

На правах рукописи

СОРОКИНА ЮЛИЯ АНДРЕЕВНА

**ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТФОРМИНА
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Ловцова Любовь Валерьевна

Официальные оппоненты:

Данилец Марина Григорьевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», отдел экспериментальных биологических моделей, заведующая отделом, заместитель директора по развитию биомоделирования

Смирнова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эндокринологии и клинической фармакологии, заведующая кафедрой

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2016 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, г. Томск, пр. Ленина, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (адрес сайта: pharmso.ru)

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Амосова Евдокия Наумовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сахарный диабет (СД) в XXI веке приобрел статус неинфекционной эпидемии [Дедов И.И., Шестакова М.В., 2013, 2014]. Темп прироста распространенности неуклонно растет. По предварительным подсчетам Международной федерации диабета к 2025 году сахарным диабетом будет страдать 380 млн. жителей планеты. При этом 95% из них – пациенты с СД 2 типа [Аметов А.С., 2011]. Одна из причин прогрессирования СД 2 типа – хроническая гипергликемия в сочетании с вариабельностью гликемии, что приводит к окислительному стрессу [Балаболкин М.И., 2002; Аметов А.С. 2011; Monnier 2006, 2009; Zaccardi F. et al, 2009]. Основными процессами окислительного стресса являются перекисное окисление липидов и окислительная модификация белков [Дубинина Е.Е. с соавт. 1995, Ланкин В.З. и соавт., 2008; Владимиров Ю.А, 2009]. Мишенями окислительного стресса являются все клеточные структуры. В зоне высокого риска находится инсулиновый аппарат поджелудочной железы, так как β – клетки содержат мало антиоксидантов [Смирнова О.М., Т. В. Никонова, 2003, Недосугова Л.В., 2006; Аметов А.С., 2011]. Доказано, что окислительный стресс и дисгликемия лежат в основе развития и прогрессирования заболевания [Baynes J. W., 1991, 1996; Brownlee, M. 2001; Ляйфер А. И., 1993; Балаболкин М. И., 2000, 2005; Недосугова Л. В, 2006; Ланкин В. З., Тихазе А. К., Кумскова Е. М., 2008, 2009; Занозина О.В., 2010]. Следовательно, кроме сахароснижающего действия, у препаратов, используемых при сахарном диабете 2, должны быть и плеотропные свойства, для оптимальной коррекции имеющихся нарушений [Балаболкин И. И., 2005; Смирнова О. М., 2010; Аметов А. С., 2011].

В настоящее время самым назначаемым пероральным сахароснижающим препаратом во многих странах мира является метформин [DeFronzo R.A., 2007]. Согласно рекомендациям Международной диабетической федерации, с 2005 г. метформин является препаратом первой линии фармакологического лечения СД 2 типа, а в 2006 г. вышли рекомендации Американской диабетической ассоциации и Европейской ассоциации по изучению диабета, где метформину отводится главная роль на старте терапии больных СД 2 типа [Демидова Т.Ю., Дроздова И.Н., 2015]. Механизмы сахароснижающего действия метформина достаточно изучены и появились новые данные об этом известном препарате [Смирнова О. М., 2010; Бондарь И. А., Климонтов В. В., 2010; Александров А.А., 2012, Демидова Т.Ю., Дроздова И.Н., 2015]. Доказана способность метформина ограничивать образование молекулярных продуктов ПОЛ и стимулировать их выведение. [Недосугова Л.В., 2006; Piro S. et al., 2012]. Возможность влияния метформина на антиоксидантную систему и свободно-радикальное окисление отмечено рядом авторов [Pavlovic D. et al., 2000; Formoso G. et al., 2008; Esteghamati A. et al. 2013]. В последнее время появились данные о новых свойствах метформина, а именно о возможном использовании препарата как в качестве

потенциального геропротектора [Анисимов В.Н., 2003], так и для профилактики и лечения опухолей у больных СД 2 типа [Берштейн Л.М. с соавт., 2013, 2015; Natoum D. et al., 2015]. Особое внимание уделяется генетико-биохимическому механизму реализации этих эффектов. Проблема индивидуальной чувствительности к лекарственным средствам стала актуальной с развитием фармакогенетики [Серединин С. Б., Вальдман Е. А., 2003]. Появились данные о том, что на эффективность метформина оказывают влияние генетические факторы и наследственность [Zhou K et al., 2014]. На данный момент уже с большой точностью определены полиморфные гены, ответственные за сахароснижающую эффективность метформина [Todd J.N., Florenz J.C., 2014; Emami-Riedmaier A. et al., 2015]. Все больший интерес вызывают полиморфизмы генов, участвующих как в фармакокинетике, так и в фармакодинамике пероральных сахароснижающих препаратов. Вместе с тем, данные о полиморфизме генов - мишеней для метформина и многих других препаратов неоднозначны. Такие многоцентровые исследования, как GWAS, GoDARTS, SUGAR-MGH, FUSION, посвященные ассоциациям генов с развитием СД 2 типа, фармакогенетике внесли существенный вклад в изучение генов-мишеней, как непосредственно участвующих в патогенезе СД 2 типа, так и в фармакокинетике и фармакодинамике лекарственных препаратов [Jablonski K.A. et al., 2009; Zhou K. et al., 2009; Ткас I. et al, 2014; Todd J.N., 2014; Бондарь И. А., Шабельникова О. Ю., 2013]. Большой интерес могут представлять однонуклеотидные полиморфизмы полиморфизмы генов эндотелиальной синтазы оксида азота, белка p53 и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы, последний является общепринятым маркером выраженности генетических повреждений и окислительного стресса [Часовских Н.Ю., 2009].

Степень разработанности темы. В многочисленных исследованиях были доказаны как сахароснижающие, так и антиоксидантные свойства метформина. Была выявлена способность метформина тормозить образование конечных продуктов гликозилирования, связывать альфа-оксоальдегиды метилглиоксаль и глиоксаль, стимулировать антиоксидантную защиту независимо от сахароснижающего эффекта, снижать уровень системного воспаления. Метформин связывается с малоновым диальдегидом вместо молекул таких аминокислот, как лизин, аргинин, цистеин [Beisswenger P. et al., 1999; Chakraborty, A., 2011; Недосугова Л.В, 2006; Демидова Т.Ю., 2015]. Выявлена способность метформина связывать и выводить ассиметричный диметиларгинин, который является фактором развития сердечнососудистых заболеваний у больных СД 2 типа [Bestermann, W.H. Jr, 2011]. Предполагается, что длительный прием метформина снижает вероятность повреждения ДНК [Анисимов В.Н., 2003; Nakamura M., 2014]. При этом механизмы противоопухолевого эффекта могут быть разными, связанными с АМФактивированной–киназой, экспрессией генов, модуляцией ответа клеток, апоптозом [Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., 2009]. Л.М. Берштейн с соавт. (2014) показали зависимость антионко-

генной активности метформина от так называемых «метформинположительных» полиморфных генов, в том числе, участвующих в защите генетического материала от повреждающего действия окислительного стресса. Имеются противоречивые сведения о роли однонуклеотидных полиморфизмов генов эндотелиальной синтазы оксида азота, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы и белка p53 в патогенезе и прогрессировании СД 2 [Gaulton K.J et al., 2008; Jablonski K.A. et al., 2009; Daimon M. et al., 2009]. Выключение гена эндотелиальной синтазы оксида азота в эксперименте приводит не только к резкому повышению сосудистого тонуса, но и нарушению захвата глюкозы периферическими тканями, так как доказано, что утилизация глюкозы NO-зависима [Miranda J.A. et al., 2013]. Информация об участии гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы в реализации фармакологического ответа на метформин единичная [Берштейн Л.М. с соавт., 2014], а данных по влиянию полиморфизмов генов эндотелиальной синтазы оксида азота и белка p53 на эффективность приёма бигуанида в доступной литературе не найдено. Таким образом, вопрос об участии данных полиморфных генов в формировании фармакологического ответа на метформин остается открытым.

