

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СОРОКИНА ЮЛИЯ АНДРЕЕВНА

**Фармакогенетические аспекты
эффективности метформина при сахарном диабете 2 типа**

14.03.06- фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
доктор медицинских наук, доцент
Ловцова Любовь Валерьевна

Нижний Новгород – 2016

*Посвящается памяти доктора медицинских наук,
профессора Владимира Борисовича Кузина*

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Сахарный диабет 2 типа и окислительный стресс	14
1.1.1. Понятие «окислительный стресс». Механизмы токсического действия при сахарном диабете 2 типа	14
1.1.2. «Митохондриальный стресс» у больных сахарным диабетом 2 типа... ..	15
1.1.3. Окислительный стресс и концепция «метаболической памяти» у больных сахарным диабетом 2 типа	17
1.1.4. «Генотоксический стресс» у больных сахарным диабетом 2 типа в условиях окислительного стресса	19
1.1.5. Особенности окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2 типа.....	20
1.1.6. Антиоксидантная защита у больных сахарным диабетом 2 типа.....	21
1.2. Интегральные способы оценки окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2 типа	24
1.3. Фармакогенетика метформина. Полиморфизм генов, влияющих на фармакокинетику и фармакодинамику метформина.....	28
1.4. Фармакогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота.....	35
1.5. Фармакогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы.....	37
1.6. Фармакогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма гена белка p53.....	38
1.7. Некоторые плеiotропные эффекты метформина.....	39
1.8. Резюме.....	41

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Общая характеристика и этапы исследования	43
2.2. Характеристика групп объектов исследования.....	45
2.3. Характеристика проводимой фармакотерапии.....	46
2.4. Характеристика методов исследований.....	48
2.4.1. Лабораторные методы исследования.....	48
2.4.2. Методы статистической обработки полученных данных.....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОФИЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА.....	52
3.1. Показатели гликемии, липидного профиля, системного воспаления.....	52
3.2. Показатели окислительного стресса.....	53
3.3. Генетический «портрет» пациентов	60
3.4. Резюме.....	67
ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕН- ТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОТИ- ПОМ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТА МЕТФОРМИН	68
4.1. Динамика показателей в зависимости от гаплотипа однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота.....	68
4.2. Динамика показателей в зависимости от гаплотипа однонуклеотидного полиморфизма гена 8 – оксогуанин – ДНК-гликозилазы	78
4.3. Динамика показателей в зависимости от гаплотипа однонуклеотидного полиморфизма гена белка p53.....	87
4.4. Резюме.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
ВЫВОДЫ.....	107
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

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; Leewen van N., 2014; Gnanapragasam A. et al.,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 мно-

гоцентровые исследования, как GWAS, GoDARTS, SUGAR-MGH, FUSION, посвященные ассоциациям генов с развитием СД 2 типа, внесли существенный вклад в изучение генов-мишеней, непосредственно участвующих как в патогенезе СД 2 типа, так и в фармакокинетике и фармакодинамике лекарственных препаратов [Jablonski K.A. et al., 2009; Zhou K. et al., 2009; Ткач I. et al, 2014; Todd J.N., 2014; Бондарь И. А., Шабельникова О. Ю., 2013]. Большой интерес могут представлять 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 сердечно-сосудистых 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 антионкогенной активности метформина от так называемых «метфор-

минположительных» 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 у больных сахарным диабетом 2 типа 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 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 (rs 1042522) прогнозируют эффективную терапию препаратом метформин у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа.

3. Наличие гаплотипов СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и СС и СG полиморфизма гена белка р53 (rs 1042522) прогнозируют эффективность метформина в отношении ограничения процессов окислительного стресса у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа.

Научная новизна исследования

Данное диссертационное исследование было выполнено в соответствии с планом НИР ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (шифр 208.009.02).

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 р53) у больных с сахарным диабетом 2 типа не отличается от таковой в общей популяции.

Получены приоритетные данные о том, что наличие гаплотипов СС и СТ 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 СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и СС полиморфизма гена белка р53 (rs 1042522) прогнозируют значимую эффективность сахароснижающей активности метформина в качестве монотерапии.

Впервые показано, что наличие гаплотипа СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744), СС полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) и СС и СG полиморфизма гена белка р53 (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 персонафицированной фармакотерапии сахарного диабета 2 типа. По результатам исследования диссертанту в соавторстве присуждено звание «Лауреат Премии Нижнего Новгорода 2015» в номинации «Медицина».

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 от 10.04.2013 «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 Ниж-ГМА 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сахарный диабет 2 типа и окислительный стресс

1.1.1. Понятие «окислительный стресс». Механизмы токсического действия при сахарном диабете 2 типа

«Окислительный стресс», как понятие, был введен Хельмутом Зиссом в 1991 году и был принят официально в 1995 году. Согласно определению, данному в PubMed, оксидативный стресс – это нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых, которое может привести к повреждению [9, 32]. Окислительный стресс, возможно, не является симптомом в начале заболевания, а, скорее всего, является патогенетическим фактором, лежащим в основе заболевания и способствующим прогрессированию болезни [9, 10, 32, 33, 36]. Наглядным примером служит патогенез сахарного диабета. Свободные радикалы генерируются в условиях гипергликемии и подавления активности ферментов гликолиза, а глюкоза окисляется по шести альтернативным путям [9]. В связи с этим открытием, применение антиоксидантов при терапии сахарного диабета и его осложнений, таких, как нейропатия, является обоснованным [26, 36].

Аутоокисление глюкозы и ее метаболитических интермедиатов способствует образованию реакционноспособных дикарбонильных сахаров - метилглиоксала и 3-дезоксиглюкозона. В результате запускается процесс неферментативного гликозилирования белков с образованием активных форм кислорода (АФК). Избыток АФК инициирует апоптоз клетки, что подтверждает взаимосвязь окислительного и карбонильного стресса [9, 10, 26, 29, 32, 33, 34, 36, 63, 64, 150, 151]. Активация полиольного пути метаболизма глюкозы приводит не только к генерации свободных радикалов (СР), но и к снижению активности восстановленного глутатиона – основного антиоксиданта клетки. При утилизации глюкозы по гексозаминовому пути образуется устойчивый продукт – уридинфосфат-N-ацетилглюкозамин, который может участвовать в гликировании белков по остаткам

серина и треонина, что способствует генерации АФК. Также в условиях гипергликемии происходит избыточное образование диацилглицерола с последующей активацией протеинкиназы С, что способствует карбонильному стрессу из-за накопления триозофосфатов [26,36].

