 65% [57,8-71,6] (p<0,001), в подгруппах 2А и 2Б 47% [42,1-52,0] и 61% [55,5-66,2] (p=0.027). В подгруппе 3А и 3Б статистически значимой разницы не было получено (p=0,163).

В подгруппах 1А и 1Б, 3А и 3Б при оценке ААт к GAD статистически значимых различий не получено – 64% [57,8-69,8] против 68% [61,9-73,5] (p=0.634) и 36% [25,1-48,6] против 41% [29,5-53,5] (p=0,053), соответственно, в то время как в подгруппе 2Б положительный уровень данного вида ААт встречался статистически значимо чаще – 64% [59,1-68,6] в сравнении с подгруппой 2А 48% [43,0-53,0] (p=0,025).

При анализе ААт IAA положительный уровень статистически значимо чаще встречался у пациентов в подгруппах 1 и 2, которые манифестировали в допубертатном возрасте: 1А – 29% [23,7-35,0], 1Б – 14% [9,6-19,8] (p=0,026), 2А – 20% [16,3-24,3], 2Б – 10% [7,1-13,8] (p=0,048), в то время как в группе детей с длительностью заболевания более 5 лет статистически значимой разницы не получено 3А – 10% [6,0-16,1], 3Б – 5% [1,2-14,1] (p=0,313).

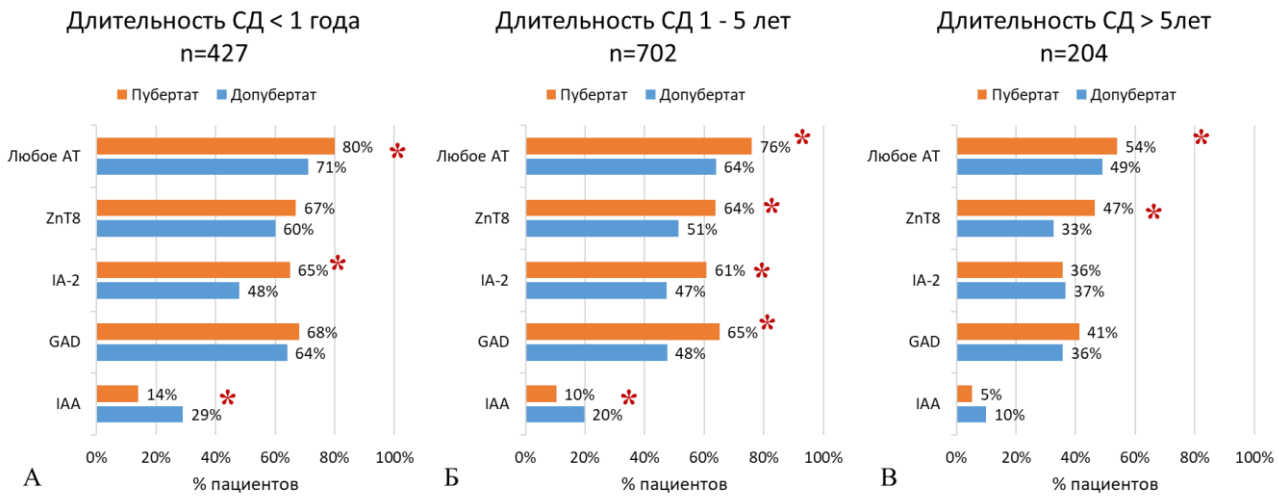

Рисунок 3. ААт+ в зависимости от возраста манифестации и длительности сахарного диабета. А – при длительности СД1 менее 1 года; Б – при длительности СД1 от 1 года до 5 лет; В – при длительности СД1 более 5 лет.

Примечания: *IAA – аутоантитела к инсулину, IA-2 – аутоантитела к тирозинфосфатазе, GAD – аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе, ZnT8 – аутоантитела к транспортеру цинка 8. Для сравнения групп использовались критерий Хи-квадрат. * - p<0,01.*

Клинико-метаболическая ремиссия СД1 у детей

Сравнительная характеристика пациентов с ремиссией СД1 и без нее

Клинико-лабораторная характеристика пациентов с ремиссией сахарного диабета 1 типа у детей представлена в табл. 2.

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с ремиссией СД1.

Показатели	СД1 с ремиссией n=234	СД1 без ремиссии n=636	p
Возраст (годы)	11,6 [7,7; 15,23]	7,6 [4,5; 11,7]	<0,001
Длительность СД1 (годы)	1,2 [0,8; 2,1]	1,2 [0,7; 1,9]	>0,05
Возраст манифестации	9,9 [6,6; 13,1]	6,3 [3,2; 10,1]	<0,001
Пол (м/ж)	132/102	303/333	>0,05
Гликированный гемоглобин (%)	6,8 [6,2; 7,6]	7,5 [6,8; 8,7]	<0,001
SDS ИМТ	0,19 [-0,6; 1,0]	0,16 [-0,55; 0,92]	>0,05
СДИ (ЕД/кг)	0,33 [0,1; 0,44]	0,82 [0,67; 1,0]	<0,001

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3]. Для сравнения групп использовались критерий Манна-Уитни (для количественных признаков), Хи-квадрат (для качественных признаков). Для нивелирования проблем множественных сравнений применена поправка Бонферрони, уровень статистической значимости p<0,007.*

Группу сравнения представляли пациенты с классическим течением СД1 с длительностью заболевания до 3 лет.

Пациенты с ремиссией СД1 были статистически значимо старше пациентов без ремиссии при диагностике СД1 – медиана возраста диагностики составила 9,9 года [6,6; 13,1] и 6,3 года [3,2; 10,1] соответственно. Среди пациентов с длительной ремиссией СД1 наиболее часто нарушения углеводного обмена были диагностированы в возрасте 6-12 лет и старше 12 лет – в 42,3% [36,1-48,7] и 34,6% [28,7-40,9], соответственно. У пациентов без ремиссии в 48,6% [44,7-52,5] диабет был диагностирован в возрасте до 6 лет. У пациентов с ремиссией СД1 статистически достоверно (p<0,001) чаще диагностика диабета носила случайный характер – в 31,6% против 10,4% у пациентов без ремиссии. Острая манифестация СД1 была у 68,4% пациентов с ремиссией СД1 и 89,6% без ремиссии (рис.4).

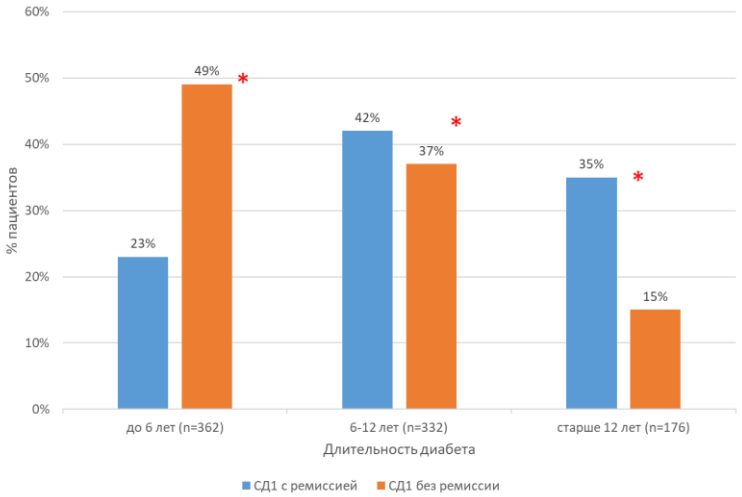

Рисунок 4. Частота выявления ремиссии в зависимости от возраста диагностики СД1. *Для сравнения групп использовались критерий Хи-квадрат. * - p<0,001.*

При обследовании пациенты с ремиссией СД1 были старше пациентов без ремиссии - 11,6 лет [7,7; 15,23] против 7,6 лет [4,5; 11,7]. Группы были сопоставимы по длительности заболевания. Уровень HbA1c был статистически значимо ниже у пациентов с ремиссией СД1 и составлял 6,8% [6,2; 7,6] против 7,5% [6,8; 8,7]. Группы не различались по частоте выявления ожирения.