Цель исследования – изучение влияния препарата метформин на некоторые метаболические показатели, липопероксидацию и окислительную модификацию белков, антиоксидантную систему с учетом гаплотипа однонуклеотидных полиморфизмов генов эндотелиальной синтазы оксида азота, 8-оксогуанин-ДНК-гидроксилазы и белка p 53 у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа.

Задачи исследования:

1. Сравнить показатели гликемии, липидного профиля, системного воспаления и окислительного стресса у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с показателями у лиц без нарушения углеводного обмена.

2. Провести генетическое типирование пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа и лиц без нарушения углеводного обмена по однонуклеотидным полиморфизмам генов эндотелиальной синтазы оксида азота (rs 2070744), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs1052133) и белка p53 (rs1042522).

3. Оценить динамику показателей гликемии, липидного профиля, системного воспаления у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с учетом генотипа однонуклеотидных полиморфизмов генов эндотелиальной синтазы оксида азота (rs 2070744), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs1052133) и белка p53 (rs1042522) при применении препарата метформин.

4. Оценить динамику показателей окислительного стресса у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с учетом генотипа однонуклеотидных полиморфизмов генов эндотелиальной синтазы оксида азота (rs 2070744), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs1052133) и белка p53 (rs1042522) при применении препарата метформин.

Методология и методы исследования. Исследование проводилось в 2012-2015 гг. Основными объектами исследования являлись некоторые показатели гомеостаза у лиц без нарушения углеводного обмена, а также у пациентов с сахарным диабетом 2 типа при применении препарата метформин, и однонуклеотидные полиморфизмы генов.

Дизайн исследования согласуется с принципами надлежащей клинической (ГОСТР 52379-2005) и лабораторной (ГОСТ Р-53434-2009) практики. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и была одобрена Локальным этическим комитетом ГБУЗ НО «НОКБ им. Н. А. Семашко» (Протокол №10 от 29.11.2012). Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом клинического материала, однородностью выборки субъектов, применением современных методов исследования и адекватных методов биомедицинской статистики, теоретическим обоснованием полученных данных. Материалы и основные положения диссертации доложены на I международной конференции «Процессы самоорганизации в высыхающих каплях многокомпонентных жидкостей: эксперименты, теории, приложения» (Астрахань, 2010); научно – практической конференции с международным участием «Терапевтическая школа С.П. Боткина и ее вклад в развитие отечественной клинической медицины» (Санкт – Петербург, 2012); I Всероссийской XII Ежегодной научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2013); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова (Ярославль, 2013); XX Российском национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013); II Международной научно-практической Интернет-конференции «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы» (2013); VI Всероссийском диабетологическом конгрессе «Сахарный диабет в XXI веке - время объединения усилий» (Москва, 2013); XVIII Нижегородской сессии молодых ученых «Естественные, математические науки» (Нижний Новгород, 2013); II Съезде терапевтов Приволжского федерального округа VIII Общероссийского медицинского форума в рамках программы «Дни диабета в Приволжском федеральном округе» (Нижний Новгород, 2013); 66-ой ежегодной научной студенческо-аспирантской конференции биологического факультета ННГУ им Н.И. Лобачевского «Биосистемы: Организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2013); VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине»

(Новосибирск, 2013); Второй международной конференции «Новейшие достижения в науке и технологии» (Лондон, 2014); VIII Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Киев, 2014); II Всероссийском Конгрессе «Инновационные технологии в эндокринологии» с участием стран СНГ (Москва, 2014); XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014). Лауреат Премии Нижнего Новгорода 2015г.

Личное участие автора. Исследователем проведена самостоятельная работа с источниками отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, обобщение данных, оформление в виде обзора литературы; освоение методик и участие в выполнении лабораторных анализов в соответствии с дизайном исследований; формирование базы данных, статистическая обработка полученного материала; написание и публикация статей, участие в научно-практических конференциях, конгрессах регионального, общероссийского и международного уровня. Кроме того, исследователем лично проводился контроль за соблюдением дизайна исследования, организация забора, подготовка к транспортировке и доставка образцов крови в лаборатории, осуществлялся постоянный контакт с врачами-эндокринологами, назначавшими терапию и контролировавшими состояние больных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Частоты встречаемости гаплотипов полиморфных генов эндотелиальной синтазы оксида азота, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы и белка p53 в группе больных сахарным диабетом 2 типа и в группе без диабета статистически значимо не отличаются.

2. Наличие гаплотипов CC и CT полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), CC полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и CC полиморфизма гена белка p53 (rs 1042522) прогнозируют эффективную терапию препаратом метформин у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа.

3. Наличие гаплотипов CC и CT полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), CC полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и CC и CG полиморфизма гена белка p53 (rs 1042522) прогнозируют эффективность метформина в отношении ограничения процессов окислительного стресса у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа.

Научная новизна исследования.

Показана значительная интенсификация процессов окислительной модификации белков у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа и уровнем гликированного гемоглобина 6,5 – 8,0%, предложен коэффициент для определения насыщенности процессов перекисного окисления липидов: отношение малонового диальдегида к сумме диеновых и триеновых конъюгатов.

Впервые показано, что частота гаплотипов однонуклеотидных полиморфизмов 3 генов (эндотелиальной синтазы оксида азота, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы и белка p53) у больных с сахарным диабетом 2 типа не отличается от таковой в общей популяции.

Получены приоритетные данные о том, что наличие гаплотипов CC и CT полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744) прогнозирует значимую эффективность сахароснижающей активности метформина в качестве монотерапии. Заявка на изобретение № 2015151884 от 03.12.2015.

Впервые показано, что наличие гаплотипа CC полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и CC полиморфизма гена белка p53 (rs 1042522) также прогнозируют значимую эффективность сахароснижающей активности метформина в качестве монотерапии.

Впервые показано, что наличие гаплотипа CC и CT полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), CC полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и CC и CG полиморфизма гена белка p53 (rs 1042522) прогнозирует эффективность метформина в отношении ограничения процессов окислительного стресса.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обоснована необходимость определения фенотипа пациента с целью прогнозирования оптимального ответа на фармакотерапию препаратом метформин.

Данные, полученные в исследовании, могут быть использованы для разработки персонализированной фармакотерапии сахарного диабета 2 типа. По результатам исследования присуждено звание «Лауреат Премии Нижнего Новгорода 2015».

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр общей и клинической фармакологии, госпитальной терапии им. В. Г. Вогралика Нижегородской государственной медицинской академии, в обучающий процесс терапевтов, эндокринологов Нижегородской области.

По материалам диссертационного исследования получен патент на изобретение №2478958 «Способ диагностики декомпенсации сахарного диабета 2 типа».

Получено уведомление о поступлении заявки на изобретение № 2015151884 от 03.12.2015 «Способ прогнозирования течения и эффективности терапии больных сахарным диабетом 2 типа».

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 29 печатных работ, 8 из которых в журналах, включенных ВАК Минобрнауки России в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата медицинских наук».

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, 2-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, включающего 183 источника, из них 67- отечественных и 116 - иностранных авторов. Работа иллюстрирована 42 таблицами, 11 рисунками.

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам ГБОУ ВПО НижГМА МЗ РФ, ГБУЗ НО «НОКБ им.Н.А. Семашко», НИИ молекулярной биологии и региональной экологии НГУ им. Н.И. Лобачевского: проф. Боровкову Н.Н., проф. Бояриновой Л.Г., Рунову Г.П., проф. Щербатюк Т.Г., доц. Новикову Д.В., Яшановой М. И.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Работа выполнена на базе кафедры общей и клинической фармакологии Нижегородской государственной медицинской академии, с использованием клинической базы ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко», а также лабораторий ГБОУ ВПО НижГМА, НИИ молекулярной биологии и региональной экологии НГУ им. Н.И. Лобачевского, по плану, составленному соискателем под контролем научного руководителя. Назначение препарата, наблюдение за пациентами в процессе терапии проводили лечащие врачи эндокринологического отделения ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко». Проведение данного исследования было одобрено Локальным этическим комитетом ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко» (*№10 от 29.11.2012*). Участники исследования были ознакомлены с целью и дизайном исследования и ими были подписаны информированные согласия на участие.