Накопление триозофосфатов способствует накоплению метилглиоксаля, глиоксаля и 3 – деоксиглюкозона – токсичных альфа-оксоальдегидов. Эти карбонильные производные присоединяются к аминокислотным остаткам, формируя конечные продукты неферментативного гликозилирования (КПНГ). КПНГ ингибируют активность антиапоптотического и антиоксидантного белка теплового шока (HS P27) [9,10, 26,36].

Помимо избыточной продукции прооксидантов, наблюдается также истощение антиоксидантов [4,9, 10]. Восстановление глутатиона - основного антиоксиданта клетки - задерживается в присутствии высокого уровня глюкозы [87]. Вследствие изменения концентрации ионов некоторых металлов, в том числе цинка и марганца, изменяется активность СОД.

Гипергликемия и активации полиольного пути провоцируют снижение уровня восстановленного глутатиона, который способен деактивировать метилглиоксаль путем превращения его в лактат. Данный процесс объединяет окислительный и карбонильный стрессы [9, 10,26, 32, 33, 36].

1.1.2. «Митохондриальный стресс» у больных сахарным диабетом 2 типа

Митохондрии производят основную массу АТФ путем окислительного фосфорилирования. В норме 1-5% кислорода, используемого митохондриями, преобразуются в супероксидные анион-радикалы, являющиеся предшественниками других АФК, таких как пероксид водорода и радикалы гидроксила. Также АФК реагируют с оксидом азота внутри митохондрий, повышая концентрацию высокоактивного пероксилнитрита [6,32].

Утечке и повреждающему действию АФК противостоят защитные системы митохондрий, состоящие из ферментативных (марганцевая супероксиддисмутаза

(MnСОД), каталаза и глутатионпероксидаза) и неферментативных антиоксидантов.

При сахарном диабете в митохондриях в больших количествах образуется супероксид-радикал [89]. Митохондрии перестают выполнять роль сигнальных регуляторных органелл (своевременный апоптоз, регуляция транскрипции и так далее) и начинают провоцировать лавинообразное высвобождение свободных радикалов [63, 64, 93]. В результате инактивации глицеральдегидфосфат дегидрогеназы в митохондрии поступают токсичные продукты обмена, что возобновляет генерацию СР, приводя к глюкозотоксичности через усиленное гликозилирование и повышение активности протеинкиназы С [26, 36].

«Митохондриальный стресс», вместо регуляторной функции приводит к разрушению ДНК, активации поли – АДФ – рибоза - полимеразы (PARP) [125]. Данные изменения инактивируют ключевой фермент гликолиза – глицеральдегидфосфат дегидрогеназу, что блокирует гликолиз на уровне триозофосфатов и направляет глюкозу на окисление по альтернативному пути, стимулируя образование диацилглицерола, активируя протеинкиназу С [150].

В результате действия окислительного стресса возникают мутации в генах митохондриальной ДНК (мтДНК). Согласно расчету, за сутки клетка подвергается 10 000 окислительным ударам. При этом повреждения и мутации мтДНК наиболее опасны, чем изменения ядерной и теломерной ДНК. В частности, мутации в мтДНК возникают в 16 раз чаще ядерной [61].

Все больше и больше заболеваний связывают с мутациями мтДНК. Общее для всех нарушений – окислительное поражение и мутации генов мтДНК, кодирующих структуру субъединиц дыхательных ферментов, приводящие к такой сборке дыхательной цепи, что при дыхательном цикле вызывает генерацию еще большего количества АФК. Повторение этого цикла связано как с усилением генерации СР и замедляет производство АТФ, что ведет к дальнейшему поражению как самой митохондрии и мтДНК [61].

В этом и состоит так называемая теория «порочного круга» окислительных повреждений мтДНК [61], что вносит значительный вклад в процессы старения и апоптоза [63,64].

Митохондрии, испытывающие окислительный стресс, играют критическую роль в качестве триггера и медиатора апоптоза. Апоптоз - исключительно сложный, многостадийный, каскадный процесс, в который вовлечена экспрессия многих десятков генов и биохимических процессов, находящихся под контролем клеточного белка p53, условно называемого супрессором опухолей.

Молекулярные механизмы влияния окислительного стресса на белки-регуляторы апоптоза были изучены ранее [63,64]. Показано, что при культивировании мононуклеарных лейкоцитов крови в присутствии 1 мМ перекиси водорода происходит активация транскрипционных факторов p53 и NF-κB, приводящая к изменению экспрессии генов-мишеней bcl-X_L и bax.

Однако взаимосвязи окислительного стресса у больных СД 2 типа в дебюте заболевания с мутациями мтДНК генов и апоптозом в литературе уделено недостаточно внимания.

1.1.3. Окислительный стресс и концепция «метаболической памяти» у больных сахарным диабетом 2 типа

Исследователями была выдвинута гипотеза о связи развития осложнений СД 2 типа с наличием так называемой «метаболической памяти». Возможные механизмы формирования «памяти» – неферментативное гликозилирование белков, липидов, лавинообразное увеличение содержания АФК и метаболитов оксида азота, повреждение мтДНК, а также в последнее время и деметилирование ДНК, вызванное гипергликемией [130].

Для формирования «метаболической памяти» очень важна митохондриальная продукция супероксид-аниона при гипергликемии. Хроническая гипергликемия повреждает митохондрии путем гликирования митохондриальных протеинов. Метилглиоксаль реагирует с аргинином, лизином, сульфгидрильными группами.

пами протеинов, аминокислотами, образуя конечные продукты неферментативного гликозилирования. Также метилглиоксаль способен ингибировать митохондриальное дыхание и трансформировать митохондриальные протеины. Эти протеины становятся чувствительными к наличию супероксид – аниона, независимо от уровня гипергликемии, и участвуют в формировании «метаболической памяти» [161,176].

Генерация радикалов трансформированными гипергликемией митохондриальными белками - это ключевой фактор в развитии отсроченных осложнений сахарного диабета даже при достижении целевых значений гликемии [9,32,150,161].