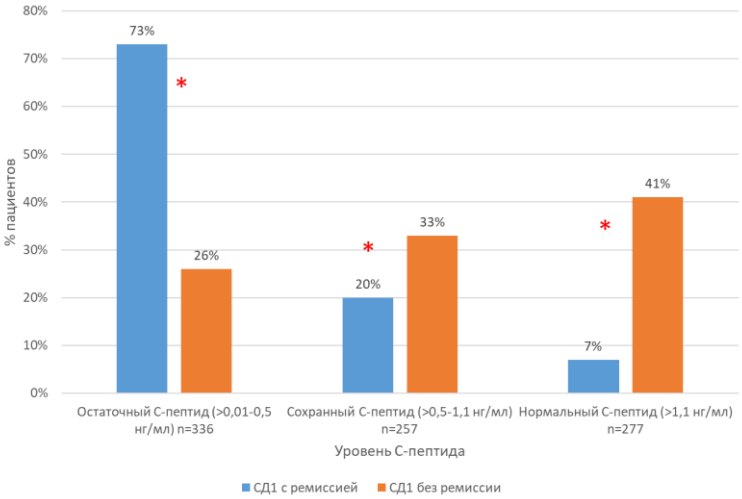

Рисунок 5. Степень сохранности С-пептида у детей с ремиссией СД1 и без ремиссии СД1. *Для сравнения групп использовались критерий Хи-квадрат. * - p<0,001.*

Более высокая базальная секреция С-пептида определялась при ремиссии СД1: уровень С-пептида натощак составил 0,97 нг/мл [0,48; 1,66] и 0,2 нг/мл [0,01; 0,54] у пациентов с ремиссией и без ремиссии, соответственно (p<0,001). Резервная функция β-клеток была выше у пациентов с ремиссией СД1 (рис.5): нормальная секреция С-пептида (более 1,1 нг/мл) отмечалась в 41,2% [35,1-47,6] и 6,7% [5,0-8,9], сохранная - в 32,8% [27,1-39,1] и 20,4% [17,4-23,7], остаточная – в 26,0% [20,8-32,0] и 72,9% [69,3-76,2] при ремиссии и без ремиссии СД1, соответственно. Стимулированный уровень С-пептида при длительной ремиссии СД1 составлял на 60-й минуте – 3,07 нг/мл [2,2; 4,83], на 120 минуте – 3,3 нг/мл [2,4; 5,0].

Частота серопозитивности не отличалась в 2 группах и составляла 73,1% [67,1-78,4] у пациентов с ремиссией и 77,2% [73,8-80,3] у пациентов без ремиссии СД1 (p>0,05). Однако IAA статистически значимо реже определялись у пациентов с ремиссией СД1 в 4,3% по сравнению с пациентами без ремиссии – в 26,8% (рис. 6). Различий в частоте ААт к GAD, IA2, ZnT8a не получено. Титр ААт к инсулину был статистически значимо ниже у пациентов с ремиссией СД1 (табл. 3).

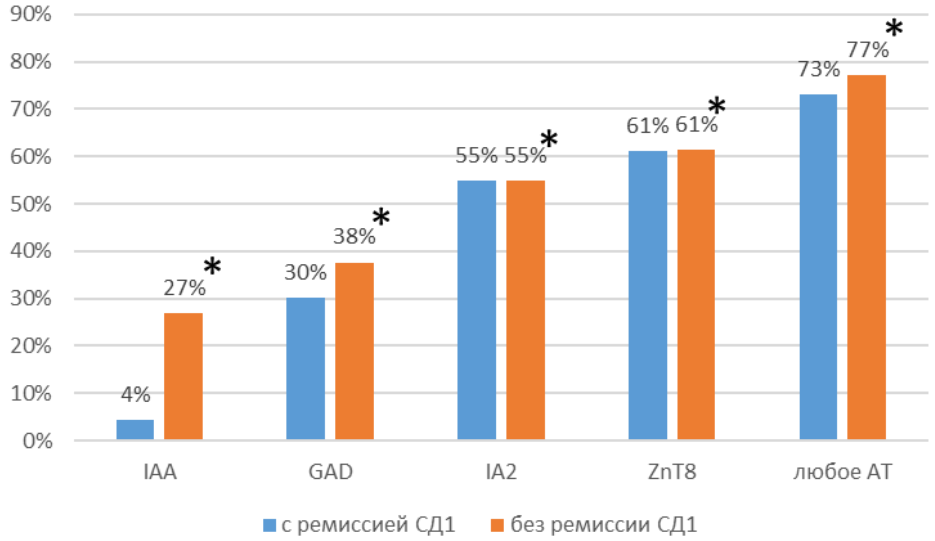

Рисунок 6. Частота положительных титров ААт (IAA, GAD, IA-2, ZnT8) у детей с ремиссией и без ремиссии СД1. * - p>0,05

Частота СД у родственников 1 степени родства не различалась в двух группах и составляла 15,0% [12.4-18.0] при ремиссии СД1 и 11,6% [9.3-14.3] при СД1 без ремиссии (p>0,05).

Таблица 3. Уровень ААт (IAA, GAD, IA-2, ZnT8) у детей с ремиссией и без ремиссии СД1.

Показатели	**СД1 с ремиссией**	**СД1 без ремиссии**	**p**
IAA, Ед/мл	3,61 [2,08; 6,14]	8,0 [3,6; 21,4]	p<0,001
GAD, Ед/мл	36,4 [4,4; 185,1]	40,4 [5,8; 220]	p>0,05
IA2, Ед/мл	49 [4,1; 327,85]	49,5 [2,1; 301,7]	p>0,05
ZnT8, Ед/мл	134,8 [10,6; 500]	79,7 [10; 385,8]	p>0,05

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3]. Для сравнения групп использовались критерий Манна-Уитни (для количественных признаков). Для нивелирования проблем множественных сравнений применена поправка Бонферрони, уровень статистической значимости p<0,001.*

Сравнительная характеристика полной и частичной ремиссии СД1

Таблица 4. Клинико-лабораторные показатели пациентов с ремиссией СД1.

Показатели	**СД1 с полной ремиссией n=43**	**СД1 с частичной ремиссией n=191**	**p**
Возраст (годы)	13,0 [8,5; 15,3]	11,4 [7,7; 15,2]	>0,05
Длительность СД1 (годы)	0,9 [0,6; 1,9]	1,2 [0,8; 2,2]	>0,05
Возраст манифестации	9,9 [6,6; 13,1]	9,4 [6,0; 13,0]	>0,05
Пол (м/ж)	26/17	106/85	>0,05
Гликированный гемоглобин (%)	6,0 [5,6; 6,4]	7,0 [6,3; 7,8]	<0,001
SDS ИМТ	0,37 [-0,6; 1,04]	0,17 [-0,63; 0,99]	>0,05
СДИ (ЕД/кг)	0,0 [0,0; 0,0]	0,38 [0,25; 0,46]	<0,001

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3]. Для сравнения групп использовались Критерий Манна-Уитни (для количественных признаков), Хи-квадрат (для качественных признаков). Для нивелирования проблем множественных сравнений применена поправка Бонферрони, уровень статистической значимости p<0,007.*

Пациенты с полной и частичной ремиссией не различались по возрасту диагностики, возрасту при обследовании, а также по длительности заболевания. У пациентов с полной ремиссией СД1 статистически значимо чаще (p<0,001) нарушения углеводного обмена были диагностированы на доклинической стадии – в 60,5% [45,6-74,0%] против 25,4% [19,6-31,9%] у пациентов с частичной клинико-лабораторной ремиссией. Статистически значимо чаще у пациентов с частичной клинико-лабораторной ремиссией отмечалась

острая манифестация СД1: в 20,9% случаев [10,9-34,7%] и 66,1% [59,2-72,6%] диабет диагностирован в состоянии ДКА, в 18,6% случаев [9,2-32,1%] и в 8,5% [5,1-13,1%] - в состоянии кетоза при полной ремиссии СД1 и при частичной ремиссии СД1, соответственно.

При обследовании уровень HbA1c был ниже у пациентов с полной ремиссией СД1 и составлял 6,0% [5,6; 6,4]. Резервная функция β-клеток была выше у пациентов с полной ремиссией СД1: нормальная секреция С-пептида (более 1,1 нг/мл) отмечалась в 65% [49,6-78,3] и 34,3% [26,8-42,5], сохранная (0,5-1,1 нг/мл) - в 30,0% [17,6-45,2] и 33,6% [26,1-41,8], остаточная (>0,01-0,5 нг/мл) – в 5,0% [1,1-15,1] и 32,1% [24,7-40,2] при полной и частичной ремиссии СД1, соответственно. У пациентов с полной ремиссией СД1 базальный уровень С-пептида был статистически значимо выше и составлял 1,4 нг/мл [0,9; 1,9] против 0,86 нг/мл [0,39; 1,24] при частичной ремиссии СД1 (p<0,001). Уровень стимулированного С-пептида был статистически значимо выше на 30, 60, 90, 120 минутах ПГТТ у пациентов с полной ремиссией СД1 (табл. 5).