В первой главе диссертации проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Акцентируется внимание на вкладе окислительного стресса в прогрессирование сахарного диабета 2 типа и роли полиморфных генов в регуляции фармакологического ответа на пероральные сахароснижающие препараты, в частности метформин. Приведены результаты исследований в области изучения фармакодинамики и фармакокинетики метформина.

Во второй главе представлены материалы и методы для решения поставленных задач. Обследовано 169 человек, в том числе 89 пациентов с сахарным диабетом 2 типа и 80 лиц из группы сравнения. Пациентам с СД 2 типа (89 человек) был назначен метформин в дозе по 850 мг 2 раза в сутки. В группу сравнения (80 человек) вошли лица без нарушений углеводного обмена (Таблица 1). Оценка результатов исследования проводилась по группам гаплотипов полиморфных генов: rs2070744 гена эндотелиальной синтазы оксида азота (CC; CT; TT), rs 1052133 гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (CC;CG), гена белка p53 (CC;CG;GG). Через 3 месяца назначенной медикаментозной терапии проводилось повторное обследование.

В исследовании участвовали только лица, отвечающие критериям включения: верифицированный диагноз сахарный диабет 2 типа давностью не

более 1 года, отсутствие ранее проводимой сахароснижающей терапии, пациенты обоих полов, возраст от 40 до 70 лет, гликированный гемоглобин от 6,5 до 8,0%, индекс массы тела до 40 кг/м², подписанное добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения: сахарный диабет 1 типа, нарушенная толерантность к глюкозе и нарушение гликемии натощак, наличие тяжелых осложнений СД 2 типа, нарушенная функция печени, почек и сердечно – сосудистой системы, хронические заболевания в стадии обострения, несоответствие критериям включения. Критерии досрочного прекращения участия в исследовании: отсутствие приверженности к терапии, проявление побочных эффектов метформина, отзыв информированного согласия.

Таблица 1 – Характеристика групп субъектов исследования, (Me[25p;75p])

| Показатель | Группа обследованных | |
|----------------------|----------------------|--|
| | СД 2 типа (n=89) | Лица без нарушений углеводного обмена (n=80) |
| Возраст, лет | 54,00 [49,00;57,00] | 51,31 [45,50;55,50] |
| Мужчины : Женщины | 42:47 | 44:36 |
| HbA _{1c} ,% | 7,47 [6,90;8,00] | 5,10 [4,90;5,35] |
| ИМТ | 32,00 [25,00;34,00] | 30,05 [28,70;31,70] |

Примечание: – HbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, ИМТ – индекс массы тела.

Препаратом метформина, используемого в исследовании, был выбран Глюкофаж (Nuscomed). Форма выпуска - таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 850 мг, 60 таблеток в упаковке.

Для каждого пациента и лиц из группы сравнения была создана и заполнена индивидуальная карта. При проведении терапии метформином проводился обязательный контроль комплаентности пациентов, и ее уровень поддерживался в границах 80-120%.

Объектом изучения была цельная кровь и плазма крови пациентов. Уровень глюкозы плазмы натощак (ГПН) определяли в капиллярной крови глюкозооксидазным методом на анализаторе «Биосен 5030», на глюкометрах «Акучек Актив» натощак и выражали в ммоль/л.

Гликозилированный гемоглобин (HbA_{1c}) определяли на жидкостном хроматографе Bio-Rad со стандартными наборами (France). Уровень С-пептида оценивали с помощью диагностических иммуноферментных тест-систем «Merckodia C-peptide ELISA specific».

Исследование липидного профиля, фибриногена, церулоплазмينا, гаптоглобина, С-реактивного белка проводили с помощью анализатора CONELAB 20 (Финляндия).

Анализ показателей окислительного стресса осуществлялся в день забора материала. Показатели определяли методом индуцированной хемилюминесценции на аппарате БХЛ-07. Интегральную интенсивность индуцированной хемилюминесценции (I_{max}, мВ) и общую антиоксидантную активность (ОАА, отн.ед.), S - светосумма хемилюминесценции за определенное

время, обратно пропорциональна антиоксидантной активности (ОАА) пробы. Измеряли $tg\alpha_2$, который отражает напряженность АОС.

Молекулярные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) плазмы крови (диеновые конъюгаты (ДК), триеновые конъюгаты (ТК), малоновый диальдегид (МДА) определяли спектрофотометрическим методом. Измеряли в ед. опт.пл/ г.ол.

Для определения окислительной модификации белков (ОМБ) был использован метод, предложенный Levine (1990) в модификации метода Е.Е. Дубининой (1995). Оценивали ОМБ по уровню карбонильных производных, выявляемых в реакции с 2,4 – динитрофенилгидразином: альдегид-динитрофенилгидразоны (АДФГ) и кетон-динитрофенилгидразоны (КДФГ). Анализировали спонтанную окислительную модификацию белков. Оптическую плотность образовавшихся соединений регистрировали при длинах волн 270 и 363 нм, измерение проводили в отн. ед. Для расчета применяли коэффициент молярной экстинкции $22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) использовали метод, разработанный М. Nishicimi, в адаптации Е. Е. Дубининой с соавт. (1995). Исследование активности каталазы (КАТ) выполняли с помощью метода, разработанного Y. Aebi, в адаптации М.А. Королук с соавт. (1988), С. Чевари с соавт. (1991). Активность выражали в ед. активности на мг гемоглобина в минуту (ед. акт./мг Нб мин).

Измерения проводили на спектрофотометре Genesis 10UV (Thermospectronic, USA).

Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) гена синтазы окиси азота 3 eNOS3 (C786T) выявляли методом ПЦР с детекцией в реальном времени. ОНП 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 Ser326Cys и ОНП p53 TP53 (Pro72Arg) определяли методом ПЦР с электрофорезом в агарозном геле. При электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле использовали камеры «SE-2» («Хеликон») и источник питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») с комплектом реагентов «ЭФ» вариант генотип-200 (агароза и трис-боратный буфер с бромидом этидия), видеосистемой с цифровой камерой для регистрации результатов и передачи изображения («Биотест-1»). Все анализы были проведены с использованием диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-ЭКСПРЕСС» производства ООО Научно-производственной фирмы «Литех», Россия. С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Использовали амплификатор детектирующий ДТпрайм по ТУ 9443- 004-96301278-2010 в модификации 5М. Для расчета отношения шансов использовался сертифицированный калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль» ГенЭксперт (онлайн http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

Полученные в ходе исследования результаты обработаны с помощью общепринятых методов статистики на компьютере с использованием пакета

прикладных программ для обработки медицинской и биологической информации «STATISTICA 10.0» (v10.0.228.8 STA999K347150-W StatSoft, Inc., США).

В третьей главе представлены результаты исследования и обсуждение результаты исследования профиля пациентов с впервые выявленным с СД 2 типа.

Показатели гликемии, липидного профиля и системного воспаления

Пациенты с впервые выявленным СД 2 типа соответствовали критерию включения (HbA_{1c}). Уровни С-пептида в основной группе и в группе сравнения статистически значимо не различались. У пациентов с впервые выявленным СД 2 типа без тяжелых осложнений имеется нарушение липидного профиля, а именно – более низкий уровень антиатерогенной фракции липопротеинов – ЛПВП ($p=0,026$), более высокое содержания триглицеридов (на 78%, $p=0,040$) и атерогенный индекс (на 60%, $p=0,001$), чем у лиц группы сравнения. По другим исследованным показателям липидного обмена и показателям системного воспаления статистически значимых различий между основной группой и группой сравнения не выявлено.