Главным объектом исследования при изучении влияния СРО на организм явился процесс ПОЛ, который подвергает изменению молекулы биомембран [29]. Однако СРО нельзя считать строго специфичным по отношению к липидам клетки, активные формы кислорода также вызывают и окислительную модификацию белков (ОМБ)[22,25]. Существует мнение, что именно белковая составляющая мембран клеток подвергается атаке АФК. В подтверждение этого может служить феномен «молекулярной памяти липидов», открытый советскими учеными Е. М. Крепе, Л. Д. Бергельсоном и Р. П. Евстигнеевой (2005 г.). Предполагают, что разнообразные непродолжительные реакции и изменения, протекающие в белковой молекуле клеточной мембраны, в дальнейшем отражаются на функционировании бислоя фосфолипидов мембраны. После воздействия определенного агента на мембранный белок-рецептор изменяется конформация или целостность белка и провоцирует изменения белок — липидных контактов, состояние липидов, окружающих белок. Даже после удаления агента сохраняются и продолжают формироваться изменения в липидном бислое, распространяясь все дальше от центра. Таким образом, «память» липидов сохраняет, перерабатывает, усиливает и транслирует сигнал, передаваемый из внешней среды на клеточную мембрану. Подтверждением первичности ОМБ является наличие выраженных изменений при окислительном стрессе в области аннулярных липидов - липидов, которые непосредственно связаны с рецепторами мембраны. При инкубации арахидоновой кислоты с окисленно модифицированным белком *in vitro* наблюдается образование

двух чрезвычайно активных продуктов ПОЛ - малонового диальдегида и 4 — гидроксиноненала. Таким образом, можно сделать вывод, что именно окисленный белок провоцирует начало трансформации липидов мембраны [22].

1.1.4. «Генотоксический стресс» у больных сахарным диабетом 2 типа в условиях окислительного стресса

Активные формы кислорода приводят к образованию окисленных азотистых оснований, вызывающих мутации с заменой оснований. Некоторые модифицированные основания способствуют блокированию ДНК полимераз, то есть остановке репликационной вилки. В образующейся дочерней цепи возникают мутации [40]. Наиболее распространенным окисленным основанием является 8-оксогуанин (8-охоG), который преимущественно связывается с аденином, а не с цитозином, что приводит к трансверсии пары гуанин-цитозин в тимин-аденин после репликации ДНК. Наиболее опасно образование 8-охоG в промоторных областях ДНК, где располагаются участки, наиболее богатые гуанин-цитозин парами. Кроме того, окисление гуанина затрудняет клеточную дифференцировку. При образовании 8-охоG в последовательности узнавания наблюдается ингибирование связывания транскрипционных факторов. Также окисление гуанина в ДНК повышает иммуногенность ДНК [35, 58; 181].

Еще одной группой окислителей ДНК являются активные формы азота, основным представителем которых является пероксинитрит (ONO_2^-). Это продукт взаимодействия оксида азота NO (сосудистого релаксанта и нейротрансмиттера) с супероксид анион-радикалом O_2^- . Его протонированная форма ONO_2H крайне опасна для ДНК. Активные формы азота приводят к разрывам цепей ДНК, окислительным повреждениям оснований, дезаминированию гуанина и аденина, образованию 8 – нитро – дезоксигуанозина.

Супероксид - анион ингибирует различные ферменты репарации ДНК, такие как человеческая 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (hOGG1), которая удаляет 8-охо-G. Таким образом, он не только стимулирует образование пероксинитрита, но

и ингибирует репарацию вызванных им повреждений.

В процессе разложения липидных пероксидов или аутоокисления глюкозы образуются активные виды карбонила, глиоксаль и метилглиоксаль. Глиоксаль вызывает повреждение дезоксирибозы. Мутагенным ДНК-аддуктами являются глиоксилированный дезоксицитидин и глиоксаль. Метилглиоксаль образует с ДНК циклический аддукт. Глиоксаль способен приводить к разрывам нитей ДНК, а метилглиоксаль – к перекрестным сшивкам ДНК [6,36,150].

1.1.5. Особенности окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2 типа

Высокий уровень СРО отмечен еще на стадиях нарушенной толерантности к глюкозе [9,10]. Активация свободнорадикального окисления отмечена как при впервые диагностированном, так и при длительном течении СД 2 типа [26, 36,55].

У больных сахарным диабетом в стадии декомпенсации содержание диеновых конъюгатов в эритроцитах на 37%, а в плазме – на 27% превышает уровень в группе сравнения [36].

О.В. Занозиной (2010) показано, что активация свободнорадикального окисления статистически значимо по сравнению с контролем присутствует даже при компенсированном недлительно текущем СД 2 типа. Интенсивность СРО была увеличена на 27%, а ОАА снижена на 32 %. Содержание ДК, ТК, МДА у этих пациентов превышало содержание аналогичных молекулярных продуктов у пациентов из группы сравнения на 51%, 73,3%, 64% соответственно. При достижении компенсации углеводного обмена происходит достоверное снижение содержания молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ДК на 35%, ТК – на 14,69%, МДА – на 49,1%). Одновременно отмечается повышение содержание СОД [26].

Вместе с тем, согласно данным Ляйфер А.И. с соавт. (1993), при СД компенсация обменных процессов не нормализует реакции ПОЛ, но благоприятно

влияет на систему антиоксидантной защиты [34]. Нормализация гликемии без учета сопутствующих факторов не способна противостоять ОС. Даже при компенсации показатели ОС превышают эти значения у здоровых лиц [9, 10, 26].

Следовательно, критичными являются изменения в системе антиоксидантной защиты и СРО в самом дебюте заболевания. Крайне важно, как можно раньше достичь компенсации углеводного обмена. В противном случае, генотоксический эффект гипергликемии формирует «метаболическую память» и будет служить постоянным источником свободных радикалов.

Окислительная модификация белков (ОМБ) используется в настоящее время как один из наиболее надежных индикаторов глубины поражений ткани при свободнорадикальном окислении [22,25]. Длительно живущие молекулы могут быть использованы как специфический сенсор для определения окислительного стресса, причем для оценки состояния можно использовать как весь спектр белков, так и конкретные соединения [6,25, 26]. Также было показано, что карбонильные продукты деградации белков провоцируют апоптоз [63,64].

