

Особенности наследственной предрасположенности к медленно прогрессирующему аутоиммунному диабету взрослых

К.Б.н. С.А. ШТАНДЕЛЬ, к.м.н. Т.М. ТИХОНОВА

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского» НАМН Украины, Харьков

Приведены результаты комплексного исследования особенностей формирования наследственной предрасположенности к медленно прогрессирующему аутоиммунному диабету взрослых (МПАДВ).

Цель исследования — комплексный анализ наследственной предрасположенности к развитию МПАДВ с использованием генеалогического, генетико-демографического и молекулярно-генетического методов.

Материал и методы. Генетическое и генетико-демографическое исследование проведено у 1155 больных сахарным диабетом (СД). Анализ распределения полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* выполнен у 599 больных СД и 253 здоровых лиц; 49А/С гена *CTLA4* — у 300 пациентов с СД и 44 лиц контрольной группы; Е23К гена *KCNJ11* — у 231 больного СД и 44 здоровых лиц. Проведено тестирование полигенной и генетической гетерогенности моделей наследования; изучена взаимосвязь степени метизации больного и семейного накопления СД; определение единичных полиморфизмов выполнялось с помощью полимеразной цепной реакции и рестриктивного анализа.

Результаты. МПАДВ является генетически самостоятельной формой СД и описывается параметрами полигенной пороговой модели; в его наследовании существенная роль принадлежит наследственным факторам (59,2%), имеются нелинейные межлокусные и межallelные ($G_D=1,2\%$) взаимодействия и возможно влияние ряда генов с выраженным эффектом в детерминации этой формы заболевания. В системе генетического контроля МПАДВ имеется примерно одинаковое количество общих генов с СД 1-го (СД1) и 2-го типа (СД2) (65,3 и 66,1% соответственно). Изменение семейного накопления СД1 и СД2 среди родственников I и II степени родства у больных МПАДВ с увеличением степени метизации (СМ) отличается от такового у больных как СД1, так и СД2. Носительство Е23К гена *KCNJ11*, 49А/С гена *CTLA4* и С1858Т гена *PTPN22* в харьковской популяции ассоциировано с МПАДВ, СД1 и СД2 и повышает риск их развития. Гомозиготное носительство 23К/К гена *KCNJ11*, 49С/С гена *CTLA4* и 1858Т/Т гена *PTPN22* соответствует наибольшему риску развития МПАДВ.

Выводы. Комплексное исследование выявило генетическую самостоятельность МПАДВ, что может служить основанием для уточнения классификации этой формы СД.

Ключевые слова: медленно прогрессирующий аутоиммунный диабет взрослых, СД1 и СД2, наследственная предрасположенность, степень метизации, единичный нуклеотидный полиморфизм.

The hereditary predisposition features of latent autoimmune diabetes of adults

S.A. SHTANDEL, T.M. TIKHONOVA

V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems, Kharkov

There are the results of complex study of features formation of hereditary predisposition to latent autoimmune diabetes of adults (LADA).

The aim of the study was the complex analysis of LADA hereditary predisposition with using of genealogical, genetic-demographic and molecular-genetic methods.

Material and methods. Genetic and genetic-demographic research is spent at 1155 diabetes mellitus (DM) patients, the analysis of distribution of polymorphism С1858Т of gene *PTPN22* is executed at 599 DM patients and 253 healthy ones; 49А/С gene *CTLA4* — at 300 DM patients and 44 control group persons; Е23К gene *KCNJ11* — at 231 DM patients and 44 healthy ones. Testing of polygene and genetic heterogeneity inheritance models are held; the interrelation of crossbreeding degree sick and DM family accumulation is studied; definition of single nucleotide polymorphisms were carried out with the help of polymerase chain reaction and restrict analysis.

Results. It has been shown, that LADA is genetically independent DM form, is described by parameters of polygenic threshold model, in its inheritance the essential role belongs to hereditary factors (59,2%), are available nonlinear intraloci and interallelic ($G_D=1,2\%$) interactions and influence of some genes with the expressed effect in determination of this form of disease is possible. In LADA genetic control system has about identical quantity of the common genes with DM type 1 and 2 (65,3 and 66,1%, accordingly). Change of family accumulation type 1 and 2 DM among 1 and 2nd degree of relationship relatives at LADA patients with crossbreeding degree augmentation differs from that at patients both type 1, and 2 DM. It has been shown, that the Е23К of gene *KCNJ11*, 49А/С gene *CTLA4* and С1858Т gene *PTPN22* polymorphisms in the Kharkov population are associated with LADA, type 1 and 2 DM and raised the risk of their development. The homozygous carriage 23К/К gene *KCNJ11*, 49С/С gene and 1858Т/Т gene *PTPN22* corresponds to the greatest risk of the LADA development.

Conclusions. The carried out complex research has taped the LADA genetic independence what can form the establishment for specification of classification of this DM form.

Keywords: Latent Autoimmune Diabetes of Adults, Type 1 and 2 Diabetes Mellitus, heredity predisposition, crossbreeding degree, single nucleotide polymorphism.

doi: 10.14341/probl201561530-42

Многочисленные работы по изучению гетерогенности сахарного диабета (СД) явились основани-

ем для выделения в качестве подтипа СД 1-го типа (СД1) медленно прогрессирующего аутоиммунного

СД взрослых (МПАДВ) [1]. Исходя из предположения, что в основе развития СД1 и МПАДВ лежат различные патогенетические процессы, общими для которых являются аутоиммунные нарушения, а клиническая манифестация МПАДВ протекает аналогично СД2, предлагалось введение термина СД1,5 типа [2]. К. Hamaguchi и соавт. [2] оставляют открытым вопрос о том, является ли заболевание у этих пациентов отдельной формой СД, либо имеет место СД1 с поздней манифестацией. На долю МПАДВ приходится 2—12% всех случаев СД и 10—20% случаев СД взрослых [3]. Исследования МПАДВ были инициированы эпидемиологическими данными, согласно которым среди больных СД2 обнаруживается неожиданно высокий процент пациентов (14,3%) с наличием аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD); в последующем таких больных приходится переводить на инсулинотерапию [4]. Дебют МПАДВ наблюдается преимущественно в возрасте от 35 до 50 лет. Торпидная манифестация данной формы СД с отсутствием специфических диабетических жалоб и возможностью достижения компенсации на первых порах путем назначения диеты и пероральных сахароснижающих препаратов обусловлена значительно менее агрессивной по сравнению с классическим СД1 деструкцией β -клеток и сохраняющейся вначале их секреторной активностью. Это определяет сходство манифестации МПАДВ с СД2 [5]. По мере развития патологического процесса (в среднем от 6 мес до 5 лет после диагностирования СД) на фоне пероральной сахароснижающей терапии ухудшаются показатели гликемического контроля и возникает необходимость в переводе больных на инсулин [1]. С учетом основного механизма поражения β -клеток верификация диагноза МПАДВ основана на выявлении аутоантител к GAD (GAD ab), цитоплазматическому антигену (ICA ab), тирозинфосфатазе (IA—2A ab), инсулину (IAA ab) [2]. В отличие от СД1 при МПАДВ может наблюдаться иммунотолерантность к антигенам β -клеток, что способствует спонтанной защите клеток поджелудочной железы от обширной Т-клеточной деструкции [5]. Несмотря на выявление при МПАДВ генотипов HLA-системы, свидетельствующих о высоком риске развития СД, некоторые исследователи придают им меньшее значение, чем при СД1 [6]. Обследования пациентов с установленным диагнозом СД2 и наличием аутоантител к GAD показали, что эта форма СД имеет аутоиммунную природу, но отличается от СД1 по инсулинозависимости и распределению предрасполагающих к СД аллелей [2]. Изучение семейного накопления разных форм СД у больных с МПАДВ выявило присутствие родственников I и II степени

родства, больных как СД1, так и СД2 [7]. Таким образом, к настоящему моменту вопрос о генетической детерминации этой формы СД остается открытым.