Показатели окислительного стресса

По нашим данным, активация свободно-радикального окисления присутствует даже при недлительно текущем СД 2 типа при уровне гликированного гемоглобина от 6,5% до 8,0%. Показатель I_{max} в этой группе больных статистически значимо увеличен на 10% ($p=0,038$), а общая антиоксидантная активность (ОАА) практически не изменена относительно группы сравнения. Таким образом, данные подтверждают результаты других исследований о запуске «порочного круга» окислительных реакций даже при функционировании антиоксидантной системы, и компенсация усиленного окислительного стресса не происходит, по-видимому, вследствие истощения запасов антиоксидантной системы [Балаболкин М.И., 2004; Недосугова Л.В., 2006; Занозина О. В, 2010]. Нами показано, что у больных с впервые выявленным СД 2 типа активность супероксиддисмутазы (СОД) снижена на 18 % ($p=0,027$), а активность каталазы (КАТ) не отличается от таковой у лиц без диабета, уровень церулоплазмينا снижен на 39% ($p < 0,001$) при одновременном увеличении содержания гаптоглобина в крови на 31% ($p=0,009$) относительно группы сравнения. Состояние неферментативной системы антиоксидантов у пациентов с СД 2 типа свидетельствует о том, что сформировался дисбаланс про- и антиоксидантных реакций, о чем свидетельствует повышенное отношение гаптоглобина к церулоплазмину на 114% ($p=0,035$).

Окислительная модификация белков (ОМБ) признается в настоящее время одним из ранних маркеров поражений ткани при свободно-радикальном окислении (СРО) [Дубинина Е.Е., 2000, Щербатюк Т. Г., 2000]. По нашим данным, у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа относительно группы сравнения статистически значимо повышено содержание ран-

них и поздних маркеров окислительной деструкции белка в покое (АДФГс - на 60% ($p=0,032$), КДФГс - на 50% ($p<0,01$) соответственно).

Согласно теории «памяти липидов» [Губский Ю.И с соавт., 2005], окисленно модифицированные белки инициируют генерацию радикалов, вследствие чего возрастает уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). При оценке содержания молекулярных продуктов ПОЛ оказалось, что содержание диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) у больных СД 2 типа также статистически значимо превышает содержание аналогичных показателей у лиц группы сравнения (на 73%, $p=0,021$ и в 2 раза, $p=0,001$ соответственно). Анализ коэффициента насыщенности ПОЛ (МДА/ДК+ТК) показал, что у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа и уровнем гликированного гемоглобина от 6,5 до 8% данный коэффициент увеличен в 4,26 раза ($p=0,004$) относительно лиц группы сравнения.

При изучении частоты встречаемости гаплотипов однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (C786T rs 2070744), 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (Ser326Cys rs10052133 C977G), однонуклеотидного полиморфизма (Pro72Arg rs1042522 C215G) гена белка p53 не выявлено статистически значимого различия по сравнению с лицами без нарушения углеводного обмена.

По гендерному составу, возрасту, индексу массы тела, наличию сопутствующих заболеваний представители гаплотипов внутри ОНП в целом сопоставимы. После распределения результатов первичного исследования пациентов с СД 2 типа по группам гаплотипов изученных полиморфных генов был сделан вывод о том, что большинство исследованных показателей не отличались между гаплотипами внутри одного ОНП. Однако представители СС гаплотипа ОНП гена синтазы оксида азота 3 имели статистически значимо более низкий уровень гликогемоглобина, а у носителей ТТ гаплотипа ОНП гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы и СС гаплотипа ОНП гена белка p53 отмечалась пониженная активность супероксиддисмутазы.

В четвертой главе диссертации представлена динамика исследуемых показателей у пациентов с СД 2 типа с различным гаплотипом при применении препарата метформин.

Динамика показателей при применении метформина в зависимости от однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота

После 3 месяцев применения метформина уровень гликированного гемоглобина и глюкоза плазмы натощак снизились статистически значимо во всех подгруппах обследованных. У представителей гомозиготы по аллелю 2 (ТТ) уровень С-пептида значимо снизился, в то время как в подгруппах СС и СТ данный показатель статистически значимо возрос (Таблица 2).

Таблица 2 - Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Ме [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|---|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | СС (0,133) | СТ (0,284) | ТТ (0,583) |
| НbA _{1с} до начала терапии, % | 6,90 [6,70;7,30] | 7,70 [7,10;7,85] | 7,40 [7,00;8,00] |
| НbA _{1с} через 3 месяца терапии, % | 5,80 [5,00;6,90]* p=0,035 | 6,95 [6,50;7,70]* p=0,0268 | 6,60 [6,30;7,60]* p=0,0265 |
| ГПН до начала терапии, ммоль/л | 7,70 [7,35;8,05] | 7,90 [6,60;9,00] | 8,05 [6,20;10,00] |
| ГПН через 3 месяца терапии, ммоль/л | 6,30 [6,00;7,40]* p=0,014 | 6,90 [6,50;8,00]* p=0,028 | 7,30 [5,40;8,60]* p=0,01 |
| С-пептид до начала терапии, нг/мл | 1,85 [1,20;2,20] | 2,14 [1,48;2,80] | 2,14 [1,60;3,14] |
| С-пептид через 3 месяца терапии, нг/мл | 2,37 [2,05;2,70]* p=0,027 | 2,90 [1,98;3,20]* p=0,042 | 1,95 [1,04;2,65]* p=0,041 |

Примечание: – НbA_{1с},% - гликированный гемоглобин, ГПН – глюкоза плазмы натощак, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Через 3 месяца применения метформина во всех подгруппах гаплотипов отмечалось статистически значимое снижение показателя I_{max} и повышение показателя tgα₂. При этом общая антиоксидантная активность (ОАА) статистически значимо повысилась в подгруппах ТТ и СТ относительно результатов первого обследования (Таблица 3).

Таблица 3 - Динамика показателей хемилюминесценции при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Ме [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | СС (0,133) | СТ (0,284) | ТТ (0,583) |
| I _{max} до начала терапии, mV | 1,92 [1,73;2,12] | 2,21 [1,99;2,30] | 1,96 [1,766;2,10] |
| I _{max} , mV через 3 месяца терапии | 1,63 [1,40;1,75]* p=0,033; | 1,82 [1,60;1,84]* p=0,020; | 1,79 [1,39;1,79]* p=0,023 |
| 1/S, отн.ед. до начала терапии | 0,0753 [0,0602;0,0893] | 0,0641 [0,0570;0,0712] | 0,0773 [0,0560;0,0908] |
| 1/S, отн. ед. через 3 месяца терапии | 0,0749 [0,0605;0,0871] | 0,0800 [0,0769;0,0943]* p=0,0005 | 0,1038 [0,0718;0,1075]* p=0,036 |
| tgα ₂ до начала терапии | -66,00 [-68,00;-63,00] | -71,50 [-81,50;-60,25] | -64,75 [-69,00;-56,00] |
| tgα ₂ через 3 месяца терапии | -50,50 [-67,00;-37,50]* p=0,047 | -63,00 [-65,50;-47,00]* p=0,041 | -57,75 [-60,00;-50,25]* p=0,024 |

Примечание: – I_{max} – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, 1/S - ОАА – общая антиоксидантная активность, tgα₂ – тангенс альфа (напря-

женность ОАА), ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Через 3 месяца применения метформина отмечались различия в динамике активности антиоксидантных ферментов. При наличии гаплотипа ТТ наблюдалось статистически значимое увеличение активности СОД на 16%. У представителей гаплотипов СС и СТ активности каталазы возросла на 63% в 2,5 раза соответственно (Таблица 4).