Данные по этому вопросу у больных СД 2 в дебюте заболевания единичные. О. В. Занозиной (2010) было показано, что у пациентов с недлительно текущим СД 2 типа статистически значимо повышено содержание ранних маркеров окислительной деструкции белка как в покое (АДФГ с) - на 33%, так и индуцированных (АДФГи) - на 75 %. Содержание поздних маркеров окислительной деструкции белка (КДФГ) даже в покое превышало таковую в группе сравнения на 80%, а при индукции возрастала в 2 раза [26].

1.1.6. Антиоксидантная защита у больных сахарным диабетом 2 типа

В норме свободнорадикальные процессы уравновешены системой - ферментативной и неферментативной – антиоксидантов. Существуют различные точки зрения на содержание антиоксидантов у больных СД 2 типа.

Биологическая роль антиоксидантных ферментов очень разнообразна. С одной стороны, снижение активности СОД более чем на 50 % в эксперименте при-

водит к неуправляемому свободнорадикальному окислению и гибели клетки [32]. С другой стороны, элиминирование супероксид-аниона, например, не так важно, как устранение перекиси водорода - более сильного окислителя, образующего гидроксильный радикал. Поэтому гиперактивность СОД в отсутствие КАТ и ГПО также является нежелательной, поскольку может спровоцировать образование СР при активации реакции Фентона с образованием гидроксид-аниона. В то же время СОД не дает взаимодействовать супероксид-аниону с оксидом азота, препятствуя образованию пероксинитрита (ONOO-) – более опасного окислителя, чем перекись водорода. В этом заключается и вазопротективный эффект фермента. Cu,ZnСОД также способна в присутствии восстановленного глутатиона индуцировать продолжительную генерацию оксида азота – эндогенного вазодилататора. Существует также мнение, что СОД необходима для защиты восстановленного внутриклеточного глутатиона, который является ловушкой для СР, и для защиты крайне чувствительной нитрогеназы. Таким образом, СОД является первым этапом ферментативного разложения АФК.

Разложение перекиси водорода, образовавшейся в результате действия СОД, осуществляется КАТ. В норме каталазная активность в 10 000 раз выше пероксидазной. Существует мнение, что каталаза не является жизненно важным ферментом. Подтверждением этому является наследственное заболевание акаталаземия, синдром Такахары – отсутствие фермента КАТ. У многих таких лиц никаких клинических проявлений заболевания нет, кроме язвенных поражений десен. Однако существуют данные о том, что дефицит каталазы приводит к накоплению пероксида водорода в бета – клетках поджелудочной железы, так как не инактивируются продукты, образовавшиеся в реакции с СОД. Таким образом, можно сказать, что снижение каталазной активности может привести к дисфункции инсулярного аппарата, а в дальнейшем и к диабету. Это предположение подтверждает одно из исследований, посвященное изучению связи акаталаземии и склонности к диабету [121]. Однако данные исследований не могут дать однозначного ответа о роли КАТ в патогенезе того или иного заболевания [32,33].

По мнению одних авторов, значимых различий по активности СОД и ГПО в группе пациентов с СД 2 типа и группой сравнения не найдено [179]. При проведении экспериментов *in vivo* и *in vitro* при инкубации эритроцитов с МДА и метилглиоксалем значительно снижается активность СОД и КАТ [172]. Обширное сравнительное исследование показало, что при СД 2 типа активность СОД, ГПО и КАТ выше, чем при СД 1 типа, но ниже, чем в группе сравнения. Однако повреждения ДНК сильнее и репарация ДНК хуже при СД 2 типа, чем при СД 1 типа, что подтверждает вышеизложенную теорию о генотоксичности и «метаболической памяти» [151].

Церулоплазмин является транспортным белком для ионов меди, а также участвует в метаболизме железа, антиоксидантной защите, свертывании крови и тканевом ангиогенезе. При инкубации церулоплазмينا с метилглиоксалем наблюдается интенсивная агрегация белковых молекул, высвобождение ионов меди и в конечном счете, потеря энзиматической активности. Данные нарушения могут объяснить внутриклеточные повреждения, которые имеют место у пациентов с СД, так как церулоплазмин играет важную роль в защите клеток от АФК за счет своей железозоксидазной и тиол-зависимой пероксидазной активности. Более того, высвобожденные ионы меди провоцируют СРО макромолекул. Содержание церулоплазмينا может повышаться при воспалении, травме и ОС, играя роль острофазового белка, либо резко снижаться из-за коагуляции с высвобождением ионов металла [90]. Также ранее было показано, что аминокетон - источник метилглиоксаля в организме - также способен вызывать коагуляцию церулоплазмينا и потерю им антиоксидантных свойств [78].

В другом исследовании выявлена отрицательная корреляция между уровнем глюкозы плазмы натощак у пациентов с СД 2 типа и церулоплазмينا ($r = -0,420$, $P < 0,001$), а также с суммой тиолов ($r = -0,565$, $P < 0,001$). Более того, тиольные группы положительно коррелировали с уровнем церулоплазмينا [91].

Существуют также данные и о том, что уровни церулоплазмينا и гаптоглобина не изменяются у пациентов с СД 2 типа наряду с клинически значимым увеличением содержания карбонильных производных и продуктов ПОЛ [91].

Гаптоглобин - это острофазовый белок, который обладает противовоспалительным и антиоксидантным эффектом. Гаптоглобин предотвращает ОС в тканях из-за свободного гемоглобина. Например, гаптоглобин способен защищать ЛПОНП и ЛПНП от индуцированного медью (которая, возможно, выделилась при коагуляции церулоплазмина) окисления. В опыте на животных доказано антиоксидантное действие гаптоглобина на начальных этапах развития диабета. Чем выше уровень гаптоглобина, тем меньше уровень свободного железа.

Гаптоглобин и церулоплазмин находятся в постоянном динамическом балансе друг с другом [79, 123].

1.2. Интегральные способы оценки окислительного стресса у больных сахарным диабетом 2 типа

Биомаркерами являются продукты реакций или промежуточные метаболиты процессов, составляющих ОС. Выбор какого-то одного маркера не всегда однозначен и может не отражать суть происходящих процессов в организме при том или ином заболевании. Тем не менее, есть общепризнанные показатели, которые условно отражают определенный патологический процесс. Данные параметры выбраны ввиду своей высокой токсичности или ключевой роли в процессе. Для оценки окислительного стресса исследователи выбирают наиболее подходящий, по их мнению, биомаркер.