При анализе наследственного анамнеза выявлено, что при полной ремиссии СД1 статистически значимо чаще (p<0,05), в 31,4% [19,5-46,4], у родственников 1 степени родства диагностированы нарушения углеводного обмена против 12,5% при частичной ремиссии СД1.

Таблица 5. Уровень С-пептида в ходе пробы со стандартным жидким завтраком у пациентов с полной и частичной клинико-лабораторной ремиссией СД1.

	Уровень С-пептида в сыворотке, нг/мл				
	0 мин	**30 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**120мин**
СД1 с полной ремиссией	1,4 [0,9; 1,9]	3,26 [2,61; 5,1]	4,4 [2,83; 6,6]	5,06 [3,16; 7,59]	5,04 [2,84; 7,12]
СД1 с частичной ремиссией	0,86 [0,39; 1,24]	1,88 [1,31; 2,77]	2,59 [1,85; 3,41]	2,95 [1,96; 3,84]	3,11 [1,92; 3,72]
p	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3]. Для сравнения групп использовался критерий Манна-Уитни. Для нивелирования проблем множественных сравнений применена поправка Бонферрони, уровень статистической значимости p<0,001.*

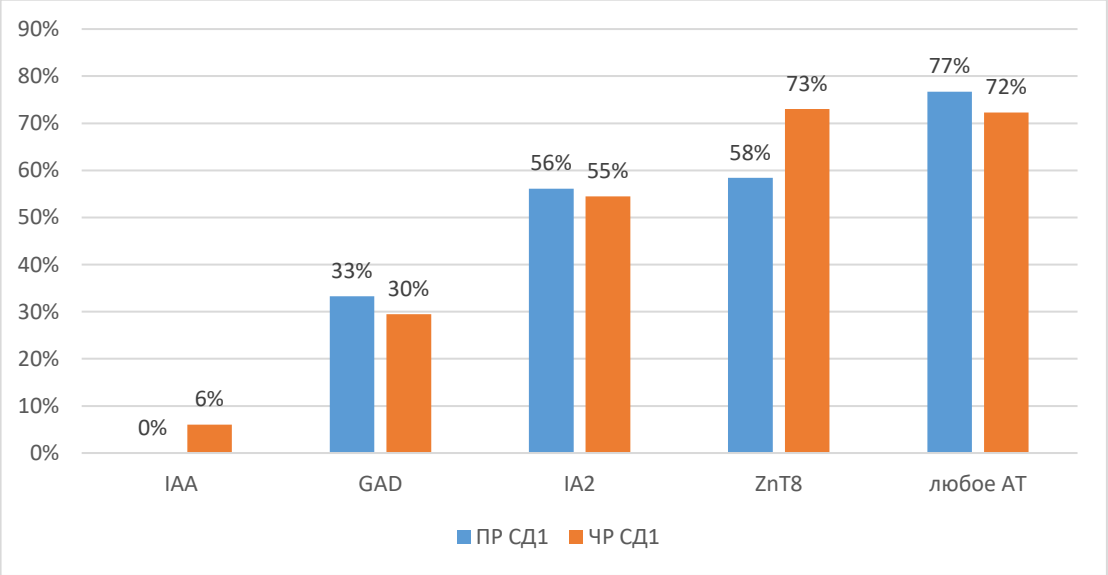

Рисунок 7. Частота выявления ААт (IAA, GAD, IA-2, ZnT8) у детей с полной и частичной ремиссией СД1.

Примечания. *ПР СД1 – полная ремиссия СД1, ЧР СД1 – частичная ремиссия СД1*

Частота выявления ААт (рис.7) не различалась (p>0,05) в 2 группах и составляла 76,7% [62,7-87,4] у пациентов с полной ремиссией СД1 и 72,3% [65,6-78,2] у пациентов с частичной ремиссией СД1 (p>0,05). Различий в частоте выявления ААт IAA, GADA, IA2A, ZnT8A не получено (табл. 6).

Таблица 6. Уровень ААт (IAA, GADA, IA-2A, ZnT8A) у детей с полной и частичной ремиссией СД1.

Показатели	СД1 с полной ремиссией n=43	СД1 с частичной ремиссией n=191	p
IAA, Ед/мл	2,24 [1,65; 3,94]	4,3 [2,4; 7,8]	p<0,001
GAD, Ед/мл	101,7 [44,2; 250,0]	31,3 [4,0; 157,6]	p>0,05
IA2, Ед/мл	49 [8,0; 361,8]	50,4 [2,64; 327,03]	p>0,05
ZnT8, Ед/мл	185,5 [15,5; 500]	106,0 [10,25; 493,8]	p>0,05

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3]. Для сравнения групп использовался критерий Манна-Уитни. Для нивелирования проблем множественных сравнений применена поправка Бонферрони, уровень статистической значимости p<0,001.*

Анализ HLA I и II класса у детей с ремиссией СД1 и без нее

Для изучения роли генетических факторов в развитии ремиссии СД1 были проанализированы данные HLA в двух группах детей с ремиссией заболевания и без, сопоставимые по возрасту диагностики заболевания. Характеристика групп пациентов представлена в таблице 7.

Таблица 7. Клиническая характеристика пациентов с СД1, включенных в исследование.

Показатели	СД1 без ремиссии (n=247)	СД1 с ремиссией (n=71)	p
Возраст	8,8 [5,7;11,5]	10,7 [6,8;13,8]	0,016
Длительность СД1	1,5 [0,9;2,1]	1,7 [0,8;2,6]	0,034
Возраст манифестации СД1	7,3 [4,4; 9,8]	7,8 [4,0;10,8]	0,45

Примечания. *Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me [Q1; Q3]. Для сравнения групп использовался критерий Манна-Уитни. Для нивелирования проблем множественных сравнений применена поправка Бонферрони, уровень статистической значимости p<0,016.*

Гетерозиготный HLA-генотип DR3-DQ2/DR4-DQ8 статистически значимо реже выявляется у детей с ремиссией СД1, в 14% по сравнению с 28% (p=0,020), в том числе после коррекции на пол и возраст (p=0,007) (табл. 8). Частота предрасполагающих гомозиготных генотипов DR3-DQ2 и DR4-DQ8 (DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 и DRB1*04-DQA1*03-DQB1*0302), а также генотипа DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201/DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0501 была сопоставима в 2-х группах. Частота протекторного генотипа DR4/DR13/15 (DRB1*04-DQA1*03-DQB1*0302/DRB1*13/15-DQA1*0103-DQB1*0603) также значимо не различалась между группами.

Таблица 8. DR-DQ генотипы в группах детей с ремиссией СД1 и без.

Гаплотип 1			Гаплотип 2			СД1 без ремиссии n=247		СД1 с частичной ремиссией n=71		Значение p	Скорректированное значение p*
DRB1	DQA1	DQB1	DRB1	DQA1	DQB1	%	95% ДИ	%	95% ДИ		
Предрасполагающие											
03	05:01	02:01	04	03:0X	03:02	27,5	22,3-33,4	14,1	7,6-24,2	**0,020**	**0,007**
04	03:0X	03:02	04	03:0X	03:02	4,5	2,4-7,9	2,8	0,2-10,3	0,784	0,312
03	05:01	02:01	01	01:0X	05:01	4,5	2,4-7,9	5,6	1,8-14	0,924	0,625
03	05:01	02:01	03	05:01	02:01	3,6	1,8-6,9	5,6	1,8-14	0,685	0,662
Протекторные											
04	03:0X	03:02	13/15	01:03	06:03	2,4	1-5,3	5,6	1,8-14	0,328	0,435

Примечания. *Данные представлены как % (95% ДИ). Для сравнения частот использовались статистика χ2 с поправкой на непрерывность, когда это необходимо. Корректировка на конфаундеры была выполнена с использованием логистической регрессии.*

** с поправкой на пол и возраст на момент постановки диагноза.*

Изолированное исследование DR-DQ гаплотипов показало (табл. 9), что у детей без ремиссии, после коррекции на пол и возраст манифестации, статистически значимо чаще выявляется предрасполагающий гаплотип DRB1*04-DQA1*030X-DQB1*0302 (в 62% по сравнению с 46%, p=0,002) и DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 (в 47% по сравнению с

39%, p=0,046). У детей с ремиссией СД1 чаще присутствует протекторный гаплотип DRB1*11/13/15-DQA1*0103-DQB1*0603 (в 9% по сравнению с 3%, p=0,035), однако после коррекции на конфаундеры данные различия становятся статистически не значимыми.

Таблица 9. DR-DQ гаплотипы в группах детей с ремиссией СД1 и без.