Установлено влияние структуры популяции на распространенность наследственных заболеваний [8]. «Генетический груз» популяции состоит из двух компонентов — мутационный и сегрегационный груз, связанный с полиморфизмом генов. В оптимальной среде разные генотипы не отличаются по жизнеспособности от полиморфной части генома. В субоптимальной, стрессирующей среде разные генотипы начинают вести себя по-разному. Гетерозиготы, у которых ген представлен разными аллелями, лучше приспосабливаются к изменениям окружающей среды, чем гомозиготы, поэтому гетерозиготность популяции возрастает, «сегрегационный груз» накапливается. К факторам, изменяющим генные частоты в популяции, относят (наряду с мутациями и отбором) миграцию, изоляцию и аутбридинг [9]. Под аутбридингом в современных популяциях человека подразумевается расширение круга брачных связей (увеличение среднего расстояния между местами рождения мужа и жены), увеличение частоты межнациональных браков [8]. Параметром, отражающим степень генетических различий между брачными партнерами, следовательно, и уровень аутбридинга, является расстояние между местами рождения супругов. Показано влияние структуры популяции на подверженность СД [10]. На сегодняшний день доказано полигенное наследование СД1 и СД2 и известен ряд генов, определяющих предрасположенность к развитию этих заболеваний [11, 12]. С учетом особенностей генеза МПАДВ целесообразным является изучение как полиморфизма генов, кодирующих механизмы регуляции иммунной системы, в частности, ее Т-клеточного звена, так и отвечающих за развитие инсулиновой недостаточности. К указанным генам относят ген *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4), полиморфизм которого определяет также предрасположенность к СД1. Ген *CTLA4* расположен на хромосоме 2q33 между двумя генами-активаторами Т-лимфоцитов: геном рецептора-активатора (CD28) и геном, индуцирующим костимулятор (ICOS); содержит 4 экзона и три интрона. Изоформа рецептора (full-length isoform — flctla4), синтезируемая в активированных Т-лимфоцитах, закодирована в 4 экзонах:

Сведения об авторах:

Штандель Светлана Анатольевна — к.б.н., ст.н.с. лаб. патофизиологии и медицинской генетики ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского» НАМН Украины, Харьков, e-mail: shtandel@mail.ru;

Тихонова Татьяна Михайловна — к.м.н., ст.н.с. отд. возрастной эндокринологии ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского» НАМН Украины, Харьков

лидерный белок кодируется экзоном 1, лиганд-связывающий домен — экзоном 2, трансмембранная область — экзоном 3 и цитоплазматический домен — экзоном 4. Известно более 30 точечных однонуклеотидных замен в разных районах гена *CTLA4*. Одной из важных однонуклеотидных замен является полиморфизм одиночного нуклеотида 49A/G в первом экзоне, приводящий к снижению функциональной активности белка CTLA4. Белковый продукт гена *CTLA4* принимает участие в регуляции активности Т-лимфоцитов и играет важную роль в развитии аутоиммунных процессов [13]. Доказано участие локуса гена *PTPN22* в отрицательном контроле активации и развития Т-лимфоцитов. Ген *PTPN22* (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22) картирован на 1p13.3—p13.1 хромосоме. Он кодирует лимфоид-специфическую фосфатазу LYP, супрессирующую активацию Т-лимфоцитов. Полиморфизм С1858Т обуславливает замену аргинина на триптофан в 620 кодоне SH3-области белка. Два варианта гена *PTPN22* — С1858 и Т1858 — различаются важной частью аминокислотной последовательности, отвечающей за ассоциацию LYP с Csk-киназой (негативная регуляция). При замене аргинина на триптофан в 620 положении (аллель Т1858) не обеспечивается связь с Csk-киназой. Это и определяет склонность к аутоиммунным заболеваниям, в частности, к СД1 [14]. Показана также [13] ассоциация СД1 с полиморфизмом 49A/G гена *CTLA4*. Ген *KCNJ11* находится на 11 хромосоме в области p15.1. Этот ген кодирует синтез белка Kir6.2 (Potassium inward rectifier 6.2), входящего в состав калиевого канала в клетках, способных к возбуждению, и создает поры для транспортировки ионов калия. Закрывание канала необходимо для секреции инсулина β -клетками. Большинство мутаций этого гена являются миссенс-мутациями, имеющими доминант-негативный эффект, приводящий к снижению тока IK1, уменьшению реполяризации и увеличению длительности потенциала действия. Этот полиморфизм принимает участие в развитии инсулиновой недостаточности у больных СД2 и ассоциирован с его развитием во многих популяциях [15].

Цель настоящего исследования — комплексный анализ наследственной предрасположенности к

развитию МПАДВ с использованием генеалогического, генетико-демографического и молекулярно-генетического методов.

Материал и методы

Семейное накопление СД и степень метизации (СМ) МПАДВ, СД1 и СД2 у родственников I и II степени родства было изучено у 1056 пациентов (98 — МПАДВ, 451 — СД1 и 507 — СД2), находившихся на лечении в клинике ГУ ИПЭП. Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

МПАДВ диагностировался на основании торпидной манифестации заболевания, отсутствия спокойной и/или продолжительной компенсации на фоне приема пероральной сахароснижающей терапии. Диагноз подтверждался при показателях С-пептида (менее 0,56 нг/мл), положительного титра антител к GAD, ICA и IA—2A.

Сбор данных генеалогического анамнеза проводился методом единичной регистрации согласно рекомендациям ВОЗ [16]. Фенотипы родственников устанавливались путем анкетирования и обследования врачами клиники. Распространенность форм СД в Харькове рассчитана по данным историй болезни, имеющихся в районных поликлиниках, а также сведений об общей численности населения города. Влияние генетических и средовых факторов определялось путем компонентного анализа. Исследование генетической гетерогенности заболевания проводилось по методу Ch. Smith [17].

СМ больного определялась согласно [18]. Больные распределялись в четыре группы в соответствии с данными о месте рождения и национальности родителей и прародителей. 1-ю группу составили индивиды, родители которых были одной национальности и происходили из одного небольшого населенного пункта. Во 2-й группе родители пробандов были одной национальности, но родились в разных населенных пунктах, либо одном большом городе. 3-ю группу составили лица, родители которых были разных, этнически близких национальностей (русские и украинцы). В 4-ю группу вошли больные, родители и прародители которых были разных этнически отдаленных национальностей (русские и казахи).

Таблица 1. Характеристика больных СД

Показатель	СД1	СД2	МПАДВ
Число обследованных больных:	451	606	98
мужчины	197	238	32
женщины	254	368	66
Возраст на момент обследования ($\bar{X} \pm m_{\bar{X}}$), годы	37,13 $\pm$ 0,71	53,94 $\pm$ 0,47	52,19 $\pm$ 1,45
Возраст начала СД ($\bar{X} \pm m_{\bar{X}}$), годы	24,83 $\pm$ 0,75	44,53 $\pm$ 0,51	44,96 $\pm$ 1,01
Возраст начала инсулинотерапии ($\bar{X} \pm m_{\bar{X}}$), годы	24,83 $\pm$ 0,75	53,14 $\pm$ 0,81	47,67 $\pm$ 1,10
Длительность эффективной пероральной сахароснижающей терапии ($\bar{X} \pm m_{\bar{X}}$), годы	—	10,48 $\pm$ 0,43	2,73 $\pm$ 0,27

Примечание. $\bar{X}$ — среднее арифметическое; $m_{\bar{X}}$ — ошибка среднего.