Таблица 4 - Динамика показателей ферментативной и неферментативной АОС при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Ме [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|--|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | СС (0,133) | СТ (0,284) | ТТ (0,583) |
| СОД до начала терапии, ед. акт./мг Нв мин | 191,00 [105,00;277,00] | 170,00 [143,00;200,00] | 133,00 [193,00;233,11] |
| СОД через 3 месяца терапии, ед. акт./мг Нв мин | 196,00 [187,90;234,00] | 185,00 [170,00;194,82] | 153,72 [113,50;193,94]* p=0,012 |
| КАТ до начала терапии, ед. акт./мг Нв мин | 19,00 [15,72;25,00] | 15,40 [9,13;20,00] | 18,65 [18,00;23,30] |
| КАТ через 3 месяца терапии, ед. акт./мг Нв мин | 31,00 [25,86;53,00]* p=0,044 | 39,16 [15,20;53,80]* p=0,049 | 10,00 [9,11;12,13] |

Примечание: - АОС – антиоксидантная система, СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Динамика показателей неферментативной АОС у представителей СС гаплотипа при применении метформина являлась статистически значимой: отмечались повышение содержания церулоплазмина на 45% (p=0,011) и снижение гаптоглобина на 27% (p=0,029). В подгруппе СТ гаплотипа наблюдалось значимое снижение гаптоглобина на 55% (p=0,039). Такие изменения в неферментативной АОС привели к уменьшению интенсивности свободно-радикальных процессов, о чем свидетельствует статистически значимое снижение коэффициента гаптоглобин/церулоплазмин у представителей гаплотипов СС практически в 2 раза (p=0,034) и СТ – в 2,5 раза (p=0,015) через 3 месяца применения метформина.

По исходным показателям ОМБ подгруппы с разными гаплотипами статистически значимо не различались. При этом в результате применения метформина отмечено статистически значимое снижение уровня ранних маркеров деструкции белка в подгруппе СС на 64% (p=0,0005), а в подгруппе СТ – на 33% (p=0,0019).

Статистически значимое ограничение процессов ПОЛ при применении метформина наблюдалось при наличии гаплотипов СС и СТ. В подгруппе ТТ гаплотипа значимых изменений показателей не обнаружено (Таблица 5).

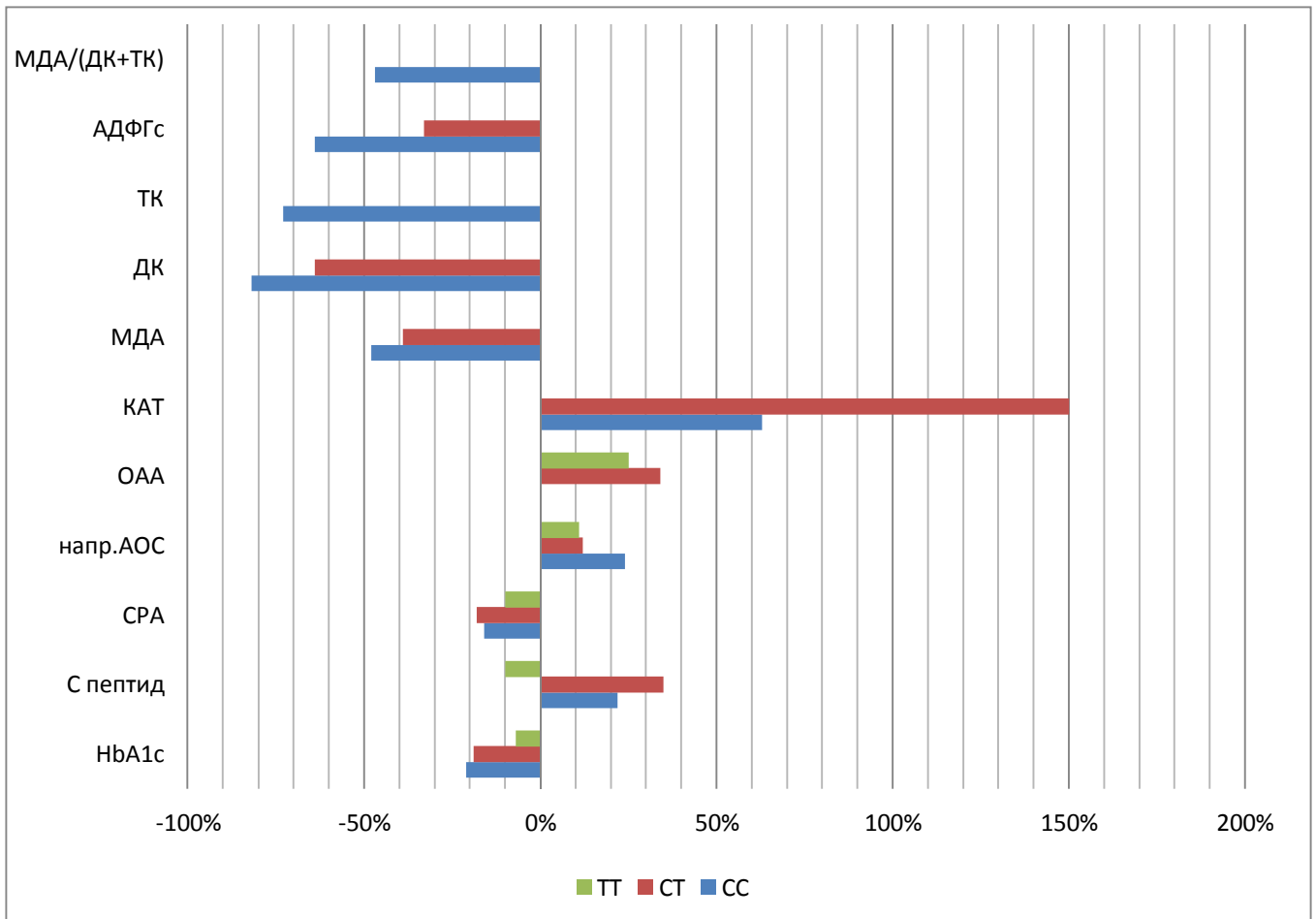
Таблица 5 - Динамика показателей ПОЛ при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Ме [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|---|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | СС (0,133) | СТ (0,284) | ТТ (0,583) |
| МДА до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,15 [0,13;0,16] | 0,24 [0,19;0,26] | 0,17 [0,15;0,20] |
| МДА через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,08 [0,04;0,10]* p=0,0003 | 0,15 [0,09;0,17]* p=0,0005 | 0,12 [0,06;0,68] |
| ДК до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,19 [0,04;0,25] | 0,31 [0,27;0,45] | 0,15 [0,10;0,23] |
| ДК через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,05 [0,02;0,12]* p=0,003 | 0,12 [0,06;0,16]* p=0,016 | 0,12 [0,06;0,25] |
| ТК до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,06 [0,05;0,06] | 0,07 [0,06;0,08] | 0,05 [0,01;0,16] |
| ТК через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,012 [0,01;0,04]* p=0,0001 | 0,04 [0,01;0,16] | 0,07 [0,004;0,49] |

Примечание: – МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Коэффициенты насыщенности ПОЛ МДА/(ДК+ТК) у представителей гаплотипов ОНП гена синтазы оксида азота 3 исходно были сопоставимы, однако, снижение наблюдалось только в СС подгруппе (47% , p=0,004).

Таким образом, наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей наблюдалась у представителей гаплотипов СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744) (Рисунок 1).



Примечание: - HbA_{1c} ,% - гликированный гемоглобин, СРА (I max) – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, 1/S - ОАА – общая антиоксидантная активность, $tg\alpha 2$ – тангенс альфа (напряженность ОАА), КАТ – каталаза, МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты, АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные.

Рисунок 1 - Статистически значимая динамика некоторых показателей среди гаплотипов ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

Динамика показателей в зависимости от полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы

Статистически значимое снижение уровней гликированного гемоглобина и ГПН наблюдалось во всех подгруппах исследуемого однонуклеотидного полиморфизма (Таблица 6).