Высокой чувствительностью обладают хемилюминесцентные методы определения АФК. Регистрация хемилюминесценции позволяет оценить количество перекисных радикалов, т.е. проанализировать способность биологического объекта к перекисному окислению липидов. Для определения максимальной интенсивности СРО используют индуцируемое перекисью водорода свечение. Величина I_{max} пропорциональна уровню СРО. На графике выделяют область под кривой и ее площадь S . Величина $1/S$ отражает величину общей антиоксидантной активности, $tg\alpha_2$ — тангенс угла убывания сигнала после достижения максимальной интенсивности, характеризует скорость реакций обрыва цепи процессов СРО, явля-

ется показателем активности антиоксидантной системы. Чем больше значение $tg\alpha_2$, тем напряженной ОАА [14,15,25,28,29].

МДА является интегральным показателем окислительного стресса. МДА образует с мембранами клеток соединения, которые препятствуют их текучести, в результате чего нарушается целостность мембран. Кроме того, МДА образует с аминокетонами белков нерастворимые липид-белковые соединения, так называемые «пигменты изнашивания» [22,27,]. Также было доказано, что МДА имеет строго пропорциональную сильную связь с интенсивностью индуцированной хемилюминесценции и ОМБ [26,14,15]. Таким образом, МДА является интегральным показателем процесса СРО и является наиболее динамичным, в связи с чем, с его помощью возможно отследить фармакологическое влияние. В то же время ОШ являются конечным продуктом ПОЛ. Это соединения, образованные альдегидами и аминокетонами. ОШ менее динамичны и их снижение можно наблюдать при более длительном приёме препаратов [26,28,29,36].

Множество параметров и показателей можно использовать для описания состояния систем при окислительном стрессе. Однако необходимо также изучать динамику процесса индивидуально, например, для оценки эффективности подобранной терапии. Сложность интерпретации лабораторных данных заключается в том, что часто для показателей ОС нет определенных нормативов и сравнение часто проводят с группой относительно здоровых лиц. Однако отсутствие заболевания не говорит о том, что каскад СРО не запущен. Дифференцировать здоровых и пациентов с начальной стадией патологии становится все труднее ввиду возрастных особенностей, экологии, социального статуса.

Решением проблемы индивидуализации данных может быть введение персональных коэффициентов для описания процессов. Так, например, один из предложенных коэффициентов выявляет дисбаланс антиоксидантной защиты. Рассчитывают отношение активности КАТ к СОД. При значении соотношения этих показателей, равном $1,000 \pm 0,002$, констатируют отсутствие дисбаланса ферментативной антиоксидантной защиты. Данный коэффициент был назван ИПФФАРЗі -

интегральный показатель функционирования ферментов антирадикальной защиты обследуемого [44].

Также предлагают определять отношение ДК, МДА и степень окисленности липидов к уровню эндогенных антиоксидантов - церулоплазмина и альфа-токоферола. Если интегральный показатель более 1,12, то это свидетельствует об ОС [43].

Предлагают комплексно оценивать ОМБ как часть ОС по сумме площадей под кривыми при измерении АДФГ и КДФГ нейтрального и основного характера спектрофотометрическим методом, используя соответствующие длины волн УФ-спектра и видимого спектра. Таким образом, предполагают, что можно охватить наибольший спектр повреждений [47].

Подобные коэффициенты могут также быть использованы с прогностической целью при конкретном состоянии. Например, коэффициент отношения произведений интегральных показателей липопротеинов низкой плотности и МДА к показателям глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы можно использовать для прогнозирования течения раневого процесса при синдроме диабетической стопы. При значении равном или более 3,0 прогнозируют неблагоприятное развитие процесса [46].

К.Н. Конторщикова с соавт. (2000) предлагают оценивать состояние СРО по параметрам липопероксидации, в частности, направленность ПОЛ - по отношению уровня конечных продуктов (ОШ), более стойких, к промежуточным (ДК и ТК), менее стойким, но не менее токсичным [28,29]. Еще один способ оценки заключается в определении отношения уровня ОШ к ДК, что является коэффициентом дестабилизации мембран клеток [45].

Диагностика и контроль течения СД 2 типа на сегодняшний день производятся несколькими общепризнанными мировым научным сообществом методами. Они заключаются в определении уровня глюкозы плазмы крови натощак и при глюкозной нагрузке, и также процентного содержания гликированного гемоглобина. Данные, полученные этими способами, являются и показателем декомпенсации углеводного обмена при сахарном диабете [1,2,4].

Степень компенсации достигается при помощи различных комбинаций медикаментозной терапии и сочетания диетотерапии с физической активностью. Но не всегда возможно подобрать сразу корректную схему терапии из-за различных индивидуальных особенностей организма и переносимости того или иного лекарства. Эффективность принятой схемы определяется по уровню глюкозы плазмы крови и гликированного гемоглобина.

Данные известные способы унифицированы и общепризнанны. Однако существуют некоторые ограничения и погрешности применения этих методов, так как они являются опосредованными, то есть результат может быть получен только после постановки реакций, для которых необходимы дорогостоящие реактивы. В то время, как метод клиновидной дегидратации не требует химических реактивов и является прямым методом, так как отражает различные межмолекулярные взаимодействия веществ на тизиограмме [66].

Известен метод клиновидной дегидратации, который был разработан С.Н. Шатохиной и В.Н. Шабалиным [66] для оценки структуры биологических жидкостей. Оценивают организацию и количество микроструктур в зонах фации. В центральной зоне концентрируются, в основном, солевые соединения, в периферической зоне идет формирование структур в зависимости от количества и качества белковых соединений. В итоге специалист оценивает структуру и морфологическую картину фации [31].

Специфические образования соответствуют определенным нарушениям в организме. Так, например, при нарушении липидного обмена наблюдается картина трещин в центральной зоне «рыбья чешуя», а для воспалительных заболеваний характерны трещины в виде «завитков». Многолучевые трещины могут возникать при нарушении метаболизма мочевой кислоты. Линии Валнера – «морщины и бляшки» были выделены авторами как маркеры воспаления [31,66]. Нашим коллективом была выдвинута и подтверждена гипотеза, что количество таких микроструктур, как «языки Арнольда» в количестве 6 и более соответствуют состоянию декомпенсации СД 2 типа. Уровень гликозилированного гемоглобина и высокое

содержание глюкозы плазмы крови неразрывно связаны, что не может не сказаться на конформации белковых и других молекул фации [48].