Определение полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* проведено у 62 больных СД1, у 131 пациента с СД2, у 110 лиц с LADA и 11 здоровых жителей Харькова. Сведения о полиморфизме С1858Т гена *PTPN22* у 242 здоровых жителей Харькова и 296 больных СД1, полученные в 2004 г., были любезно предоставлены для дальнейшего анализа научным сотрудником Института паразитологии и биомедицины Федец Марией Ивановной (Гранада, Испания). Авторы выражают ей глубокую благодарность за предоставленные данные. Определение полиморфизма 49A/G гена *CTLA4* выполнено у 64 больных СД1, 127 пациентов с СД2, 109 лиц с LADA и 44 здоровых жителей Харькова. Определение полиморфизма E23K гена *KCNJ11* проводилось у 47 больных СД1, 101 пациентов с СД2, 83 лиц с LADA и 44 здоровых жителей Харькова.

Полиморфизм С1858Т гена *PTPN22* определялся при помощи полимеразной цепной реакции с использованием *rsaI* рестриктазы [14]. Полиморфизм С1858Т гена *PTPN22* был амплифицирован при помощи прямого АСТGАТААТGТТGСТТCААСGГ и обратного TCACCAGCTTCCTCAACCAC праймеров. Реакционная смесь содержала 20 нг геномной ДНК, 1,2 мкл 10х PCR буфера, 1,2 мкл dNTP (1,25 ммоль/л), 0,3 мкл каждого праймера (20 пмоль/л), 0,6 мкл DMSO и 0,1 мкл *Taq* полимеразы (фирма «Сибэнзим») в 12 мкл реакционной смеси. Условия амплификации: первоначальная денатурация 2 мин при 94 °С, последующие шаги — 94 °С, 30 с, 30 с в 60 °С и 30 с в 72 °С (35 циклов), и 1 цикл — 72 °С 2 мин. Продукт амплификации (12 мкл) инкубировался с 10 U *rsaI* рестриктазы (фирмы «Сибэнзим») при температуре 37 °С в течение 12 ч. Мутантный аллель 1858 Т теряет последовательность рестрикции и состоит из фрагмента 218 bp. Рестрикция аллеля 1858С дает фрагменты 176 bp и 46 bp.

Полиморфизм А49G гена *CTLA4* амплифицирован при помощи прямого GCTCTACTTCCTGAA GACCT и обратного AGTCTCACTCACCTTTGCAG праймеров. Реакционная смесь содержала 25 нг геномной ДНК, 2,5 мкл 10х PCR буфера, 0,6 мкл dntp (2,5 ммоль/л), 0,3 мкл каждого праймера (20 пмоль/л), и 0,2 мкл *Taq* полимеразы (фирма «Сибэнзим») в 25 мкл реакционной смеси. Условия амплификации: первоначальная денатурация 4 мин при 94 °С, последующие шаги: 58 °С, 45 с, 45 с в 72 °С, и 45 с в 94 °С (30 циклов), и окончательная экспозиция при 72 °С 4 мин. Продукт амплификации (10 мкл) инкубировался с рестриктазой *bbsI* при 65 °С в течение 1 ч. Нормальный аллель 49 А теряет последовательность рестрикции, состоит из фрагмента 162 bp, рестрикция мутантного аллеля 49G дает фрагменты 88 bp и 74 bp [13].

Полиморфизм E23K гена *KCNJ11* был амплифицирован при помощи прямого GAATACGTCCTGA CACGCCT и обратного GCCAGCTGCACAGGAA

GGACAT праймеров. Реакционная смесь содержала 25 нг геномной ДНК, 2,5 мкл 10х PCR буфера, 0,6 мкл dntp (2,5 ммоль/л), 0,3 мкл каждого праймера (20 пмоль/л), и 0,3 мкл *Taq* полимеразы (фирма «Сибэнзим») в 25 мкл реакционной смеси. Условия амплификации: первоначальная денатурация 3 мин при 95 °С, последующие шаги — 95 °С 1 мин, 1 мин в 62 °С, и 1 мин в 72 °С (35 циклов) и окончательная экспозиция при 72 °С 5 мин. Продукт амплификации (10 мкл) инкубировался с рестриктазой *BanII* при 37 °С в течение 2 ч и при 65 °С 10 мин. Мутантный аллель 23К теряет последовательность рестрикции и состоит из фрагмента 218 bp. Рестрикция аллеля 23Е дает фрагменты 178 bp и 40 bp [15].

Оценка относительного риска развития заболевания при носительстве полиморфизма (Odds ratio) проводилась согласно [19].

Влияние СМ на подверженность всем формам СД оценивалась при помощи однофакторного дисперсионного анализа, достоверность различий определялась при помощи критерия χ^2 [20].

Комиссия по вопросам этики ГУ «ИПЭП им. В.Я. Данилевского НАМН Украины» (протокол №10 от 26.06.14) свидетельствует, что участники исследования подписывали информированное согласие; протоколы исследований соответствуют морально-этическим нормам и принципам Хельсинкской декларации, Конвенции Совета Европы и соответствующих законов Украины по соблюдению прав человека.

Результаты и обсуждение

Исходные данные, послужившие основой для генетического анализа, представлены в табл. 2. Полученные данные свидетельствуют о значительном преобладании родителей, больных СД1, СД2 и МПАДВ по сравнению с их популяционными частотами.

Так как генетическая детерминация СД описывается параметрами модели D. Falconer [11], для изучения взаимосвязи между подверженностями к МПАДВ, СД1 и СД2 была протестирована модель генетической гетерогенности Ch. Smith (табл. 3). Эта мо-

Таблица 2. Распространенность МПАДВ среди родственников пробандов и в популяции

Группа родственников	Общее число	Больные МПАДВ	
		абс.	%
Сибсы	155	2	1,29±0,91
Родители	196	2	1,02±0,72
Дети	152	0	0,00±0,81
Родители + дети	348	2	0,57±0,40
Дедушки (бабушки)	265	0	0,00±0,61
Дяди (тети)	427	1	0,23±0,23
Популяция		0,06 %	

Таблица 3. Анализ взаимосвязи между подверженностями к различным клиническим формам СД

Форма СД у пробанда	Форма СД у родителей				Наследуемость, %	Коэффициенты корреляции между подверженностями (r_g)
	МПАДВ	СД1	СД2	Всего		
МПАДВ	2	3	24	196	57,62	МПАДВ—СД 1 $r_g=0,653$
СД1	1	21	56	800	54,24	СД1—СД2 $r_g=0,587$
СД2	8	33	151	1003	94,32	МПАДВ—СД2 $r_g=0,661$

Таблица 4. Результаты однофакторного дисперсионного анализа семейного накопления СД1 среди родственников I и II степени родства у больных МПАДВ разной СМ

Показатель	СД1			СД2		
	суммарная фак- тории-альная (x)	случайная (z)	общая (y)	суммарная фак- тории-альная (x)	случайная (z)	общая (y)
Дисперсия (C)	0,053	14,718	14,77134	0,439	50,145	49,706
Степень свободы (v)	3	980	984	3	980	984
Квадрат среднего квадратического отклоне- ния (σ^2)	0,018	0,015	0,015	0,146	0,051	0,051
Критерий Фишера (F)	1,174			2,88		
F_{st}	2,6			2,60		
				3,78		
P	>0,05			<0,05		

дель применяется для выяснения генетической гетерогенности клинических форм исследуемого заболевания, в случае, если показано его полигенное наследование, описываемое пороговой моделью D. Falconer.

На основе данных семейного анамнеза были рассчитаны прямые и перекрестные коэффициенты корреляции в парах «пробанд—родитель». В модели Ch. Smith, предполагающей существование различных подверженностей к двум формам заболевания, коэффициент корреляции между подверженностями (r_g) к МПАДВ и СД1 составил $0,653 \pm 0,096$, а к МПАДВ и СД2 — $0,661 \pm 0,068$. Это указывает на генетическую самостоятельность сравниваемых форм и значительное число общих генов в детерминации клинических вариантов заболевания. По результатам проведенного анализа выполнено тестирование распределения МПАДВ среди родственников и в популяции на предмет их соответствия параметрам пороговой модели D. Falconer. Представленные данные показали соответствие распределения больных среди родственников пробанда и в популяции параметрам этой модели. При разложении общей фенотипической дисперсии подверженности к МПАДВ, с использованием данных о родителях и сибсах, подходящим оказалось решение, включающее оценку $G_A = (57,62 \pm 15,17\%)$ и $G_D = (12,16 \pm 43,56\%)$. Оценка G_A в данном решении могла быть теоретически завышена за счет входящих в нее $1/2$ оценки эпистатической генетической компоненты и удво-

енной оценки систематической средовой компоненты «общего дома». В рамках этой модели весомый вклад в развитие МПАДВ вносят генетические факторы (коэффициент наследования в «узком смысле» составил 59,2%).