Таблица 6 - Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Ме [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| | CC (0,621) | CG (0,379) |
| HbA_{1c} до начала терапии, % | 7,30 [6,80;8,00] | 7,60 [7,15;8,00] |
| HbA_{1c} через 3 месяца терапии, % | 6,90 [6,20;7,70]*, p=0,014 | 6,85[6,20;7,40]*,p=0,013 |
| ГПН до начала терапии, ммоль/л | 8,00 [7,20;10,00] | 8,60 [7,05;9,65] |
| ГПН через 3 месяца терапии, ммоль/л | 7,20 [5,50;8,00]*,p=0,006 | 7,15 [6,30;7,80]*,p=0,004 |
| С-пептид до начала терапии, нг/мл | 2,05 [1,48;3,12] | 2,14 [1,49;2,57] |
| С-пептид через 3 месяца терапии, нг/мл | 1,95 [1,45;2,30] | 2,50 [1,48;2,76] |

Примечание: – HbA_{1c} ,% - гликированный гемоглобин., ГПН – глюкоза плазмы натощак, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Под влиянием метформина во всех подгруппах гаплотипов данного полиморфного гена отмечалось статистически значимое ограничение интенсивности свободно-радикального окисления и повышение напряженности антиоксидантной системы (Таблица 7).

Таблица 7 - Динамика показателей хемилюминесценции при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Ме [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | CC (0,621) | CG (0,379) |
| I max до начала терапии, мВ | 1,95 [1,86;2,08] | 1,90 [1,80;1,99] |
| I max через 3 месяца терапии, мВ | 1,74 [1,40;1,79]*p=0,026 | 1,70 [1,63;1,86]*p=0,023 |
| 1/S до начала терапии, отн.ед. | 0,0784 [0,0700;0,0923] | 0,0881 [0,0745;0,0898] |
| 1/S через 3 месяца терапии, отн. ед. | 0,0951 [0,0718;0,1038] | 0,0921 [0,0855;0,1040] |
| $tg\alpha 2$ до начала терапии | -65,25 [-69,00;-56,00] | -67,50 [-84,00;-63] |
| $tg\alpha 2$ через 3 месяца терапии | -56,25 [-63,00;-45,00]* p=0,007 | -50,50 [-55,50;-47]* p=0,002 |

Примечание: – I max – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, 1/S - ОАА – общая антиоксидантная активность, $\text{tg}\alpha 2$ – тангенс альфа (напряженность ОАА), ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Уменьшение интенсивности свободно-радикальных процессов под влиянием метформина, вероятно, произошло за счет активации неферментативной антиоксидантной системы, о чем свидетельствует статистически значимое снижение коэффициента гаптоглобин/церулоплазмин у представителей гаплотипа СС практически в 2 раза ($p=0,017$). Одновременно с этим, в подгруппе гомозигот (СС) отмечалось значимое снижение молекулярных продуктов ПОЛ (Таблица 8).

Таблица 8 - Динамика показателей ПОЛ при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | |
|--|--------------------------------------|------------------------|
| | СС (0,621) | CG (0,379) |
| МДА до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,1562 [0,1488;0,2359] | 0,2310 [0,1700;0,3130] |
| МДА через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0755 [0,0521;0,1793]* $p=0,011$ | 0,0802 [0,0359;0,1976] |
| ДК до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0998 [0,0739;0,1853] | 0,0749 [0,0350;0,1281] |
| ДК через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0569 [0,0396;0,1087]* $p=0,004$ | 0,0463 [0,0228;0,1175] |
| ТК до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0306 [0,0152;0,0551] | 0,0455 [0,0290;0,0600] |
| ТК через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. , | 0,0117 [0,0072;0,0148]* $p=0,003$ | 0,0602 [0,0230;0,0786] |

Примечание: – МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

В подгруппе гомозигот коэффициенты насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)) статистически значимо снижаются относительно исходных данных на 56% через 3 месяца применения метформина ($p=0,047$).

При применении метформина в течение 3 месяцев динамика показателей ОМБ является несущественной у представителей обоих гаплотипов данного полиморфизма. Таким образом, наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей отмечается у гаплотипа СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133).

Динамика показателей в зависимости от полиморфизма гена белка p53

Динамика снижения показателей гликемии и гликированного гемоглобина под влиянием метформина у представителей всех трех подгрупп гаплотипов ОНП гена белка p53 (C215G Pro72Arg) является значимой (Таблица 9).

Таблица 9 - Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg), (Me [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | CC (0,149) | CG (0,362) | GG (0,489) |
| НbA _{1с} до начала терапии, % | 7,10 [6,80;7,50] | 7,10 [6,80;7,70] | 7,45 [7,10;8,00] |
| НbA _{1с} через 3 месяца терапии, % | 6,30 [6,10;6,60]* p=0,022, | 6,50 [6,05;7,35]* p= 0,026 | 7,10 [6,10;7,80]* p=0,029 |
| ГПН до начала терапии, ммоль/л | 7,80 [6,10;8,80] | 7,50 [6,20;9,00] | 9,00 [7,60;10,00] |
| ГПН через 3 месяца терапии, ммоль/л | 6,20 [4,50;7,10]* p =0,019 | 6,80 [5,20;7,40]* p=0,018 | 7,80 [6,30;9,50]* p =0,035 |
| С-пептид до начала терапии, нг/мл | 2,00 [1,90;2,70] | 2,65 [2,05;3,49] | 1,55 [1,20;2,94] |
| С-пептид через 3 месяца терапии, нг/мл | 2,10 [1,90;2,34] | 2,10 [1,00;2,40] | 1,95 [1,65;2,63] |

Примечание: – НbA_{1с},% - гликированный гемоглобин, ГПН – глюкоза плазмы натощак, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Через 3 месяца применения метформина во всех подгруппах гаплотипов произошло снижение интенсивности свободно-радикального окисления за счет повышения напряженности антиоксидантной системы (Таблица 10).

Таблица 10 - Динамика показателей хемилюминесценции при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg), (Me [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | CC (0,149) | CG (0,362) | GG (0,489) |
| I _{max} до начала терапии, mV | 2,15 [1,89;2,30] | 1,95 [1,90;2,06] | 1,94 [1,80;2,10] |
| I _{max} через 3 месяца терапии, mV | 1,85 [1,76;2,00]* p=0,0015 | 1,70 [1,40;2,10]* p=0,017 | 1,70 [1,50;1,79]* p=0,0003 |
| 1/S до начала терапии, отн.ед. | 0,0798[0,0677;0,0819] | 0,0810 [0,0712;0,0970] | 0,0767 [0,0711;0,0880] |
| 1/S через 3 месяца терапии, отн. ед | 0,0987 [0,0715;0,1100]* p=0,002 | 0,0883 [0,0718;0,0960] | 0,1010 [0,0871;0,1075]* p=0,001 |
| tga2 до начала терапии | -68,00 [-80,00;-57,00] | -63,75 [-66,00;-60,00] | -66,25 [-81,00;-55,5] |
| tga2 через 3 месяца терапии | -51,00 [-60,00;-43,50]* p=0,005 | -50,00 [-55,5;-47,00]* p=0,027 | -53,50 [-63,00;-47,00]* p=0,001 |

Примечание: – I_{max} – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, 1/S - ОАА – общая антиоксидантная активность, tga2 – тангенс альфа (напряженность ОАА), ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Статистически значимое повышение общей антиоксидантной активности в группе СС ($p=0,002$) произошло, вероятно, за счет статистически значимого повышения уровня церулоплазмينا на 17% ($p=0,016$) и значимое снижение отношения гаптоглобин/церулоплазмин на 24% ($p=0,014$). В подгруппе СG также было отмечено повышение уровня церулоплазмينا на 26% ($p=0,009$) и снижение отношения гаптоглобин/церулоплазмин на 29% ($p=0,022$).