1.3. Фармакогенетика метформина. Полиморфизм генов, влияющих на фармакокинетику и фармакодинамику метформина

Препаратом выбора для начала терапии заслуженно считается метформин [1-4, 11,24,56]. Основным механизмом действия препарата из группы бигуанидов, повышающего печеночную и периферическую чувствительность к эндогенному инсулину, не влияя на его секрецию, является снижение продукции глюкозы печенью [1,2,30], повышение захвата глюкозы мышцами и жировой тканью путем усиления связывания инсулина с рецепторами и повышения активности транспортеров глюкозы ГЛЮТ-1 и ГЛЮТ-4. Механизмам действия препарата в отечественной и зарубежной литературе посвящены многочисленные публикации [11,20,24,30,56,88,100,105,106,107,111,143]. Снижение уровня гликированного гемоглобина при его применении наблюдается в пределах 1,0-2,0% [1, 2, 4].

Особый интерес представляют фармакогенетические исследования применения метформина ввиду того, что данный препарат используется в медицинской практике более полувека и является первым этапом медикаментозной терапии СД 2 типа [94,120,126,129,138,141,142,144,149,152,154,156,158,159,168,169,175,177]. Эффект метформина зависит от всасывания, транспортировки, распределения и выведения вещества [116,117]. При этом существуют разночтения по поводу влияния полиморфизмов транспортеров органических катионов (ОСТ1 и ОСТ2) на сахароснижающий эффект метформина [119, 129,152,169,177]. Определена роль полиморфизма гена SLC22A3 [159] и гена SLC47A1 [154] в формировании фармакологического ответа на метформин. В исследовании GoDARTS выявлено 4 полиморфизма гена SLC22A1, кодирующего ОСТ1, для одного из которых выявлена ассоциация с наиболее эффективным снижением уровня гликированного гемоглобина [158]. В азиатской популяции ОСТ1 не играет такую важную роль, как в европейской, поэтому этническая принадлежность пациента может внести

свой вклад в изменение фармакокинетики и фармакодинамики препарата [132]. Другие белки - MATE1 и MATE2 - также могут влиять на эффект метформина за счет уменьшения выделения из организма [127,133]. Выявленные полиморфизмы MATE1 и MATE2 ассоциированы с увеличением эффекта метформина вдвое ($r^2=0,8$). Однако при недостаточности экспрессии гена-переносчика OAT1 выявленные полиморфизмы MATE 1 и 2 не оказывают должного позитивного эффекта [71].

В связи с тем, что молекула метформина не подвергается метаболизму в организме пациента, параметры фармакокинетики, такие как AUC, почечный клиренс и другие, а также влияние на них полиморфизма генов белков-переносчиков являются предметом многочисленных исследований [177] (Таблица 1).

Таблица 1 - Однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) генов, участвующих в фармакокинетике метформина

Референсный сиквенс	ДНК	ОНП	Эффект (значение)
1	2	3	4
SLC22A1 (OAT1) транспортер органических катионов 1			
rs12208357	-43T>G	R61C	ассоциирован с лучшим ответом на метформин [129]
	181C>T		увеличение AUC метформина, более высокая C_{max} , ниже объем распределения [169]; меньше побочных эффектов [101]; увеличенный почечный клиренс [169]; отсутствие ассоциации с ответом на метформин [158]; меньший эффект метформина на уровень гликированного гемоглобина [175]
rs683369	480G>C	L160F	низкая эффективность метформина [94]

Продолжение таблицы 1			
rs34130495	1201G>A	G401S	увеличение AUC метформина, более высокая C_{max} , ниже объем распределения [102]; меньше побочных эффектов [101]; увеличенный почечный клиренс [169]; отсутствие ассоциации с ответом на метформин и меньший эффект метформина на уровень HbA_{1c} [175]
rs72552763	1365GAT>del	420del	увеличение AUC метформина, более высокая C_{max} , ниже объем распределения, меньше побочных эффектов, ниже эффективность [101,102,126,175]; увеличенный почечный клиренс [169]
rs34059508	1393G>A, 1393G>C	G465R	увеличение AUC метформина, более высокая C_{max} , ниже объем распределения, меньше побочных эффектов, ниже эффективность [101,102,175]; увеличенный почечный клиренс [169]
rs628031	1222A>G	M408V	отсутствие эффекта метформина [129]; меньше побочных эффектов [83]
rs622342	интрон	-	меньший сахароснижающий эффект [118]; нет ассоциаций с эффективностью [154,175]; низкая концентрация в крови [175]; неэффективность при профилактике СД2 [94]
rs461473	интрон		высокая сахароснижающая эффективность метформина [175]
rs36056065	8 bp инсерция		меньше побочных эффектов [83]
SLC22A2 (OCT2) транспортер органических катионов 2			

Продолжение таблицы 1			
rs316019	495A>G	M165I	изменение функции транспортера <i>in vitro</i> ; отсутствие изменения транспорта <i>in vivo</i> [156]
	596C>T	T199I	изменение функции транспортера <i>in vitro</i> [132]; уменьшенный почечный клиренс и более высокая C_{\max} [152]
	602C>T	T201M	изменение функции транспортера <i>in vitro</i> [132]; уменьшенный почечный клиренс и более высокая C_{\max} [152]; нет ассоциаций с эффективностью [129]
	808G>T	A270S	сниженный транспорт <i>in vitro</i> , но не <i>in vivo</i> [156]; сниженный почечный клиренс и либо более высокая C_{\max} [152], либо C_{\max} не изменяется [149]; увеличенный почечный клиренс [149]; нет ассоциации с ответом на метформин [129, 154, 175]; нет ассоциации со способностью предупреждения СД 2 типа [94]; увеличенный почечный клиренс у здоровых добровольцев [71]
rs8177516	1198C>T	A400C	измененная функция транспортера <i>in vitro</i> ; не влияет на транспорт метформина <i>in vivo</i> [159]
	1294A>C	K432G	измененная функция транспортера <i>in vitro</i> ; не влияет на транспорт метформина <i>in vivo</i> [159]
rs662301	интрон		более эффективное предотвращение развития СД2 [94]