Таким образом, помимо того, что в детерминации МПАДВ генетические факторы играют существенную роль, существуют нелинейных межальельные взаимодействия в системе генетического контроля заболевания (G_D).

Влияние структуры популяции на подверженность МПАДВ изучалось путем исследования особенностей семейного накопления СД1 и СД2 в зависимости от СМ больного. Полученные результаты свидетельствуют о том, что распределение больных МПАДВ по СМ достоверно не отличается от такового в популяции ($\chi^2=2,917$; $df=3$; $p=0,549$). Не выявлено взаимосвязи СМ и семейного накопления СД1 среди родственников I и II степени родства у больных разной СМ. Однако была показана значимость влияния СМ на семейное накопление СД2 среди родственников I и II степени родства у больных МПАДВ (табл. 4).

Особенности семейного накопления СД среди родственников I и II степени родства у больных разными формами СД различной СМ приведены в табл. 5.

Анализ семейного накопления СД у больных разной СМ показывает увеличение семейного накопления СД1 среди родственников I и II степени род-

Таблица 5. Больные СД родственники I и II степени родства у пациентов с СД разной СМ

Тип СД у пробанда	СМ больно-го	Общее число	Больные СД родственники			
			СД1		СД2	
			абс.	%±m _g	абс.	%±m _g
МПАДВ	1	280	2	0,71±0,50	5	1,79±0,79
	2	413	8	1,94±0,68	28	6,78±1,24
	3	271	6	2,21±0,89	17	6,27±1,48
	4	79	0	0,00±1,25	5	6,33±2,76
СД1	1	859	7	0,82±0,31	33	3,84±0,66
	2	2301	43	1,87±0,28	78	3,39±0,38
	3	1311	25	1,91±0,38	49	3,74±0,52
	4	488	22	4,51±0,94	13	2,66±0,73
СД2	1	1810	24	1,33±0,27	93	5,14±0,52
	2	3042	47	1,55±0,22	222	7,30±0,47
	3	1327	15	1,13±0,29	76	5,73±0,64
	4	709	20	2,82±0,62	56	7,90±1,01

ства с ростом СМ у пробандов с СД1 (0,82—1,87—1,91—4,51% соответственно) при приблизительно одинаковом семейном накоплении СД2 (3,84—3,39—3,74—2,66% соответственно).

Среди больных СД2 увеличение СМ пробанда сопровождалось увеличением семейного накопления СД2 у родственников I и II степени родства у пациентов 2 и 4 — СМ (5,14—7,30—5,73—7,90% соответственно), тогда как накопление СД1 в родословных было несколько большим у больных 4 СМ, чем в остальных группах (1,33—1,55—1,13—2,82% соответственно).

У больных МПАДВ среди родственников I и II степени родства отмечался рост семейного накопления СД1 с 1 по 3 СМ и его снижение у больных 4 СМ (0,71—1,94—2,21—0,00% соответственно), что отличалось от такового при СД1 и СД2; больные 1 СМ характеризовались значимо более низким семейным накоплением СД2 среди родственников I и II степени родства (1,79—6,78—6,27—6,33% соответственно), что также отличается от такового у больных СД1 и СД2.

Проведенный анализ показал влияние СМ больного на семейное накопление СД у больных СД1, СД2 и МПАДВ, что подтверждает генетическую самостоятельность МПАДВ, доказанную нами ранее путем генетического анализа.

Учитывая то, что современный уровень исследований использует не только данные генетического анализа, но и методы молекулярной генетики, нами были изучены особенности распределения единичных нуклеотидных полиморфизмов генов, определяющих предрасположенность как к СД1, так и к СД2.

Результаты генетического анализа показали большой процент общих генов как СД1, так и СД2 в детерминации МПАДВ. Исходя из того, что антигены системы HLA, определяющие в основном пред-

расположенность к СД1, сильно сцеплены и плохо комбинируются, целесообразно было изучить полиморфизмы генов иммунного ответа, играющих вторичную роль в развитии СД1, локализованных на разных хромосомах и хорошо комбинирующихся в популяции в процессе скрещивания.

В качестве примера таких полиморфизмов изучались распределение С1858Т гена *PTPN22* и 49А/Г гена *CTLA4* у больных СД1, СД2, МПАДВ и здоровых жителей Харькова. Среди единичных полиморфизмов, определяющих развитие предрасположенности к СД2, логично было исследовать мутацию, отвечающую за развитие инсулиновой недостаточности. К таким мутациям относится полиморфизм Е23К гена *KCNJ11*.

Сравнительный анализ распределения генотипов полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* среди всех сравниваемых групп (табл. 6) выявил статистически значимую разницу распределения у здоровых индивидов и больных LADA, СД1 и СД2 ($\chi^2=47,063$; $p=0,000$).

Изучение распределения генотипов С—Т1858Т гена *PTPN22* показало значимую ассоциацию гомозигот по этому полиморфизму с МПАДВ, СД1 и СД2. Следует отметить, что среди пациентов с МПАДВ значимо чаще, чем среди больных СД1 или СД2 встречались гомозиготные носители этого полиморфизма. Значимых различий в частотах генотипов между больными СД1 и СД2 не выявлено (табл. 7).

Таким образом, изучение ассоциации единичного нуклеотидного полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* показало его выраженную ассоциацию с МПАДВ, СД1 и СД2. Наиболее выраженная ассоциация этого полиморфизма наблюдалась с МПАДВ. Для проверки этого предположения нами было изучено распределение полиморфизма 49А/Г гена *CTLA4*, вызывающего иммунные нарушения, у

Таблица 6. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* у больных СД и здоровых жителей Харькова

Показатель	Контроль (n=253)		Больные		χ^2	p	Показатель относительного риска (OR) (95% ДИ)
	абс.	%	абс.	%			
СД1 (n=358)							
Генотип:							
С/С	185	73,10	221	61,73	8,124	0,004	0,59 (0,56—1,13)
С/Т	66	26,10	113	31,56	1,891	0,169	1,31 (0,78—1,61)
Т/Т	2	0,80	24	6,7	11,313	0,000	9,02 (0,61—11,10)
СД2 (n=131)							
Генотип:							
С/С	185	73,10	75	57,30	9,230	0,002	0,49 (0,47—1,15)
С/Т	66	26,10	47	35,88	3,527	0,060	1,59 (0,76—1,92)
Т/Т	2	0,80	9	6,90	9,385	0,002	9,26 (0,56—12,35)
МПАДВ (n=110)							
Генотип:							
С/С	185	73,10	52	47,30	21,479	0,000	0,33 (0,39—0,98)
С/Т	66	26,10	41	37,30	4,092	0,043	1,68 (0,78—2,02)
Т/Т	2	0,80	17	15,5	30,346	0,000	22,94 (8,30—46,57)

Таблица 7. Различия в частотах генотипов и аллелей полиморфизма С1858Т гена *PTPN22* у больных СД

Сравниваемые группы	Показатель	χ^2	p
СД1 — СД2	Генотип:		
	С/С	0,629	0,428
	С/Т	0,627	0,429
	Т/Т	0,019	0,890
СД1 — МПАДВ	Генотип:		
	С/С	6,655	0,010
	С/Т	0,997	0,318
	Т/Т	7,003	0,008
МПАДВ — СД2	Генотип:		
	С/С	2,005	0,157
	С/Т	0,008	0,929
	Т/Т	3,730	0,050

больных разными клиническими вариантами СД. Полученные результаты представлены в табл. 8.