Повышение активности неферментативной антиоксидантной системы, по-видимому, способствует ограничению ОМБ, что выражается в статистически значимом снижении содержания продуктов ранней деструкции белка (АДФГс) относительно исходного уровня в подгруппе гетерозигот на 57% ($p=0,009$), а в подгруппе СС - на 43% ($p=0,048$).

Под влиянием метформина уровень МДА статистически значимо снизился во всех подгруппах гаплотипов данного полиморфного гена. Вместе с этим, у представителей гомозигот (СС) было отмечено снижение уровня триеновых конъюгатов на 72 % (Таблица 11).

Таблица 11 - Динамика показателей ПОЛ при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg), (Me [25p;75p])

| Показатель | Гаплотип (частота) | | |
|---|---|---|---|
| | СС (0,149) | СG (0,362) | GG (0,489) |
| МДА до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,2020 [0,1170;0,2503] | 0,2167 [0,1569;0,2564] | 0,1983 [0,1329;0,2589] |
| МДА через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0771 [0,0430;0,1596]* $p=0,002$ | 0,1002 [0,0755;0,2085]* $p=0,003$ | 0,0753 [0,0553;0,0950]* $p=0,009$ |
| ДК до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0871 [0,0400;0,1488] | 0,2084 [0,1157;0,3043] | 0,1122 [0,1004;0,2260] |
| ДК через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0703 [0,0558;0,1087] | 0,1548 [0,0663;0,4012] | 0,0721 [0,0621;0,2493] |
| ТК до начала терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0520 [0,0300;0,0550] | 0,0683 [0,0607;0,0797] | 0,0788 [0,0145;0,0934] |
| ТК через 3 месяца терапии, ед.опт.пл./г о.л. | 0,0146 [0,0080;0,0407]* $p=0,02$ | 0,0404 [0,0109;0,0900] | 0,0404 [0,0044;0,3038] |

Примечание: – МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты, ОНП – однонуклеотидный полиморфизм, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

В подгруппе гомозигот (СС) также отмечалось статистически значимое снижение коэффициента насыщенности ПОЛ - на 48% ($p=0,004$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа даже при небольшой длительности заболевания и с уровнем гликированного гемоглобина от 6,5% до 8,0%, наблюдается статистически значимое изменение липидного профиля, интенсифи-

кация окислительного стресса и снижение антиоксидантной активности. Генетическое исследование трех полиморфизмов (rs2070744, rs1052133, rs1042522) показало, что частота распространения генотипов среди пациентов с СД 2 типа не отличается от таковой среди лиц без нарушения углеводного обмена.

Через три месяца применения препарата метформин наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей отмечается у пациентов с гаплотипами СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и СС полиморфизма гена белка р53 (rs1042522). Доказано, что при наличии указанных гаплотипов значения изученных показателей в процессе монотерапии метформином пациентов с сахарным диабетом 2 типа приближаются к значениям таковых у лиц без нарушения углеводного обмена.

Результаты, полученные в ходе исследования, обосновывают перспективность дальнейшего поиска и изучения однонуклеотидных полиморфизмов генов, определяющих эффективность сахароснижающей терапии метформином у пациентов с сахарным диабетом 2 типа.

ВЫВОДЫ

1. У больных с впервые выявленным СД 2 типа при уровне гликированного гемоглобина от 6,5 до 8,0% отмечаются статистически значимое снижение ферментативной и неферментативной антиоксидантной активности, повышение содержания молекулярных продуктов липопероксидации и окисленно модифицированных белков, повышение гаптоглобина - на 31% и коэффициента насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)) в 4 раза по сравнению с лицами без нарушения углеводного обмена.

2. Частота встречаемости гаплотипов изученным полиморфных генов (эндотелиальная синтаза оксида азота, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, белок р53) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа существенно не отличается от такового среди лиц без нарушения углеводного обмена.

3. При использовании метформина наиболее выраженная статистически значимая динамика таких показателей, как уровни глюкозы плазмы натощак, гликированного гемоглобина и С-пептида, отмечается у гаплотипов СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), гаплотипа СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133), гаплотипа СС полиморфизма гена белка р53 (rs1042522).

4. Наиболее выраженное ограничение окислительного стресса при применении препарата метформин отмечается у пациентов с гаплотипами СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), гаплотипа СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133), СС и СG полиморфизма гена белка р53 (rs1042522), что подтверждается также и уменьшением дисбаланса про- и антиоксидантов в группе

полиморфного гена синтазы оксида азота в 2 и 2,5 раза, в группе полиморфного гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы - в 2 раза, в группе полиморфного гена белка p53 –на 24% и 20% соответственно.

5. Наличие гаплотипов СС и СТ ОНП синтазы оксида азота может служить репрезентативным показателем эффективности метформина как сахароснижающего препарата, так и ограничивающего окислительный стресс у больных сахарным диабетом 2 типа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оптимизации персонализированной сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа целесообразно проводить фармакогенетическое тестирование. Исследование генотипа пациента обеспечит выделение пациентов, у которых прием метформина обеспечит длительную компенсацию углеводного обмена и ограничение окислительного стресса, и пациентов, которым монотерапии изначально будет недостаточно. Пациентам с гаплотипами СС и СТ гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и СС полиморфизма гена белка p53 (rs1042522) рекомендуется монотерапия метформином в дозировке по 850 мг 2 раза в сутки. Пациенты с другими гаплотипами однонуклеотидных полиморфизмов изученных генов нуждаются в раннем назначении комбинированной терапии с метформином.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в ходе исследования результаты обосновывают перспективность дальнейшего поиска и изучения однонуклеотидных полиморфизмов генов, определяющих эффективность сахароснижающей терапии метформином.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Занозина, Ю.А. (Сорокина Ю.А.)** Возможность ограничения окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа с помощью метформина / Ю.А. Занозина, М.И. Яшанова, **В.Б. Кузин** // I Всероссий. XII ежегодная науч. сессия молодых ученых и студентов с межд. уч. «Современные решения актуальных научных проблем в медицине»: мат. конф. (Н. Новгород, 14-15 марта 2013 г.). - Н. Новгород, 2013. - «Медиаль» № 1(6). — С. 122-123.
2. **Пат. 2478958** Российская Федерация, МПК (51) МПК G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01) Способ диагностики декомпенсации сахарного диабета 2 типа / Т.Г. Щербатюк, О.В. Занозина, Е.С. Клинцева, **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, Ю.П. Потехина ; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России №2012100928/15 ; заяв. 11.01.2012 ; опубл. 10.04.2013 , Бюл. №10. – 8 с. : ил.
3. Влияние ингибиторов ДПП-4 и метформина на показатели окислительного стресса при сахарном диабете 2 типа / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**,

В.Б. Кузин, Т.Г. Щербатюк, О.В. Занозина // XX Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство»: тезисы конгр.: (Москва, 15-19 апреля 2013 г.).- М., 2013 г.– С. 68.

4. **Занозина, Ю.А. (Сорокина Ю.А.)** Влияние метформина на показатели окислительного стресса при сахарном диабете 2 типа / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, М.И. Яшанова // II Межд. науч.-практ. интернет – конф. «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы»: мат. конф. (Казань, 19-20 апреля 2013 г.). – Казань, 2013. -Том 1. - С. 123-125.

5. Влияние метформина на показатели окислительного стресса при впервые выявленном сахарном диабете 2 типа / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, М.И. Яшанова, **В.Б. Кузин**, Т.Г. Щербатюк // Всерос. науч.-практ. конф. с межд. уч.«Актуальные вопросы медицинской науки», посвященная 85-летию проф. Е.Н. Дормидонтова: сб. науч. работ студентов и молодых ученых (Ярославль, 24-26 апреля 2013 г.). – Ярославль: «Индиго», 2013. – С. 93.