Продолжение таблицы 1			
SLC22A3 (OCT3) транспортер органических катионов 3			
rs8187715	-	T44M	увеличенный захват метформина энтероцитами <i>in vitro</i> [159]
rs8187717		A116S	сниженный захват метформина энтероцитами <i>in vitro</i> [159]
rs8187725		T400I	сниженный захват метформина энтероцитами <i>in vitro</i> [159]
SLC47A1 (MATE1) универсальный транспортер лекарственных препаратов и токсинов 1			
rs2289669	интрон	-	более эффективное снижение уровня гликированного гемоглобина [119, 154]; нет ассоциаций уровня метформина с его побочными эффектами и его влиянием на уровень гликированного гемоглобина [175]
rs8065082	интрон		лучшая профилактика СД2 [94]
rs2252281	g.-66T>C		сниженная активность промотера гена MATE1; повышенная эффективность метформина [131, 168]; нет ассоциации со снижением гликогемоглобина [175]; повышает почечный клиренс метформина [71]
rs111060521	28G>T	V10L	нормальная функция транспортера <i>in vitro</i> [133]
rs111060524	191G>A	G64D	сниженная функция транспортера <i>in vitro</i> [103,133]; не влияет на фармакокинетику <i>in vivo</i> [68];

Продолжение таблицы 1			
	373C>T	L125F	снижена функция транспортера <i>in vitro</i> [103]; не влияет на <i>in vivo</i> [127]
rs35790011	1012G>A	V338I	снижена функция транспортера <i>in vitro</i> [103]
	1438G>A	V480M	сниженная функция транспортера <i>in vitro</i> [103]
rs35395280	1490G>C	C497S	сниженная функция транспортера <i>in vitro</i> [103]
	1557G>C	Q519H	нормальная функция транспортера <i>in vitro</i> [103]
rs111060527	983A>C	D328A	не влияет на фармакокинетику <i>in vivo</i> [127]
rs2289669/rs8065082	интрон	-	более эффективное действие метформина [119, 154]; нет ассоциации с уровнем снижения гликированного гемоглобина [175]; высокая эффективность профилактики СД2 [94]
SLC47A2 (MATE2-K) универсальный транспортер лекарственных препаратов и токсинов 2 (почечный)			
rs12943590	g.-130G>A	-	повышена активность промотера гена MATE2-K [68, 168]; нет эффекта [68]; менее выражены побочные эффекты [168]
PMT5634	485C>T	P162L	уменьшенный почечный клиренс метформина и синтез переносчика MATE2-K <i>in vitro</i> [68]

Продолжение таблицы 1			
rs111060532	632_633GC>T T	G211V	уменьшенная функция транспортера <i>in vitro</i> [133]; нет влияния на фармакокинетику <i>in vivo</i> [127]
rs34399035	1177G>A	G393R	уменьшенный почечный клиренс метформина и синтез переносчика МАТЕ2-К <i>in vitro</i> [68]; нет ассоциаций с сахароснижающим эффектом [175]

Одно из новейших исследований посвящено изучению влияния полиморфизма rs4523977 гена HAP-1 (протеин, ассоциированный с хореей Гантингтона) на степень снижения гликированного гемоглобина под действием метформина в течение 1 года. При наличии GG генотипа данного гена гликированный гемоглобин снижается менее эффективно, чем при его гетерозиготном (GA) состоянии. Также была выявлена связь между полиморфизмом rs10194115 гена TTC7A, известного как GIDID; MINAT (tetra-tricopeptide repeat domain 7A - кодирует синтез протеина с тетра-трикопептидными повторами, который необходим для нормального развития слизистой кишечника) и эффектом метформина. Носители TT-генотипа достигали в большинстве случаев целевых значений HbA1c, в то время как носители GT и GG генотипов не достигали [138].

Однако не только естественный фенотип пациента может влиять на эффективность того или иного препарата, но и лекарственное взаимодействие оказывает эффект, который может оказаться терапевтически значимым.

К 2015 году число проводимых исследований, в которых изучаются гены-кандидаты, увеличилось [7,12,13,42, 95]. В том числе появились данные о полиморфизмах генов, определяющих эффективность метформина [8]. Бондарь И. А. и соавт.(2015) связывают наличие полиморфного локуса rs11212617 гена ATM с ответом на терапию метформином у больных сахарным диабетом 2 типа в Новосибирской области [8].

В частности, появились противоречивые сведения о потенциальной роли однонуклеотидных полиморфизмов генов эндотелиальной синтазы оксида азота

[57,82,108,109,110,147,165,180], 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы [81,85,86,113,170] и белка p53 в патогенезе и прогрессировании СД 2 типа [70,73,80,136,160,163,164,174]. Было предположено, что данные гены могут служить не только мишенями для препаратов, но и формировать специфический фармакологический ответ [20].

1.4. Фармакогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота

Существует ряд полиморфизмов гена, кодирующего эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), часть из которых связаны с изменением в плазме крови содержания NO (оксида азота), в частности, замещение гуанина тимидином в 894 позиции в экзоне 7 (894G>T полиморфизм) связано с уменьшением базального синтеза NO; полиморфизм в промоторе 786T>C приводит к значительному сокращению количества самого фермента eNOS [38, 39, 162].

Ввиду того, что в геноме млекопитающих 3 гена кодируют 3 разных подтипа NOS, которые ответственны за ферментативное превращение L-аргинина в оксид азота в различных клетках под влиянием разных стимулов, роль каждого из генов должна быть определена. 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. В то же время показано, что блокирование как индуцибельной, так и нейрональной NOS существенно не влияет на инсулинорезистентность и углеводный обмен [110]. Промотор гена eNOS содержит несколько доменов, то есть может регулироваться рядом факторов транскрипции. Полиморфизмы гена eNOS определены в 11 местах, 8 из которых выступают в качестве возможных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Изученными являются полиморфизм 4a/b интрона, полиморфизм G894T (Glu298Asp) 7-го экзона и полиморфизм C786T (rs 2070744) промотора гена eNOS [117]. Полиморфизм G894T имеет различное значение в зависимости от этниче-

ской принадлежности пациента (азиаты и европейцы) и имеет неоднозначный характер, в то время как нет функциональных различий ОНП С786Т для разных этнических групп. Тем не менее, в некоторых исследованиях была выявлена ассоциация генотипа гомозиготы по аллели Т с инсулинорезистентностью у пациентов с СД 2 типа и кардиомиопатиями среди европейцев [165] и японцев [166], а также с повышенным уровнем глюкозы в крови у жителей Саудовской Аравии [180].