Анализ распределения генотипов среди всех сравниваемых групп показал значимое отличие больных СД1, СД2 и МПАДВ от здоровых жителей Харькова ($\chi^2 = 17,853$; $df=6$; $p=0,001$). Показана значимая ассоциация мутантных гомозигот G/G с СД1, СД2 и МПАДВ ($OR_{СД1} = 5,61$; $OR_{СД2} = 4,27$; $OR_{МПАДВ} = 7,30$). Также следует отметить, что среди больных с МПАДВ достоверно чаще, чем среди больных СД2 встречались гомозиготные носители полиморфизма 49A/G гена *CTLA4* (табл. 9).

Достоверных различий в частотах генотипов больных СД1 и СД2 не выявлено. Ассоциации полиморфизма, вызывающего аутоиммунные наруше-

Таблица 8. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма 49A/G гена *CTLA4* у больных СД и здоровых жителей Харькова

Показатель	Контроль (n=44)		Больные		χ^2	p	OR (95% ДИ)
	абс.	%	абс.	%			
СД1 (n=64)							
Генотип:							
A/A	15	34,09	12	18,75	2,506	0,113	0,45 (0,29—1,71)
A/G	25	56,82	29	45,31	0,959	0,327	0,63 (0,38—1,77)
G/G	4	9,09	23	35,94	8,642	0,003	5,61 (0,67—6,67)
СД2 (n=127)							
Генотип:							
A/A	15	34,09	26	20,47	2,620	0,106	0,50 (0,35—1,58)
A/G	25	56,82	63	49,61	0,422	0,516	0,75 (0,44—1,76)
G/G	4	9,09	38	29,92	6,570	0,010	4,27 (0,63—5,62)
МПАДВ (n=109)							
Генотип:							
A/A	15	34,09	22	20,18	2,592	0,107	0,49 (0,34—1,60)
A/G	25	56,82	41	37,61	3,962	0,047	0,46 (0,35—1,45)
G/G	4	9,09	46	42,20	14,152	0,000	7,30 (0,79—7,09)

ния с СД1, СД2 и МПАДВ, может быть следствием снижения давления отбора против СД1, который перестал быть сублетальным признаком в результате введения в практику инсулинотерапии.

Результаты сравнительного анализа распределения полиморфизма E23K гена *KCNJ11*, участвующего в развитии инсулиновой недостаточности и определяющего предрасположенность к СД2, приведены в табл. 10.

Анализ распределения генотипов E23K гена *KCNJ11* среди сравниваемых групп выявил значительную ассоциацию носителей полиморфных гомозигот с СД1, СД2 и МПАДВ ($OR_{СД1}=13,10$; $OR_{СД2}=12,88$; $OR_{МПАДВ}=14,69$).

Также следует отметить, что среди больных МПАДВ по сравнению с больными СД1 и СД2 чаще встречались гомозиготные носители мутации E23K гена *KCNJ11*. Достоверных различий по частоте генотипов среди больных СД1, СД2 и МПАДВ не выявлено (табл. 11).

На рис. 1 представлено распределение носительства полиморфизмов 49A/G гена *CTLA4* и C1858T

гена *PTPN22* больными с разными клиническими вариантами СД.

Показаны значимые межгрупповые различия распределения по генотипам 49A/G гена *CTLA4* и C1858T гена *PTPN22* ($\chi^2=23,485$; $df=16$; $p=0,000$). Попарное сравнение вариантов заболевания выявило значимость различий больных МПАДВ и СД 2 ($\chi^2=11,584$; $df=8$; $p=0,021$). Достоверных различий распределения больных по указанным полиморфизмам между группами МПАДВ и СД1, а также СД1 и СД2 выявлено не было ($\chi^2=4,859$; $df=8$; $p=0,302$; $\chi^2=4,438$; $df=8$; $p=0,350$ соответственно). Обнаружена значимо большая частота носительства гомозиготных генотипов GG/TT у больных МПАДВ по сравнению с таковой у больных СД 2 (8,65 и 1,67% соответственно; $\chi^2=4,425$; $p=0,035$).

Распределение больных СД по носительству полиморфизмов 49A/G гена *CTLA4* и E23K гена *KCNJ11* приведено на рис. 2.

Показаны значимые различия распределения клинических вариантов течения СД по генотипам

Таблица 9. Различия в частотах генотипов и аллелей полиморфизма 49A/G гена *CTLA4* у больных СД

Сравниваемые группы	Показатель	χ^2	p
СД1 — СД2	Генотип:		
	A/A	0,008	0,929
	A/G	0,166	0,684
СД1 — МПАДВ	G/G	0,458	0,498
	Генотип:		
	A/A	0,001	0,975
МПАДВ — СД2	A/G	0,698	0,403
	G/G	0,425	0,515
	Генотип:		
	A/A	0,011	0,915
	A/G	2,953	0,086
	G/G	3,834	0,049

Таблица 11. Различия в частотах генотипов и аллелей полиморфизма E23K гена *KCNJ11* у больных СД

Сравниваемые группы	Показатель	χ^2	p
СД1 — СД2	Генотип:		
	E/E	0,001	0,973
	K/E	0,001	0,982
СД1 — МПАДВ	K/K	0,017	0,897
	Генотип:		
	E/E	0,519	0,471
МПАДВ — СД2	K/E	1,027	0,311
	K/K	0,017	0,895
	Генотип:		
	E/E	0,478	0,489
	K/E	1,243	0,265
	K/K	0,088	0,767

Таблица 10. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма E23K гена *KCNJ11* у больных СД и здоровых жителей Харькова

Показатель	Контроль (n=44)		Больные		χ^2	p	OR (95% ДИ)
	абс.	%	абс.	%			
СД1 (n=47)							
Генотип:							
Е/Е	32	72,73	8	17,02	26,410	0,000	0,08 (0,02—0,12)
Е/К	9	20,45	16	34,04	1,479	0,224	2,01 (0,52—3,50)
К/К	3	6,82	23	48,94	17,743	0,000	13,10 (0,83—15,26)
СД2 (n=101)							
Генотип:							
Е/Е	32	72,73	19	18,81	36,744	0,000	0,87 (0,15—1,28)
Е/К	9	20,45	33	32,67	1,670	0,196	1,89 (0,57—3,06)
К/К	3	6,82	49	48,51	21,309	0,000	12,88 (2,88—15,44)
МПАДВ (n=83)							
Генотип:							
Е/Е	32	72,73	20	24,10	26,150	0,000	0,12 (0,03—0,91)
Е/К	9	20,45	20	24,10	0,059	0,808	1,23 (0,45—2,66)
К/К	3	6,82	43	51,82	23,285	0,000	14,69 (3,92—19,20)