Гаплотип			**СД1 без ремиссии n=247**		**СД1 с частичной ремиссией n=71**		**Значение p**	**Скорректи-рованное значение p***
DRB1	DQA1	DQB1	**%**	**95% ДИ**	**%**	**95% ДИ**		
Предрасполагающие								
04	03:0X	03:02	62,3	56,2-68,2	46,5	35,4-58	**0,017**	**0,002**
03	05:01	02:01	47,0	40,8-53,2	39,4	28,9-51,1	0,261	**0,046**
Протекторные								
01	01:0X	05:01	17,8	13,5-23,1	26,8	17,8-38,1	0,096	0,223
04	03:0X	03:01	6,9	4,3-10,8	7,0	2,7-15,8	0,963	0,833
13/15	01:03	06:03	2,8	1,3-5,8	8,5	3,6-17,6	**0,035**	0,129
08	04:01	04:02	6,9	4,3-10,8	8,5	3,6-17,6	0,653	0,941

Примечания. *Данные представлены как % (95% ДИ). Для сравнения частот использовались статистика χ2 с поправкой на непрерывность, когда это необходимо. Корректировка на конфаундеры была выполнена с использованием логистической регрессии.*

** с поправкой на пол и возраст на момент постановки диагноза.*

При исследовании аллелей HLA DPB1 получено, что по более значимым как предрасполагающему DPB1*0301, так и протекторному DPB1*0402, статистически значимых различий между группами пациентов с ремиссией и без не выявлено (табл. 10). Среди локусов HLA I класса статистически значимые различия, с учетом коррекции на пол и возраст манифестации СД1, в двух группах получены только для предрасполагающего аллеля C*0602: в группе без ремиссии – 21%, в группе с ремиссией – 8% (p=0,004). Разницы в частоте выявления других предрасполагающих, а также протекторных аллелей, не выявлено.

Показатель полигенного риска у детей с ремиссией СД1 был статистически значимо ниже – 1,6 против 2,4 у пациентов без ремиссии (p<0,001).

Таблица 10. Не-DR-DQ локусы в пределах HLA региона в группах детей с ремиссией СД1 и без.

Локус	**СД1 без ремиссии n=247**		**СД1 с частичной ремиссией n=71**		**Значение p**	**Скорректированное значение p***
	%	**95% ДИ**	**%**	**95% ДИ**		
Предрасполагающие						
B*3906	3,6	1,8-6,9	4,2	1-12,2	0,884	0,999
DPB1*1501	5,7	3,3-9,4	7,0	2,7-15,8	0,667	0,986
A*2402	28,3	23,1-34,3	26,8	17,8-38,1	0,794	0,293
A*0205	2,0	0,7-4,8	1,4	0-8,3	0,874	0,528
C*0602	21,1	16,4-26,6	8,5	3,6-17,6	**0,015**	**0,004**
A*0201	49,4	43,2-55,6	46,5	35,4-58	0,665	0,124
B*1801	20,2	15,7-25,7	15,5	8,7-25,8	0,370	0,093
A*0301	22,3	17,5-27,9	19,7	12-30,5	0,646	0,278
DPB1*0301	23,9	19–29,6	18,3	10,9–29	0,322	0,150
Протекторные						
DPB1*0101	10,5	7,2–15	16,9	9,8–27,4	0,144	0,377
DPB1*0501	2,8	1,3–5,8	4,2	1–12,2	0,837	0,495
B*4403	3,2	1,5–6,4	1,4	0–8,3	0,679	0,463
DPB1*0402	10,5	7,2–15	8,5	3,6–17,6	0,608	0,387

Примечания. *Данные представлены как % (95% ДИ). Для сравнения частот использовались статистика χ2 с поправкой на непрерывность, когда это необходимо. Корректировка на конфаундеры была выполнена с использованием логистической регрессии.*

** с поправкой на пол и возраст на момент постановки диагноза.*

Результаты молекулярно-генетического исследования у детей с ремиссией СД1

37 пациентам с длительной полной или частичной ремиссией проведено молекулярно-генетическое исследование, в ходе которого у 17 пациентов (табл. 11) выявлены гетерозиготные мутации в различных генах: у 6 пациентов выявлены мутации в генах, ассоциированных с развитием MODY (*HNF1B, GCK, KLF11, WFS1*), у 8 пациентов выявлены мутации ассоциированные с развитием сахарного диабета 2 типа, инсулинорезистентностью, ожирением (*ACAD10, PREX1, PCSK1, COG3, DGKD, SIRT1, FOXA2, SIM1, GLIS3*), у 8 пациентов выявлены мутации, ассоциированные с предрасположенностью к сахарному диабету 1 типа, аутоиммунным заболеваниям (*CBLB, MYRIP, COG3, FEM1B, CTSL, WFS1, GLIS3*). Все пациенты были серопозитивны.

В настоящее время имеется достаточно много исследований и описательных работ российских и зарубежных авторов о гетерозиготных вариантах, приводящих к нарушению формирования белка, ассоциированных с развитием моногенных и синдромальных форм СД. Общеизвестна клиническая характеристика разных типов СД, характерных сочетанных патологий почек, нервной системы, половых органов, щитовидной железы.

Ген *FOXA2* (ядерный фактор гепатоцитов 3β) экспрессируется в эмбриональных тканях, происходящих из энтодермы (поджелудочная железа, легкие, печень). Исследования на мышиных моделях показали, что данный ген участвует в развитии поджелудочной железы и дифференцировке эндокринных клеток через влияние на ген *PDX1* – ключевого участника в органогенезе поджелудочной железы. Делеции в генах *FOXA1/FOXA2* у мышей приводит к неонатальному СД и гипоплазии поджелудочной железы. У пациента №7 (табл. 11) не выявлено изменений в поджелудочной железе по данным УЗИ. Аналогичное течение СД описано у пациента из Швейцарии.

Ген *SIRT1* (сиртуин 1) экспрессируется в β-клетках поджелудочной железы и регулирует секрецию инсулина, а также, влияет на развитие Т-регуляторных клеток, тем самым учувствует в аутоиммунных процессах. В литературе описаны пациенты с СД1 в сочетании с инсулинорезистентностью. У пациента №8 СД выявлен на фоне избыточной массы тела, и через 2 года после манифестации заболевания максимальный уровень С-пептида на фоне стимуляции составил 3,12 нг/мл, что может свидетельствовать о сопутствующей инсулинорезистетности.

Ген *ACAD10* (фермент семейства Ацетил-КоА дегидрогеназ – 10) катализирует β-окисление жирных кислот, играющее ключевую роль в развитии инсулинорезистетности и СД2. Варианты в данном гене ассоциированы с ранней манифестацией СД2 (до 25 лет). У пациента №9 также выявлен вариант в гене *CBLB* (убиквитин-протеинлигаза Е3). Белковый продукт данного гена вовлечен в регуляцию иммунного ответа за счет контроля активации Т- и В-клеточных рецепторов, описан при СД1. Наш пациент с 12 до 17 лет наблюдался с диагнозом СД2 до выявления островковых ААт. Через 5 лет после манифестации заболевания максимальная секреция стимулированного С-пептида составила 2,08 нг/мл. По совокупности данных, можно свидетельствовать о сочетании СД1 и СД2 у данного пациента.

Ген *MYRIP* (белок, взаимодействующий с миозином VIIA и Rab) участвует в экзоцитозе инсулина путем взаимодействия в регуляции гомеостаза инсулина. Варианты в данном гене описаны на мышиных моделях СД. В нашем исследовании у двух пациентов выявлены в варианты в гене *MYRIP*.

Ген *PREX1* (фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат-зависимый фактор обмена Rac 1) опосредует передачу сигналов инсулина, экспрессируется в адипоцитах и вызывает инсулинорезистетность. Описан у пациентов с СД2. У пациента №11 максимальный уровень С-пептида на фоне стимуляции составил 5,97 нг/мл через 3 года после манифестации заболевания, что может косвенно указывать на наличие инсулинорезистетности.

Таблица 11. Генетические, клинические характеристики пациентов с сочетанием аутоиммунного и моногенного сахарного диабета.