6. Особенности окислительной модификации белков у больных сахарным диабетом 2 типа / М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, О.В. Занозина // Всерос. науч.-практ. конф. с межд. уч.«Актуальные вопросы медицинской науки», посвященная 85-летию проф. Е.Н. Дормидонтова: сб. науч. работ студентов и молодых ученых (Ярославль, 24-26 апреля 2013 г.). – Ярославль: «Индиго», 2013. – С. 110.

7. Возможность ограничения окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с помощью ингибиторов дипептидилпептидазы -IV и метформина / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, **В.Б. Кузин**, О.В. Занозина // VI Всерос. диабетологический конгр. «Сахарный диабет в XXI веке - время объединения усилий»: тезисы конгр. (Москва, 19-22 мая 2013 г.). – М., 2013г. - С. 66.

8. Проблемы ограничения окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с помощью метформина / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, **В.Б. Кузин**, О.В. Занозина // VI Всерос. диабетологический конгр. «Сахарный диабет в XXI веке - время объединения усилий»: тезисы конгр. (Москва, 19-22 мая 2013 г.). – М., 2013г. - С. 387.

9. **Занозина, Ю.А. (Сорокина Ю.А.)**Показатели окислительного стресса и системного воспаления при терапии сахарного диабета 2 типа метформином / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, М.И. Яшанова // XVIII Нижегородская сессия молодых ученых. Естественные, математические науки: сб. мат. сессии (Н. Новгород, 28-31 мая 2013 г.). – Н. Новгород: НИУ РАН-ХиГС, 2013. – Ч. I. – С. 143-145.

10. Выраженность окислительного стресса у пациентов с вновь выявленным сахарным диабетом 2 типа / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, О.В. Занозина, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк // XVIII Нижегородская сессия молодых ученых. Естественные, математические науки: сб. мат. сессии (Н. Новгород, 28-31 мая 2013 г.). –Н. Новгород: НИУ РАН-ХиГС, 2013. – Ч. II. – С. 169-167.

11. Проблемы ограничения окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с помощью метформина / **Ю.А. Занозина (Ю.А. Сорокина)**, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, В. Б. Кузин, О.В. Занозина // **Сахарный диабет** . – 2013. -№3 (60). -С. 118-119.
12. Комплексные методы оценки эффективности действия метформина на окислительный стресс при сахарном диабете 2 типа / **Ю.А. Сорокина**, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, **В.Б. Кузин**, О.В. Занозина // Межд. науч. – практ. конф. «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине»: мат. конф. (Новосибирск, 1-4 октября 2013г.). - Новосибирск, 2013. – Ч. 1. - С.103-104.
13. Окислительный стресс у больных сахарным диабетом 2 типа / **Ю.А. Сорокина**, Т.Г. Щербатюк, Н.Н. Боровков, О.В. Занозина // II Съезд терапевтов Приволжского федерального округа: сб. тезисов (Н. Новгород, 24-25 октября 2013 г.). - Н. Новгород, 2013. - С.61.
14. Комплексные методы оценки влияния метформина и его сочетания с вилдаглиптином на окислительный стресс при сахарном диабете 2 типа / **Ю.А. Сорокина, В.Б. Кузин**, О.В. Занозина, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк // II Съезд терапевтов Приволжского федерального округа: сб. тезисов (Н. Новгород, 24-25 октября 2013 г.). - Н.Новгород, 2013. - С.78.
15. «Порочный круг» взаимосвязи перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков у больных сахарным диабетом 2 типа / О.В. Занозина, **Ю.А. Сорокина**, Н.Н. Боровков, Т.Г. Щербатюк // **Медицинский альманах**. – 2013. - №6 (30). - С. 167-170.
16. Проблемы ограничения окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа с помощью метформина / **Ю.А. Сорокина**, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, **В.Б.Кузин**, О.В. Занозина // **Медицинский альманах**. – 2013. - №6 (30). - С. 170-173.
17. Влияние комбинации вилдаглиптина и метформина на показатели окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа / **Ю.А. Сорокина**, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк, О.В. Занозина // XXI Всерос. нац. конгр. «Человек и лекарство»: сб. мат. конгр. (Москва, 7-11 апреля 2014г.). – М.,2014.- С. 104-105.
18. Аппаратно - программный комплекс для диагностики окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2 типа / М.И. Яшанова, **Ю.А. Сорокина**, Т.Г. Щербатюк, О.В. Занозина // VIII Межд. симп. «Актуальные проблемы биофизической медицины»: мат. симп. (Киев, 14-17 мая 2014 г.). – Киев, 2014. - С . 134-135.
19. Особенности окислительного стресса у больных с вновь выявленным сахарным диабетом 2 типа / М.И. Яшанова, **Ю.А. Сорокина**, Т.Г. Щербатюк, О.В. Занозина // VIII Межд. симп. «Актуальные проблемы биофизической медицины»: мат. симп. (Киев, 14-17 мая 2014 г.). – Киев, 2014. - С . 135.
20. Adjusted opportunities of oxidative stress amelioration in patients with newly diagnosed diabetes mellitus type 2 / **Y. A. Sorokina, L.V. Lovcova**, M.I. Yashanova, T.G. Scherbatyuk // 2nd the Intern. conf. on Recent Trends in Science

and Technology Management (London, 25-26 May 2014). - London, 2014 – P. 82-93.

21. Метформин и вилдаглиптин: феномен взаимного дополнения в коррекции окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2 типа / **Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова, Т.Г. Щербатюк, О.В. Занозина** // II Всерос. конгр. «Инновационные технологии в эндокринологии» с уч. стран СНГ: сб. тез. конгр. (Москва, 25-28 мая 2014 г.). – М., 2014. – С. 186-187.

22. Синергизм при комбинированном использовании пероральных сахароснижающих средств / **Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова, А.В. Богдарина, М.И. Яшанова, Т.Г. Щербатюк** // **Современные технологии в медицине.** – 2014. - Т 6, №3 . – С. 85-90.

23. **Сорокина, Ю.А.** Полиморфизм гена эндотелиальной синтазы азота и сахарный диабет 2 типа / **Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова** // **Архивь внутренней медицины.** – 2014. - №6 . - С. 34-37.

24. **Сорокина, Ю.А.** Коэффициенты окислительного стресса как способ персонифицирования фармакотерапии в дебюте СД 2 типа/ **Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова** // **Universum: Медицина и фармакология : электрон. научн. журн.** 2015. - № 1(14). – [Электронный ресурс]. – режим доступа: URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1868>

25. Ассоциации гена репарации ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы с гликемическим контролем и выраженностью окислительного стресса у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа / **О.В. Занозина, Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова, Д.В. Новиков, С.Г. Фомина, Л.В. Бояринова** // VII Всерос. диабетологический конгр. «Сахарный диабет в XXI веке – время объединения усилий»: сб. тез. конгр. (Москва, 25-27 февраля 2015 г.). – М., 2015. – С. 34.

26. **Сорокина Ю. А.** Однонуклеотидный полиморфизм гена репарации ДНК — 8-оксогуанидин-ДНК-гликозилазы: от онкологии к сахарному диабету 2 типа (обзор литературы) [Электронный ресурс] / **Ю. А. Сорокина** // **Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание.** – 2015. – № 1. – Режим доступа : http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1630. – (Дата обращения : 02.03.2015).

27. **Сорокина, Ю.А.** Фармакогенетические аспекты сахароснижающей терапии: фенотипы «ответа» и «провала» / **Ю. А. Сорокина** // **Медицинский совет.** – 2015. - №8. – С.82-85.

28. **Сорокина, Ю.А.** Персонифицированное применение метформина с позиции фармакогенетики (обзор) / **Ю.А. Сорокина, Занозина О.В, Л.В. Ловцова** // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2015. – Т. 78, № 9. – С. 39-44.

29. Однонуклеотидный полиморфизм некоторых генов и эффективность метформина у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа / **Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова, О.В. Занозина, Д.В. Новиков** // **Медиаль** - 2015. - №3 (17). – С. 109-112.