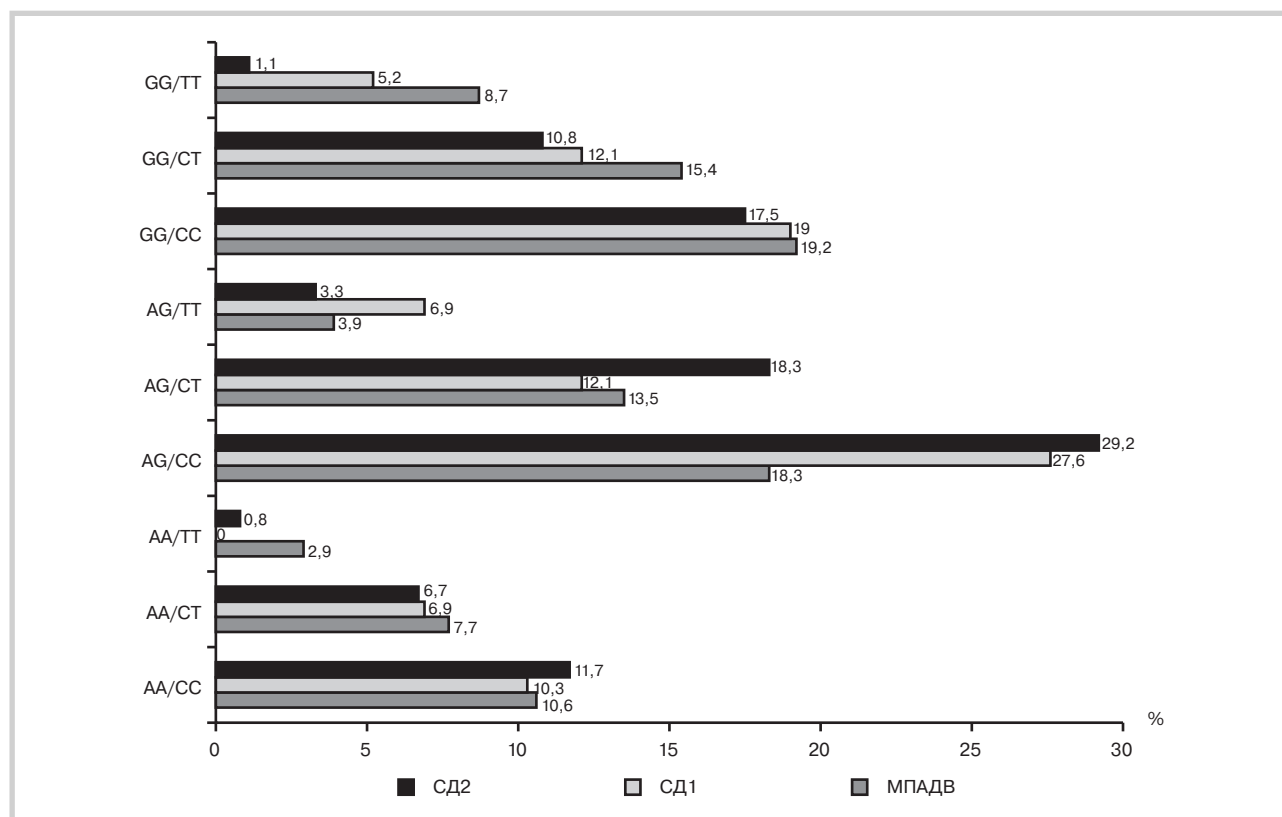


Рис. 1. Распределение полиморфизмов 49A/G гена *CTLA4* и C1858T гена *PTPN22* у больных разными клиническими вариантами СД.

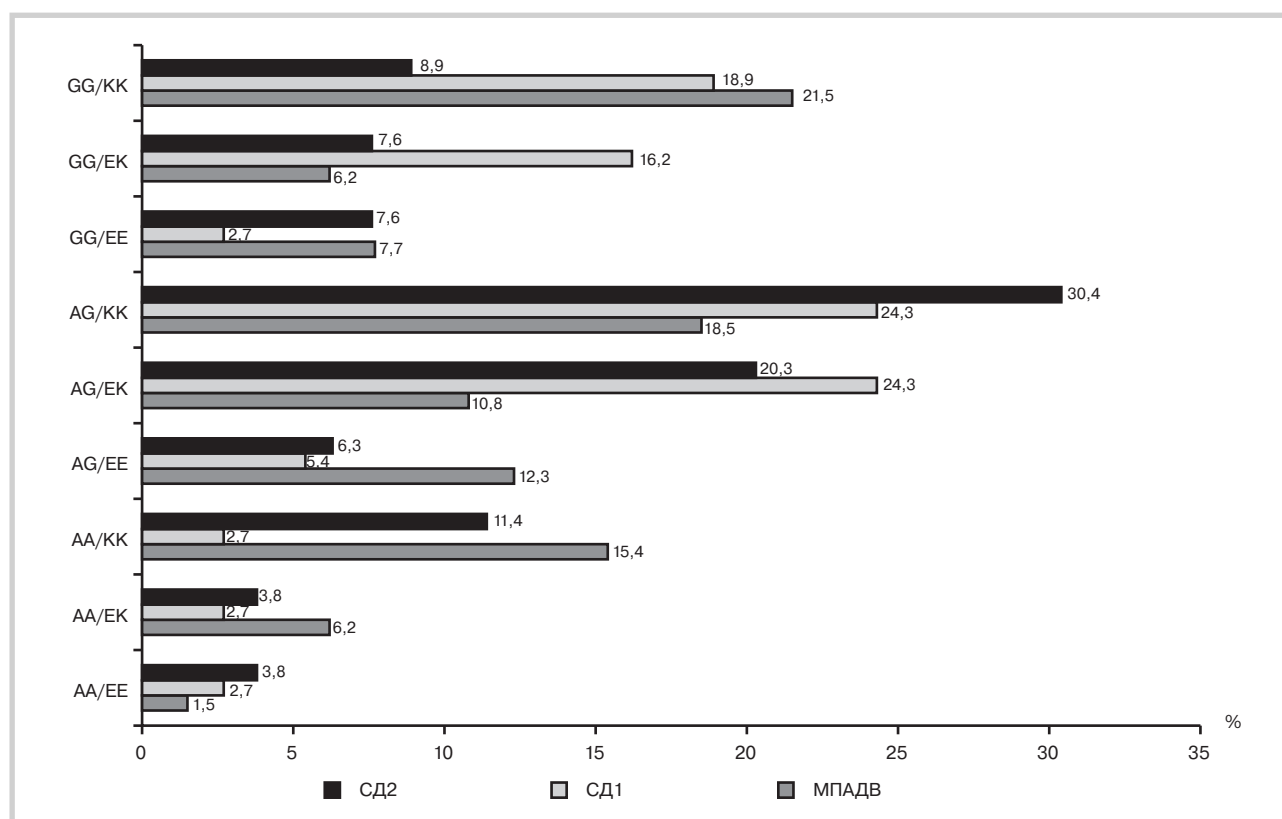


Рис. 2. Распределение полиморфизмов 49A/G гена *CTLA4* и E23K гена *KCNJ11* у больных разными клиническими вариантами СД.