	Ген	Вариант	Клиническая значимость	Заболевание	Возраст манифестации, годы	Характер манифестации	ДР, годы	Наследственность	Уровень HbA1c,%	С-пептид, нг/мл	ДД, годы	Терапия
1	*HNF1B* (NM_000458)	c.1474G>C p.G492R	Неопределенного значения, не описан	MODY5	12,9	Доклиническая	1,5	нет	6,3	1,04	1,5	Диета
2	*HNF1B* (NM_000458.4)	c.1006C>G p.H336D	Вероятно патогенный, описан	MODY5	11	Доклиническая	1,0	СД2 у отца	6,6	1,45	1	Инсулин, 0,04 ед/кг/ сут
3	*GCK* (NM_000162.3)	c.793G>A p.E265K	Патогенный, описан	MODY2	10,8	Доклиническая	4,0	нет	6,9	0,01	2,6	Инсулин, 0,27 ед/кг/сут
4	*KLF11* (NM_003597.5)	c.40_41dupGC p.N381SlnfsTer41	Вероятно патогенный, не описан	MODY7	12,3	Доклиническая	2,6	нет	7	0,76	5	Инсулин, 0,4 ед/сут
5	*POGZ* (NM_015100.4)	c.1777C>G p.Q593E	Вероятно патогенный, не описан	Синдром Уайта-Саттона	15	Доклиническая	1,2	СД2	7,1	7,37	2,5	Инсулин, 0,22 ед/кг/сут, метформин, 2000 мг/сут
	CTSL (NM_000009.12)	Chr9:8772760_87731109dup		Аутоиммунный сахарный диабет (мышиные модели)								
6	*WFS1* (NM_006005.3)	c.977C>T p.A326V	Вероятно патогенный, описан	Синдром Вольфрама	8,2	Доклиническая	1,9	СД2	6,8	0,8	1,9	Инсулин, 0,35 ед/кг/сут
		c.2272A>T p.K758X	Вероятно патогенный, не описан									
7	*FOXA2 (HNF3B)* (NM_021784.5)	c.1320C>A p.D440E	Неопределенной значимости, не описан	СД2	12,4	Доклиническая	5,2	нет	7,4	0,06	5,2	Инсулин, 0,47 ед/кг/сут
8	*SIRT1* (NM_001314049.1)	c.-2G>C	Неопределённой значимости, не описан	СД1	11,9	Доклиническая	2,8	СД2	6,7	1,35	3	Инсулин, 0,2 ед/кг/сут
9	*ACAD10* (NM_025247.6)	c.531+6C>T	Вероятно патогенный, не описан	НТГ, ИР, СД2	14,7	Доклиническая	2,9	нет	6,8	1,19	2,8	Инсулин, 0,06 ед/кг/сут

	CBLB (NM_170662.5)	c.578C>T p.P193L	Неопределённой значимости, не описан	СД1								
10	*MYRIP* (NM_015460.4)	c.1961A>G p.N654S	Неопределённой значимости, не описан	СД (мышиные модели)	7,1	Доклиническая	1,5	СД2	6,4	0,01	5	Инсулин 0,8 ед/кг/сут
11	*PREX1* (NM_020820.4)	c.2366A>G p.Y789C	Неопределённой значимости, не описан	СД2	5,1	Доклиническая	5	СД2	5,6	2,3	3,6	диета
12	*MYRIP* (NM_015460.4)	c.1942G>C	Неопределённой значимости	СД (мышиные модели)	12,2	Острая	1,0	СД2	5,7	1,96	1	Инсулин 0,05 ед/кг/сут
13	*COG3* (NM_031431.4)	c.1640C>G p.P547R	Неопределённой значимости, не описан	СД1, СД2	13,5	острая	2,6	нет	6,6	1,61	2,6	Инсулин 0,2 ед/кг/сут
	PCSK1 (NM_000439.5)	c.323G>C p.S108T	Неопределённой значимости, не описан	Ожирение								
14	*FEM1B* (NM_015322.5)	c.628C>A p.R210S	Неопределённой значимости, не описан	НТГ (мышиные модели)	4,9	случайная	3,5	нет	10,8	0,01	4,5	Инсулин 0,45 ед/кг/сут
15	*DGKD* (NM_152879.3)	c.734T>G p.V245G	Неопределённой значимости, не описан	ИР, СД2	16,8	случайная	1,1	нет	8,1	1,46	1,1	Инсулин 0,45 ед/кг/сут
16	*SIM1* (NM_005068)	c.383T>C p.I128T	Неопределённой значимости, не описан	Ожирение	14,4	случайная	1,3	СД2	6,3	4,69	1,3	диета
17	*GLIS3* (NM_001042413)	c.1910C>G p.T637R	Неопределённой значимости, не описан	Неонатальный СД, СД1, СД2	6,9	острая	2,8	нет	7,3	0,12	2,8	Инсулин, 0,4 ед/кг/сут

Примечания: *ДР – длительность ремиссии, ДД – длительность диабета*

Ген *COG3* (Субъединица 3 консервативного олигомерного комплекса Гольджи). Белковый продукт гена вовлечен в функционирование аппарата Гольджи в клетках. Нарушение экспрессии гена *COG3* описано у пациентов с СД 1 и 2 типов. Также, у данного пациента выявлен вариант в гене *PCSK1* (Пропротеинконвертаза 1), варианты в данном гене связаны с предрасположенностью к ожирению. На момент манифестации СД пациент №13 имел ожирение, через 3 года после манифестации заболевания пациент имел сохранную секрецию С-пептида (максимальный уровень стимулированной секреции составил 3,3 нг/мл).

Ген *FEM1B* экспрессируется в поджелудочной железе и скелетной мускулатуре, белковый продукт гена участвует в гомеостазе глюкозы в β-клетках поджелудочной железы. В экспериментальных исследованиях описаны нарушения толерантности к глюкозе и дефекты секреции инсулина на мышиных моделях. При манифестации заболевания у пациента № 14 выявлено НТГ, через 5 лет после манифестации секреция С-пептида не определялась.

Ген *DGKD* (Диацилглицеролкиназа δ) играет роль в инсулинорезистентности и ассоциирован с СД2. Манифестация заболевания у пациента № 15 была на фоне избыточной массы тела. Через 1 год после манифестации отмечался нормальный базальный уровень С-пептида - 1,36 нг/мл.

Дифференциальная диагностика пациентов с полной ремиссией СД1 и MODY

У пациентов с MODY были выявлены гетерозиготные мутации в следующих генах: *GCK* - в 85,7% (n=98), *HNF1A* – в 3,5% (n=4), *ABCC8* – в 1,8% (n=2), *HNF1B* - в 1,8% (n=2), *INSR* - в 1,8% (n=2), *HNF4A* – в 0,9% (n=1), *INS* - в 0,9% (n=1), *WFS1* - в 0,9% (n=1), *CEL* - в 0,9% (n=1), *AKT2* - в 0,9% (n=1), *PTF1A* - в 0,9% (n=1).

Клинико-лабораторная характеристика пациентов представлена в табл. 12. Пациенты с ремиссией СД1 и MODY не отличались по полу. На момент проведения обследования пациенты были сопоставимы по возрасту в двух группах. Длительность заболевания была меньше у пациентов с СД1.

ИМТ и SDS ИМТ в двух группах не различались. Доля пациентов с ожирением и избыточной массой тела была сопоставима в двух группах (p>0,05): при ремиссии СД1 ожирение встречалось у 8,3% пациентов (n=3), избыточная масса тела - у 16,7% (n=6), при MODY ожирение выявлено у 4,4% пациентов (n=5), избыточная масса тела - у 11,4% (n=13).

Пациенты с СД1 на момент диагностики нарушений углеводного обмена были значимо старше пациентов с MODY, причем СД был диагностирован в возрасте до 6 лет в 22,2% и 42,1%, в возрасте от 7 до 12 лет в 38,9% и 31,6%, старше 12 лет в 38,9% и 26,3% при ремиссии СД1 и MODY, соответственно (p=0,09). Клинические проявление СД при диагностике значительно чаще отмечались при СД1 (38,9%), чем при MODY (1,8%) (p<0,001). У 7 пациентов (19,4%) с ремиссией СД1 зафиксирован кетоз при манифестации, у 1 пациента (2,8%) - диабетический кетоацидоз (ДКА), в группе пациентов с MODY не зафиксировано ни одного случая ДКА. Умеренные клинические проявления СД (полиурия, полидипсия) отмечались у двух пациентов с GCK-MODY, в том числе у девочки с GCK-MODY отмечались кетонурия, снижение массы тела, при обследовании выявлен высокий уровень ААт (ZnT8 145 Ед/л), у данной пациентки возможно сочетание моногенного и аутоиммунного СД.

Гликированный гемоглобин был ниже у пациентов с ремиссией СД1 и составлял 6,0% [5,6; 6,4], в том время как при MODY - 6,5% [6,2; 6,7] (p<0,001).

Гликемия натощак была ниже у пациентов с ремиссией СД1 по сравнению с MODY – 5,12 ммоль/л [4,17; 5,87] и 6,27 ммоль/л [5,38; 6,72], соответственно. При проведении ПГТТ уровень глюкозы значимо не различался на 30, 90, 120 мин. в двух группах. Уровень гликемии на 60 мин. у пациентов с ремиссией СД1 был значимо выше, чем у пациентов с MODY - 12,22 ммоль/л [9,73; 14,29] и 10,4 ммоль/л [8,52; 12,58], соответственно (рис.8). Нормогликемия натощак была наиболее характерна для пациентов с ремиссией СД1, нарушенная гликемия натощак (НГН) - для пациентов с MODY (p=0,003): натощак уровень

гликемии соответствовал нормальным значениям у 63,8% и 27,2%, НГН – 25,0% и 54,38%, диабетическому уровню – 14,1% и 18,4%, при ремиссии СД1 и MODY, соответственно. На 120 минуте при проведении ПГТТ уровень гликемии в двух группах значимо не отличался (p=0,08) и соответствовал нормальным значениям в 31,3% и 29,8%, нарушенной толерантности к глюкозе – в 28,1% и 48,0%, диабетическому уровню – в 40,6% и 25,4%, при ремиссии СД1 и MODY, соответственно.

Уровень С-пептида натощак и в ходе ПГТТ в 2 группах не различался (рис.9).

В наследственном анамнезе у пациентов с ремиссией СД1 нарушения углеводного обмена отмечались в 66,7%, в том числе у родственников 1 степени родства (родители) – в 22,2%, что значимо реже, чем у пациентов с MODY. Родители пациентов с СД1 типа и ремиссией наблюдались с диагнозами: СД2 (n=3), гестационный СД (n=3), НТГ (n=1), СД1 (n=1). При MODY нарушения углеводного обмена в наследственном анамнезе отмечались – в 93% (p=0,014), в том числе у родственников 1 степени родства – в 71,1% (p<0,001).

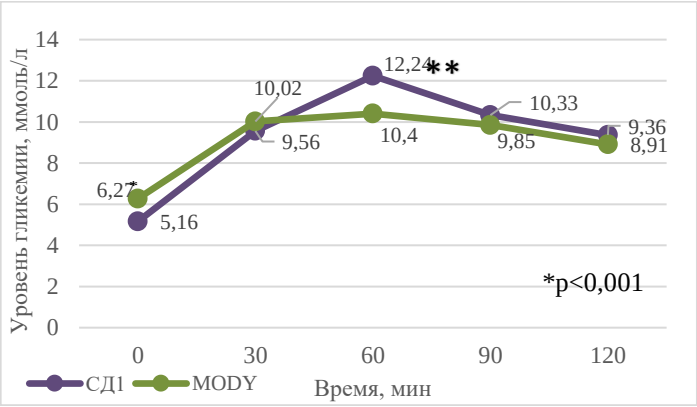

Рисунок 8. Уровень гликемии натощак и в ходе ПГТТ при ремиссии СД1 и MODY

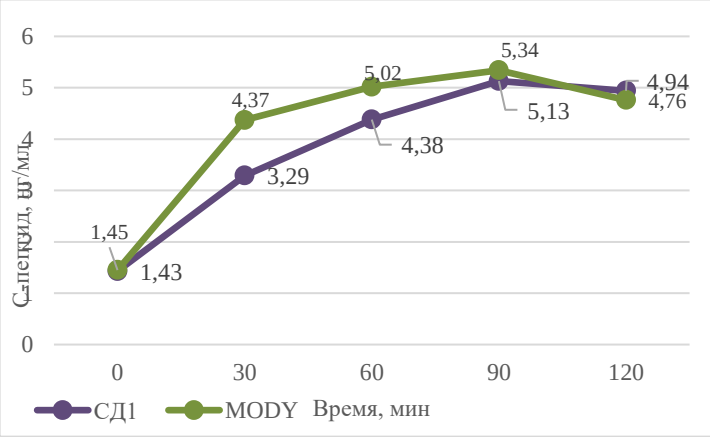

Рисунок 9. Уровень С-пептида натощак и в ходе ПГТТ у детей с полной клинико-лабораторной ремиссией СД1 и MODY

Положительный уровень одного и более вида ААт значимо чаще определялся у пациентов с ремиссией СД1 – в 77,8%, по сравнению с пациентами с MODY – 11,4% (рис. 10). Всем серонегативным пациентам в группе ремиссии СД1 проведено генетическое исследование. Патогенных вариантов в генах, ответственных за развитие MODY, не выявлено. Частота выявления ААт к ZnT8, IA2, ICA, GAD была значимо выше у пациентов с ремиссией СД1, частота выявления IAA в двух группах не различалась. При ремиссии СД1 один вид ААт определялся у 33,3% пациентов, 2 вида ААт – у 30,6%, более 3 видов ААт – у 13,9%. У пациентов с MODY выявлялось не более одного вида ААт. Уровень ААт IAA, ICA, GADA значимо не различался при ремиссии СД1 и MODY, титр IA2 и ZnT8 был значимо выше при ремиссии СД1.

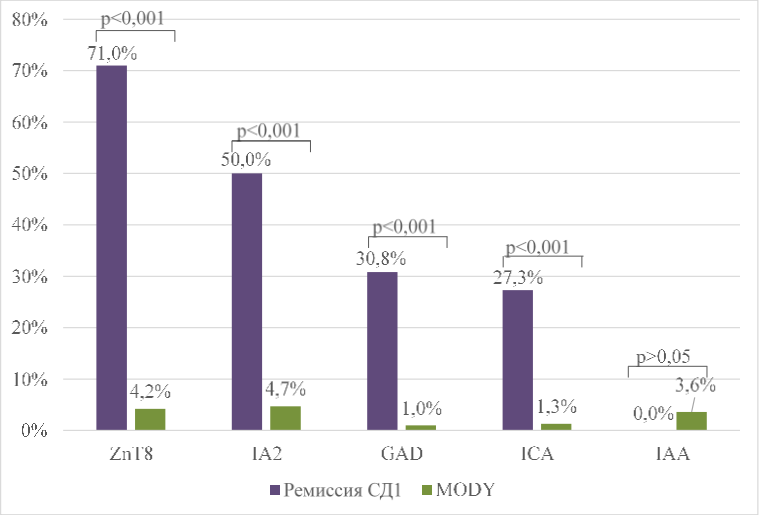

Рисунок 10. Частота выявления ААт у детей с ремиссией СД1 и MODY

Модель клинического прогнозирования сахарного диабета MODY типа у детей

После исключения не соответствующих и/или неполных записей (пациентов с более 30% отсутствующих значений), итоговая выборка составила 1710 детей в возрасте до 18 лет с СД1 (78%) и MODY (22%) диабетом. Среди включенных случаев, 1613 не имели пропущенных значений признаков, 92 имели 1 пропущенное значение и 5 имели 2 пропущенных значения. Таким образом общее количество пропущенных значений в отношении которых проведена подстановка (замена) по всей выборке составило 0,85%.

Характеристики выборок пациентов, использованных для обучения и тестирования модели представлены в таблице 13.

Таблица 12. Клиническая характеристика общей, тренировочной и тестовой выборок пациентов.

	Вся выборка			**Тренировочная выборка**			**Тестовая выборка**		
	Всего	**СД1**	**MODY**	**Всего**	**СД1**	**MODY**	**Всего**	**СД1**	**MODY**
	n=1710	n=1333	n=377	n=1348	n=1045	n=303	n=362	n=288	n=74
Мужской пол (%)	48,0%	47,0%	50,0%	48,0%	47,0%	51,0%	49,0%	50,0%	45,0%
Отягощенная наследственность (%)	26,0%	15,0%	68,0%	26,0%	14,0%	68,0%	27,0%	17,0%	69,0%
ИМТ SDS	0,19 [1,21]	0,23 [1,21]	0,01 [1,17]	0,19 [1,21]	0,23 [1,21]	0,03 [1,19]	0,17 [1,22]	0,22 [1,25]	-0,06 [1,08]
Возраст (годы)	10,56 [4,54]	10,42 [4,57]	11,12 [4,39]	10,64 [4,53]	10,49 [4,55]	11,21 [4,44]	10,26 [4,57]	10,14 [4,66]	10,75 [4,22]
Возраст манифестации (годы)	7,68 [4,32]	7,5 [4,27]	8,34 [4,45]	7,67 [4,29]	7,5 [4,23]	8,29 [4,47]	7,73 [4,44]	7,51 [4,42]	8,57 [4,42]
HbA1c (%)	7,67 [1,77]	7,95 [1,84]	6,58 [0,76]	7,68 [1,78]	7,98 [1,86]	6,57 [0,76]	7,6 [1,7]	7,85 [1,79]	6,64 [0,76]
Получает лечение (%)	74,0%	92,0%	6,0%	74,0%	92,0%	7,0%	73,0%	90,0%	4,0%

Примечания. *Данные представлены в виде: среднее значение (SD).*

Все предварительно отобранные признаки статистически значимо ($p<0,05$) влияли на тип сахарного диабета (табл. 14) и в дальнейшем были использованы для построения различных конфигураций НС.