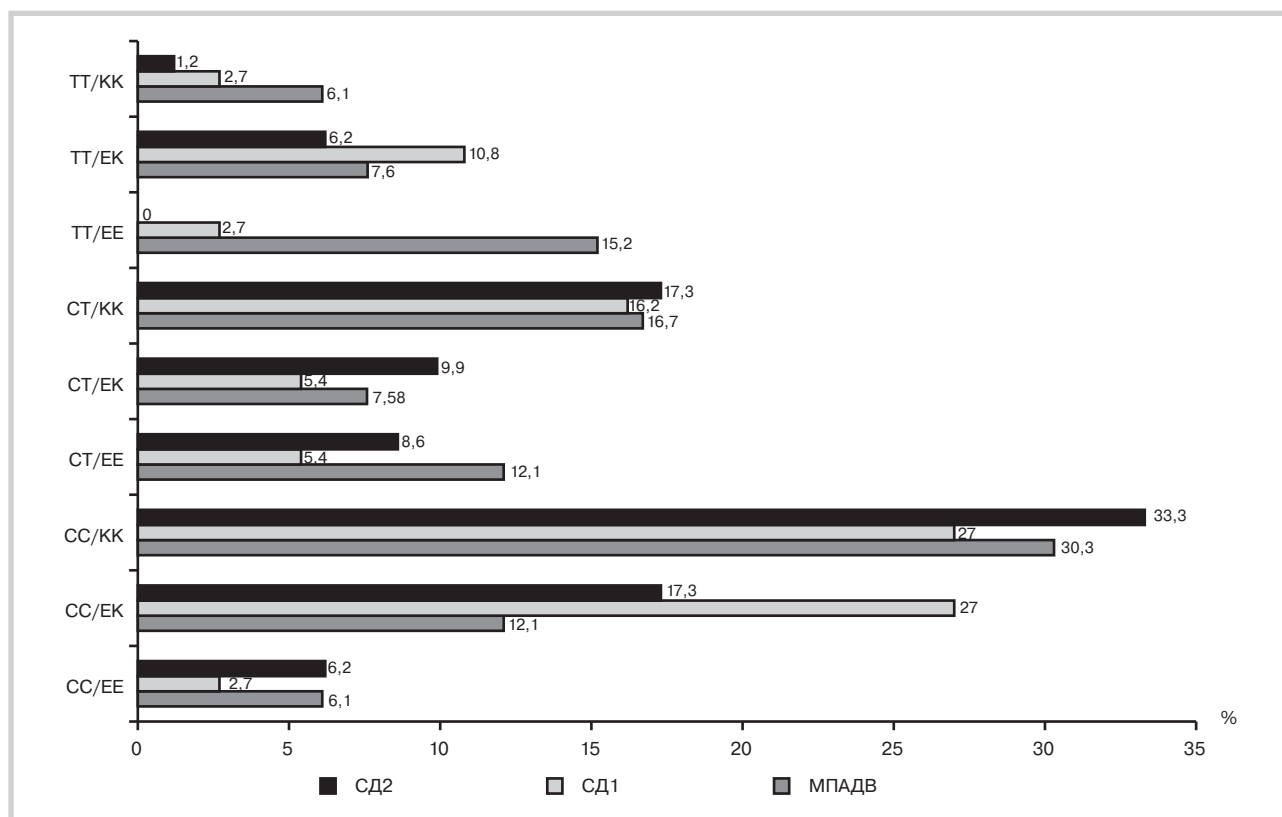


Рис. 3. Распределение полиморфизмов С1858Т гена *PTPN22* и Е23К гена *KCNJ11* у больных разными клиническими вариантами СД.

49А/Г гена *CTLA4* и Е23К гена *KCNJ11* ($\chi^2=19,978$; $df=16$; $p=0,000$). Парное сравнение групп больных СД выявило значимость различий между больными МПАДВ и СД1 ($\chi^2=12,065$; $df=8$; $p=0,017$); МПАДВ и СД2 ($\chi^2=10,976$; $df=8$; $p=0,027$). Достоверных различий в распределении больных СД1 и СД2 по вышеуказанным полиморфизмам выявлено не было ($\chi^2=7,859$; $df=8$; $p=0,097$). Обнаружена значимо большая частота встречаемости носительства гомозиготных генотипов GG/КК у больных МПАДВ по сравнению с таковой у больных СД2 (21,54 и 8,86% соответственно; $\chi^2=3,840$; $p=0,050$).

Показаны достоверные различия распределения больных с разным клиническими вариантами СД по генотипам С1858Т гена *PTPN22* и Е23К гена *KCNJ11* ($\chi^2=11,146$; $df=16$; $p=0,025$) (рис. 3). При этом парное сравнение групп больных не выявило достоверных различий распределения больных МПАДВ и СД2 по вышеуказанным генотипам ($\chi^2=5,233$; $df=8$; $p=0,264$). Не выявлено значимых различий распределения больных МПАДВ и СД1, а также больных СД1 и СД2 по указанным полиморфизмам ($\chi^2=5,928$; $df=8$; $p=0,205$; $\chi^2=6,303$; $df=8$; $p=0,178$ соответственно).

Показаны значимые различия в распределении больных разными клиническими вариантами забо-

левания по генотипам С1858Т гена *PTPN22*, 49А/Г гена *CTLA4* и Е23К гена *KCNJ11* ($\chi^2=56,923$; $df=46$; $p=0,000$) (рис. 4). Парное сравнение групп больных выявило значимые различия в распределении больных по носительству исследуемых полиморфизмов среди всех изучаемых групп: МПАДВ и СД1 ($\chi^2=21,773$; $df=23$; $p=0,000$); МПАДВ и СД2 ($\chi^2=19,341$; $df=23$; $p=0,000$); и СД1 и СД2 ($\chi^2=18,588$; $df=20$; $p=0,000$), что подтверждает генетическую самостоятельность всех этих форм СД.

Однако, если генетическая самостоятельность СД1 и СД2 доказана, причем выделены гены, обуславливающие предрасположенность к этим типам заболевания, то вопрос о генетической детерминации МПАДВ и причинах ее возникновения до настоящего времени открыт. В настоящее время предполагают, что МПАДВ является вариантом течения СД1 [4]. Проведенное нами молекулярно-генетическое исследование выявило генетическую самостоятельность МПАДВ, подтвердив изложенные выше результаты генетического и генетико-демографического анализов.

Отсутствие достоверных различий в изучаемых полиморфизмах у больных СД1 и СД2 полностью соответствуют результатам генетического анализа, свидетельствующего о наличии 59% общих генов в

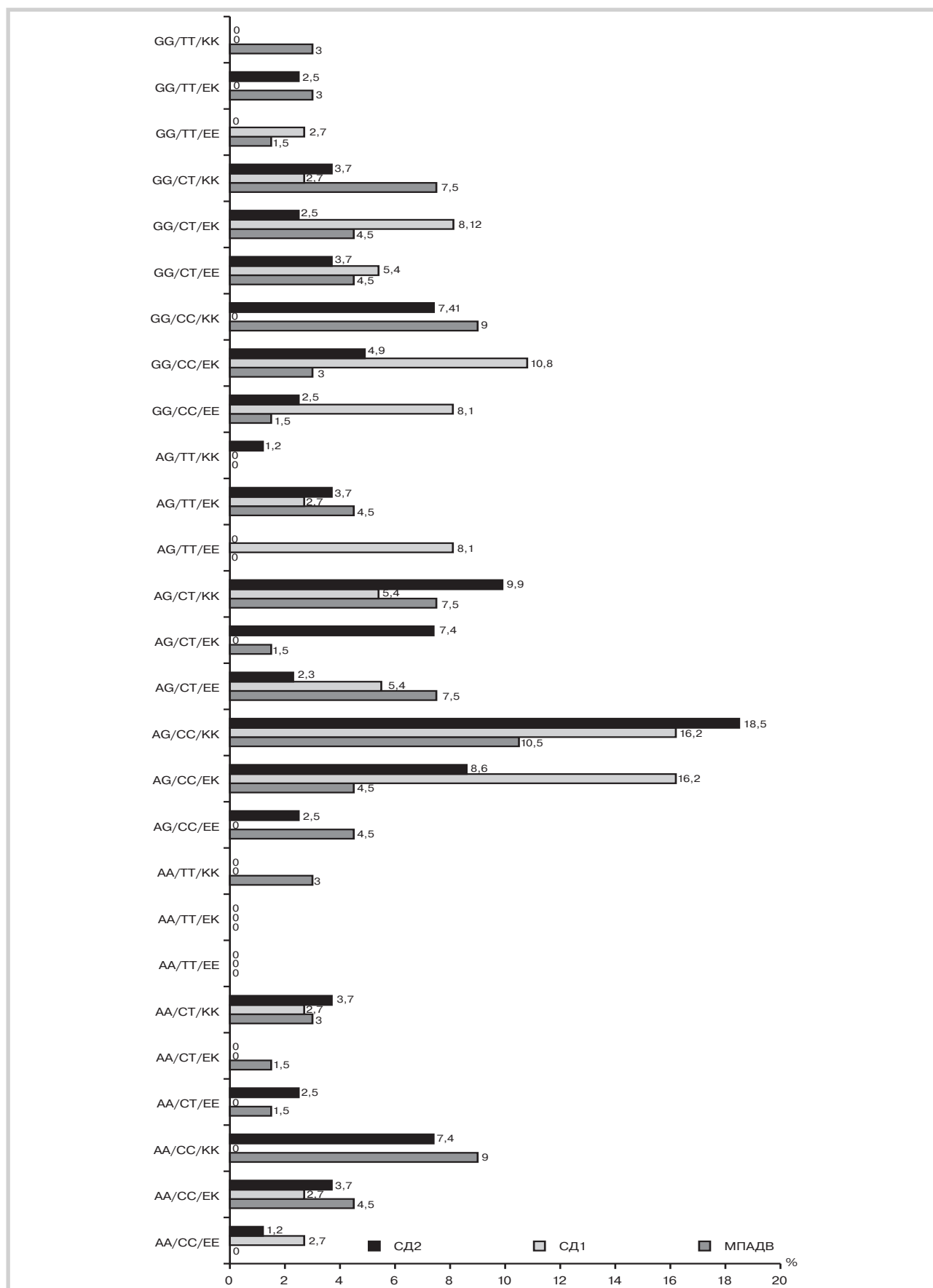


Рис. 4. Распределение полиморфизмов С1858Т гена *PTPN22*, 49А/Г гена *CTLA4* и Е23К гена *KCNJ11* у больных разными клиническими вариантами СД.