Для определения оптимальной конфигурации НС, были проанализированы показатели прогностической эффективности нескольких моделей с последовательным включением каждого предиктора на основании более высокой статистической величины. Результаты представлены на рисунке 11.

Таблица 13. Результаты статистической оценки взаимосвязи предикторов с типом СД.

Переменная	Статистика	Величина	Значение p
Отягощенная по СД наследственность	Хи-квадрат	307,2	<0,001
Получаемое лечение	Хи-квадрат	294,8	<0,001
HbA1c	ANOVA	201,9	<0,001
Возраст на момент манифестации СД	ANOVA	12,4	<0,001
SDS ИМТ	ANOVA	10,7	0,001
Возраст паспортный	ANOVA	7,2	0,007
Мужской пол	Хи-квадрат	4	0,046

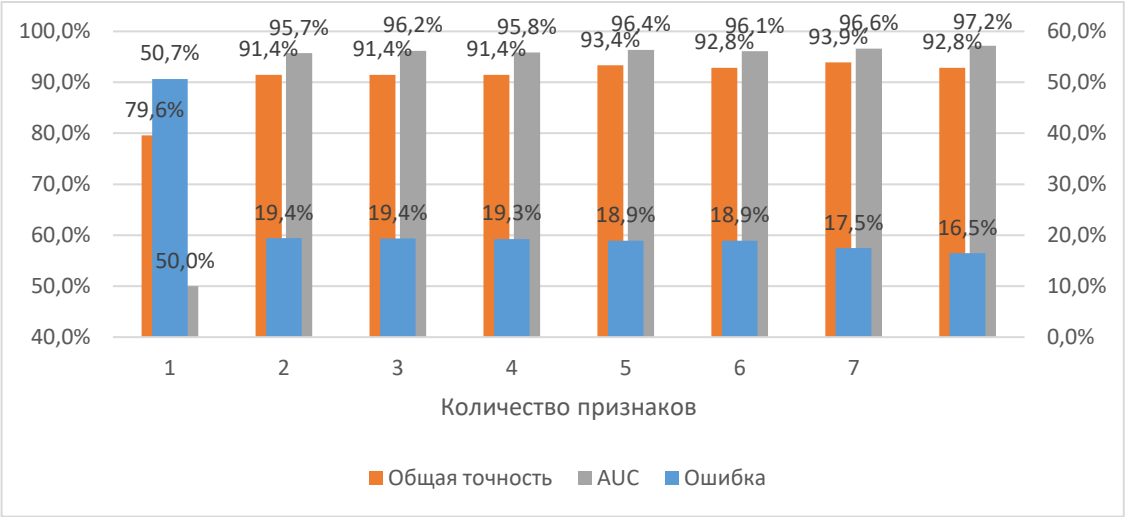

Рисунок 11. Показатели эффективности модели в зависимости от количества предикторов в процессе их последовательного добавления по статистической величине. Общая точность и AUC по основной оси, ошибка по вспомогательной оси.

Наиболее значимыми переменными для эффективной работы НС являлись отягощенная наследственность и получаемое лечение, однако включение других значимых признаков также увеличивало качество прогноза. На основании этого, для итоговой конфигурации НС было принято решение использовать все предварительно отобранные предикторы..

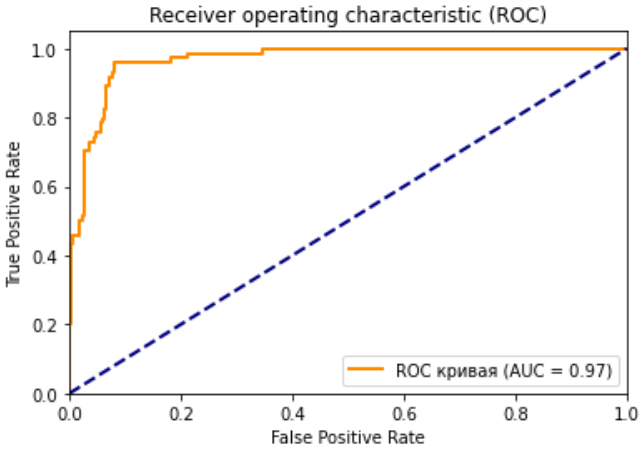

Рисунок 12. Операционных характеристики итоговой конфигурации НС полученные тестовой выборки.

На рисунке 12 представлена динамика ошибки – значения функции потерь в процессе обучения НС. Дальнейшее изменение архитектуры НС (увеличение скрытых слоев и количества нейронов в скрытых слоях) не привело к улучшению характеристик НС.

После обучения, оценка производительности (качества) НС проводилась на тестовой выборке. В процессе оценки, разработанная НС продемонстрировала хорошие

прогностические возможности. Так площадь под ROC (receiver operating characteristics) кривой (AUC) достигла 0,97 (рис. 12).

Для определения наиболее оптимального порогового значения предсказанной вероятности MODY диабета были проанализированы различные показатели матрицы несоответствий, отражающие качество НС.

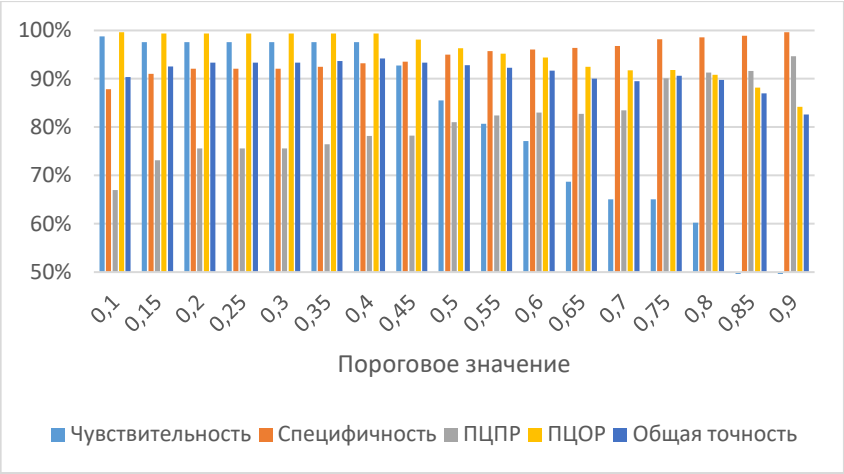

Рисунок 13. Показатели эффективности модели в зависимости от выбранного порогового значения предсказанной вероятности.

Наибольшая сумма показателей чувствительности и специфичности (1,91) была достигнута при пороговом значении 0,40 (предсказанная вероятность MODY диабета 40%) (Рис. 13). При этом пороговом значении, чувствительность составила 98%, специфичность 93%, ПЦПР с коррекцией на преваленс 78%, а ПЦОР с коррекцией на преваленс 99%, общая точность модели 94%.

На основании модели НС была разработана СППВР для определения наличия у пациента MODY диабета, реализованная в виде приложения (рис. 14).

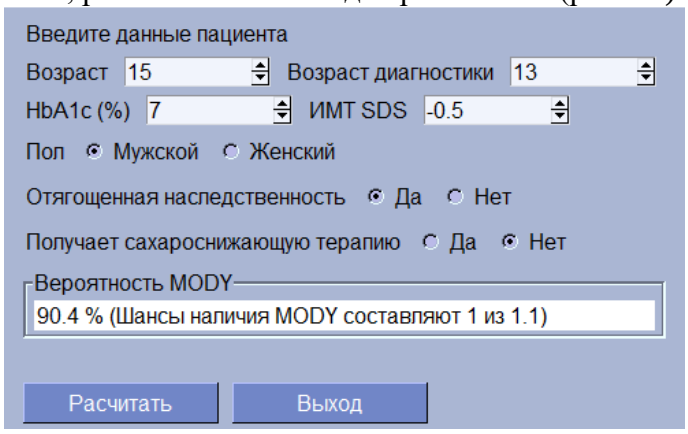

Рисунок14. СППВР на основании разработанной НС.

После внесения всех необходимых клинических признаков, СППВР рассчитывает вероятность и шансы наличия MODY диабета у конкретного пациента.

Выводы

1. Дебют СД1 в подростковом возрасте ассоциирован с более высоким уровнем С-пептида в начальном периоде заболевания, а также, с более медленным истощением β-клеток по сравнению с манифестацией заболевания в допубертатном возрасте. При длительности заболевания более 5 лет у 23% детей отмечалась определяемая секреция С-пептида.
2. При увеличении длительности СД1 частота серопозитивных пациентов снижается. При длительности заболевания более 5 лет 49% пациентов с манифестацией СД1 в допубертатном и 54% пациентов в пубертатном возрасте остаются серопозитивными по одному и более типуААт. Для манифестации СД1 в допубертатном возрасте характерна большая частота ААт IAA и меньшая частота IA-2A.
3. Ремиссия СД1 у детей ассоциирована с более старшим возрастом дебюта, доклинической диагностикой, меньшей частотой ААт к инсулину, большей частотой протекторных и меньшей частотой предрасполагающих HLA-гаплотипов
4. У 46,95% детей с ремиссией СД1 выявлены варианты в генах, ассоциированных с секрецией и/или действием инсулина, закладкой и развитием поджелудочной железы, предрасположенностью к аутоиммунным процессам.
5. Островковые ААт являются специфическим маркером СД1, однако их наличие не исключает MODY, так как 11,4% пациентов серопозитивны по одному из типов ААт.
6. Разработанный алгоритм персонализированного прогнозирования на основании искусственной НС позволяет на догенетическом этапе диагностировать MODY с чувствительностью и специфичностью тестирования, составляющей 96 и 92%, соответственно.

Практические рекомендации

1. Не рекомендуется использовать в клинической практике изолированную оценку уровня С-пептида в качестве основного дифференциально-диагностического критерия различных форм СД у детей.
2. Рекомендуется проведение исследования на наличие островковых ААт у детей с ремиссией СД и рассмотрение вопроса о направлении пациента на молекулярно-генетическое тестирование при полном отсутствии островковых ААт или в случае положительного уровня не более одного типа ААт.
3. У детей с ремиссией СД1 (при длительности заболевания более 6 месяцев) целесообразно проводить оценку вероятности наличия MODY с использованием разработанной СППВР для принятия решения о проведении дополнительного обследования и направления на генетическое исследование.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Romanenkova E.;** Zubkova N.; Timofeev A.; Laptev D. Islet cell autoantibodies status in patients with MODY phenotype. 56th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: 21-25 September 2020. Diabetologia. 2020;63(Suppl 1): p.78. doi:10.1007/s00125-020-05221-5
2. **Elizaveta Romanenkova**, Irina Eremina, Lubov Zilberman, Dmitry Laptev, Tamara Kuraeva, Olga Bezlepkina, Valentina Peterkova. Features Of Slowly Progressive Type 1 Diabetes Mellitus In Overweight Adolescents. J Endocr Soc. 2021;5 (Suppl 1):A658-A659. Published 2021 May 3. https://doi.org/10.1210/jendso/bvab048.1343
3. **Е.М. Романенкова**, Л.И. Зильберман, И.А. Еремина, О.Б. Безлепкина, Д.Н. Лаптев. Уровень С-пептида у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности заболевания. Сборник тезисов XVII Российской научно-практической конференции детских эндокринологов «Достижения науки в практику детского эндокринолога»,12–13 июня 2021 г. – 2021, стр. 68-69. https://doi.org/10.14341/conf12-13.06.21-68-69
4. **Е.М. Романенкова**, Е.В. Титович, Д.Н. Лаптев. Редкий клинический случай сочетания моногенной и аутоиммунной форм сахарного диабета. Сборник тезисов XVII Российской научно-практической конференции детских эндокринологов «Достижения науки в практику детского эндокринолога», 12–13 июня 2021 г. – 2021, стр. 70. doi:10.14341/conf12-13.06.21-70
5. Кураева Т.Л., Сечко Е.А., Еремина И.А., **Романенкова Е.М.,** Татаревич Е.Ю. Случай медленно прогрессирующего аутоиммунного сахарного диабета у ребенка с ожирением. Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов «Инновационные технологии в эндокринологии», 22–25 сентября 2021 года. – М., 2021. 2021г., стр.143
6. **Elizaveta Romanenkova**, Elena Titovich, Dmitry Laptev, Valentina Peterkova, Olga Bezlepkina. A Rare Clinical Case Of A Combination Of Monogenic And Autoimmune Diabetes Mellitus. Hormone Research Paediatrics. 2021г., №94, p. 250
7. Еремина И.А., Бричева Э.Б., **Романенкова Е.М**. Латентный аутоиммунный сахарный диабет в детском возрасте. Сборник тезисов конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием: «Достижения науки в практику детского эндокринолога» 4–5 декабря 2021 года. 2021г., стр. 11-12 https://doi.org/10.14341/ISAPPE-2021-4
8. Копытина Д.А., Сечко Е.А., **Романенкова Е.М.,** Лаптев Д.Н. Клинический случай моногенной формы сахарного диабета типа с гетерозиготной мутацией в гене CEL. Сборник тезисов конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием: «Достижения науки в практику детского эндокринолога» 4–5 декабря 2021 года. 2021г., стр. 28-29 https://doi.org/10.14341/ISAPPE-2021-19
9. **Романенкова Е.М.,** Сечко Е.А., Кураева Т.Л. Клиническое течение перманентного неонатального сахарного диабета в семье с гетерозиготной мутацией в гене инсулина. Сборник тезисов конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием: «Достижения науки в практику детского эндокринолога» 4–5 декабря 2021 года. 2021г., стр. 50-51 https://doi.org/10.14341/ISAPPE-2021-45
10. Почечная глюкозурия, обусловленная гетерозиготной мутацией в гене SLC5A2 у пациентки с сахарным диабетом типа MODY2. **Романенкова Е.М.,** Зубкова Н.А. Сборник тезисов конференции по орфанным заболеваниям и детским эндокринным заболеваниям с международным участием: «Достижения науки в практику детского эндокринолога» 4–5 декабря 2021 года. 2021г., стр. 49-50 https://doi.org/10.14341/ISAPPE-2021-44

11. **Романенкова Е.М.,** Еремина И.А., Титович Е.В., Сечко Е.А., Никанкина Л.В., Петеркова В.А., Безлепкина О.Б., Лаптев Д.Н. Уровень С-пептида и распространенность панкреатических аутоантител у детей с сахарным диабетом 1 типа при разной длительности заболевания. // Сахарный диабет. 2022;25(2):155-165. https://doi.org/10.14341/DM12843
12. Е.А. Сечко, **Е.М. Романенкова,** И.А. Еремина, Л.В. Никанкина, Д.Н. Лаптев, О.Б. Безлепкина, В.А. Петеркова. Роль специфических панкреатических антител в дифференциальной диагностике полной клинико-лабораторной ремиссии сахарного диабета 1 типа и MODY у детей. // Сахарный диабет. 2022;25(5):449-457. https://doi.org/10.14341/DM12921

Список сокращений и условных обозначений

FT1D – фульминатный сахарный диабет
GADA – аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе
GWAS – полногеномный поиск ассоциаций
HbA1c – гликированный гемоглобин
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген
HOMA – индекс инсулинорезистентности
IA-2A – аутоантитела к тирозинфосфатазе
IAA – аутоантитела к эндогенному инсулину
ICA – аутоантитела к цитоплазматическим структурам β-клеток
LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых
LADY – латентный аутоиммунный диабет 1 молодых
MHC - главный комплекс гистосовместимости
MODY – диабет взрослого типа у молодых лиц
ROC - операционная кривая теста
SD – среднее значение
SDS - число стандартных отклонений от среднего
SNP - однонуклеотидные полиморфизмы
ZnT8A – аутоантитела к транспортеру цинка 8
ААт – островковые аутоантитела
АЛТ – аспартатаминотрасфераза
АСТ – аланинаминотрансфераза
ДИ – доверительный интервал
ДКА – диабетический кетоацидоз
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
иАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
ИМТ – индекс массы тела
ИР – инсулинорезистентность
ИРИ – иммунореактивный инсулин
Me [Q1 – Q3] – медиана [1-й и 3-й квартили]
НС – нейронные сети
НТГ – нарушение толерантности к глюкозе
ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест
ПЦПР - прогностическая ценность положительного результата
СД – сахарный диабет
СД1 – сахарный диабет 1 типа
СД2 – сахарный диабет 2 типа
СППВР – система поддержки принятия врачебных решений