детерминации этих форм СД (см. табл. 3). Учитывая, что СД1 и СД2 являются полигенными заболеваниями, большое значение имеет комбинация генов. Снижение давления отбора против СД1, вызванное внедрением инсулинотерапии, положительная направленность отбора генов предрасположенности к СД2 типа привели не только к увеличению в популяции генов предрасположенности к СД1 и СД2, но и к возрастанию вариантов их комбинирования, что, в частности, и обусловило возникновение МПАДВ.

Заключение

Проведенное комплексное исследование с использованием методов генетического, генетико-демографического и молекулярного анализа выявило генетическую самостоятельность МПАДВ, что может служить основанием для уточнения классификации этой формы СД. Полученная модель наследования свидетельствует о том, что МПАДВ является генетически самостоятельной формой СД, описывается параметрами полигенной пороговой модели, в его наследовании существенная роль принадлежит наследственным факторам (57,62%), имеются нелинейные межлокусные и межallelные

($G_D=12,16\%$) взаимодействия и возможно влияние ряда генов с выраженным эффектом. В системе генетического контроля МПАДВ имеет примерно одинаковое количество общих генов с СД1 и СД2 (65,3 и 66,1% соответственно), что определяет особенности вариантов клинического течения этой формы диабета. Семейное накопление СД1 и СД2 среди родственников I и II степени родства больных МПАДВ разной СМ отличается от такового у больных СД1 и СД2. Носительство E23K гена *KCNJ11*, 49A/G гена *CTLA4* и C1858T гена *PTPN22* в харьковской популяции ассоциировано с МПАДВ, СД1 и СД2. Гомозиготное носительство 23K/K гена *KCNJ11*, 49G/G гена *CTLA4* и 1858T/T гена *PTPN22* соответствует наибольшему риску развития МПАДВ.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Штандель С.А., Тихонова Т.М.

Сбор и обработка материала — Штандель С.А., Тихонова Т.М.

Статистическая обработка данных — Штандель С.А.

Написание текста — Штандель С.А.

Редактирование — Тихонова Т.М.

ЛИТЕРАТУРА

- Pipi E, Marketou M, Tsirogianni A. Distinct clinical and laboratory characteristics of latent autoimmune diabetes in adults in relation to type 1 and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014;5(4):505-510.
doi: 10.4239/wjd.v5.i4.505.
- Nambam B, Aggarwal S, Jain A. Latent autoimmune diabetes in adults: A distinct but heterogeneous clinical entity. *World J Diabetes*. 2010;1(4):111-115.
doi: 10.4239/wjd.v1.i4.111.
- Laugesen E, Ostergaard JA, Leslie RD, et al. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet Med*. 2015;32(7):843-852.
doi: 10.1111/dme.12700.
- Turner R, Stratton I, Horton V, et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet*. 1997;350(9087):1288-1293.
doi: 10.1016/S0140-6736(97)03062-6.
- Дедов И.И., Никонова Т.В., Смирнова О.М., и др. "Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и механизмы гибели β -клеток при различных вариантах течения СД 1-го типа". // *Проблемы эндокринологии*. 2005;51:3:3-7. [Dedov II, Nikonova TV, Smirnova OM, et al. Role of cytokines in regulation of the immune answer and destruction mechanisms β -cells at various variants of the type 1 diabetes mellitus duration. *Probl Endocrinol (Mosk)*. 2005;51(3):3-7. (In Russ.)].
- Basile KJ, Guy VC, Schwartz S, Grant SF. Overlap of genetic susceptibility to type 1 diabetes, type 2 diabetes, and latent autoimmune diabetes in adults. *Curr Diab Rep*. 2014;14(11):550.
doi: 10.1007/s11892-014-0550-9.
- Li H, Isomaa B, Taskinen MR, et al. Consequences of a family history of type 1 and type 2 diabetes on the phenotype of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23(5):589-594.
PMID: 10834414.
- Алтухов Ю.П. "Генетические процессы в популяциях". М.: ИКЦ «Академкнига». 2003. [Altukhov YP. *Genetical processes in populations*. Moscow: ИКЦ «Academy book». 2003].
- Фогель Ф., Мотульски А.Г. "Генетика человека". Изд. 2-е. М.: Мир. 1990. [Vogel F, Motulsky AG. *Human Genetics*. 2nd Edition. Berlin — New York — Tokio: Springer-Verlagio 1990].
- Santos RL, Zillikens MC, Rivadeneira FR, et al. Heritability of fasting glucose levels in a young genetically isolated population. *Diabetologia*. 2006;49(4):667-672.
doi: 10.1007/s00125-006-0142-6.
- Mccarthy MI, Froguel P, Hitman GA. The genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus: tools and aims. *Diabetologia*. 1994;37(10):959-968.
doi: 10.1007/bf00400458.
- Frayling TM, Maccarthy MI. Genetic studies of diabetes following the advent of the genome-wide association study: where do we go from here? *Diabetologia*. 2007;50(11):2229-2233.
doi: 10.1007/s00125-007-0825-7.

13. Абрамов Д.Д., Дедов И.И., Трофимов Д.Ю., и др. "Полиморфизм гена CTLA4 (49A/G) в русской популяции у больных СД 1-го типа и здоровых доноров". //Сахарный диабет. 2007;10:3:2-3. [Abramov DD, Dedov II, Trofimov DY, et al. Polimorfizm gena CTLA4 (49A/G) v russkoy populyatsii u bol'nykh sakharnym diabetom 1 tipa i zdorovykh donorov. *Diabetes mellitus*. 2007;10(3):2-3. (In Russ.)].
doi: 10.14341/2072-0351-5989.
14. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*. 2004;36(4):337-338.
doi: 10.1038/ng1323.
15. Li YY. The KCNJ11 E23K gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population: a meta-analysis of 6,109 subjects. *Mol Biol Rep*. 2013;40(1):141-146.
doi: 10.1007/s11033-012-2042-9.
16. "Методология семейных исследований генетических факторов. Доклад науч. Группы ВОЗ: Серия техн". //Докл. ВОЗ. 1972;(466):5-8. [*Methodology of family researches of genetic factors*. The report of science group of the WHO: a Series of technical reports of the WHO. 1972;(466):5-8].
17. Беневоленская Л.И., Финогенова С.А., Алексеева Л.И., Эрдес Ш. "Исследование генетической детерминации ревматоидного артрита". //Генетика. 1991;27:1:138-146. [Benevolenskaya LI, Finoghenova SA, Alekseeva LI, Erdes S. Research of genetical determination of the Rheumatoid Arthritis. *Genetics*. 1991;27(1):138-146. (In Russ.)].
18. Morton ME, Chang CS, Mi MP. *Genetics of interracial crosses in Hawaii*. Kargen Basel. 1967.
19. Bla Bland JM. Statistics Notes: The odds ratio. *BMJ*. 2000;320(7247):1468.
doi: 10.1136/bmj.320.7247.1468.
20. Лакин Г.Ф. "Биометрия". // М.: Высшая школа. 1990. [Lakin GF. 1972;(466):5-8. [*Methodology of family researches of genetic factors*. The report of science group of the WHO: a Series of technical reports of the WHO. 1972;(466):5-8].