Результаты эксперимента, проведенного на грызунах, показали, что полученная вследствие трехмесячной высококалорийной диеты инсулинорезистентность у животных сопровождается нарушением фосфорилирования – активации - eNOS. Более того, инсулинорезистентность формирует «метаболическую память», и активность эндотелиальной синтазы оксида азота не восстанавливается даже через 6 месяцев низкокалорийной диеты при условии нормализации липидного профиля [167].

В эксперименте также показано, что метформин активирует АМФК (АМФ-активируемую протеинкиназу), что приводит к увеличению фосфорилирования эндотелиальной синтазы оксида азота, повышению продукции NO, что обуславливает компенсацию эндотелиальной дисфункции [3,11,30]. Также известно, что метформин является структурным аналогом ассиметричного диметиларгинина (АДМА), который подавляет выработку NO, и по механизму конкурентного ингибирования не допускает образования неактивного комплекса «синтаза оксида азота – АДМА» [88], одновременно повышая активность фермента.

Роль уровня NO, в частности, его снижение ввиду ОС и образования пероксинитрита имеет большое значение в вероятности наступления таких осложнений СД 2 типа, как нефропатия [82,147], ретинопатия [108], гипертензия и сердечная недостаточность. Однако обладает двойственной природой - как анти-апоптотической, так и проапоптотической в отношении различных тканей, и единого мнения в отношении NO и апоптоза на данный момент нет [13].

Выявлена ассоциация более ранней манифестации хронической сердечной недостаточности при гетерозиготном гаплотипе ОНП eNOS С786Т (rs2070744)

[84]. Также была доказана ассоциация Т аллеля данного полиморфизма с развитием диабетической нефропатии [82], особенно в сочетании с Asp298/4a/ гаплотипами полиморфизмов eNOS [165]. В другом исследовании выявлена связь С аллеля ОНП eNOS C786T (rs2070744) с развитием диабетической кардиомиопатии [122].

1.5. Фармакогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы

Генотоксический эффект окислительного стресса при диабете доказан в обширном исследовании, свидетельствующем о том, что повреждение генетического материала у пациентов с СД 2 типа более значительно, чем при СД 1 типа [151]. Наиболее информативным показателем повреждения ДНК считается 8-оксогуанин, устранение которого находится в прямой зависимости от функционирования системы репарации, представителем которой является 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (hOGG1 1 α в ядре, 1 β в митохондриях). Будучи невырезанным, 8-оксогуанин вызывает трансверсии мтДНК и нарушает функционирование дыхательной цепи, что приводит к генерации свободных радикалов [5,6,35,40,53].

Доказано, что hOGG1 играет ключевую роль в устранении повреждений мтДНК вследствие митохондриального стресса, вызванного высоким содержанием свободных жирных кислот, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию IRS-1 (субстрат-инсулинового рецептора -1), далее фосфорилированию Akt2 (RAC-бета серин/треониновая протеинкиназа (продукт гена akt2)), что, в конечном счете, улучшает перемещение ГЛЮТ-4 на плазматическую мембрану и обеспечивает утилизацию глюкозы клетками [170].

В исследованиях была показана строгая ассоциация полиморфизма C977G (Ser326Cys), в частности аллеля G (Cys), с инсулинорезистентностью у пациентов с предиабетом, повышенными показателями ИМТ и уровнем глюкозы крови [85,86,113,170].

Ввиду предположения, что ОНП hOGG1 rs1052133 вовлечен в развитие инсулинорезистентности, эффективность применения метформина, как препарата, направленного на устранение резистентности к инсулину, вероятно, будет варьировать у пациентов с различными гаплотипами данного полиморфизма.

Согласно исследованиям «метформин-положительным» гаплотипом данного ОНП является CG (гетерозигота), так как у данных представителей наблюдается наиболее выраженное снижение показателей гликемии [21].

1.6. Фармакогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма гена белка p53

Ген TP53 и кодируемый им белок p53 вовлечены в регуляцию клеточного ответа на стрессорные воздействия путем остановки клеточного цикла в контрольных точках для осуществления репарации ДНК, либо индукции апоптоза в случае невозможности устранения ее повреждений. Утрата функции гена p53 наблюдается практически в каждом случае злокачественных заболеваний, а недостаточность его экспрессии приводит к развитию опухолей [53, 63, 65].

Полиморфизм кодона 72 (Arg72Pro, rs1042522) связан с инсулинорезистентностью [70] и массой тела пациентов с СД 2 типа [136]. Показано, что G-аллель (Arg) полиморфизма белка p53 (rs1042522) ассоциирована с более высоким риском СД 2 типа у 55521 европейцев [164]. В другом исследовании выявлена ассоциация между полиморфизмом p53 и СД 2 типа, но зависимости от аллелей не обнаружена. Обширное исследование, проведенное на более чем 2000 пациентов с 222 генами-кандидатами, которые увеличивают риск возникновения СД 2 типа, показало, что полиморфизм гена TP53 является одним из трех генов-кандидатов с большой статистической значимостью [95].

Врожденный гиперинсулинизм, вызванный мутацией глюкокиназы, ассоциирован с апоптозом бета-клетки поджелудочной железы. Генетически измененная активность глюкокиназы повышает активность супрессорного белка p53. Терапия аналогами ГПП-1 или делеция p53 останавливает гибель бета-клеток в ре-

зультате активации глюкокиназы. Но только терапия инкретиномиметиками способна сохранить функцию бета-клетки. Можно сделать предположение, что повреждение ДНК и измененная активность белка p53 играют ключевую роль в развитии гиперинсулинемии и гипергликемии при СД 2 типа [174]. Также было выявлено, что полиморфизм TP53 совместно с полиморфизмом ядерного фактора репарации 1 увеличивают риск СД 2 типа в три раза [178].

Как известно, метформин реализует свои эффекты через активацию АМФК, депрессия которой наблюдается при метаболическом синдроме, сахарном диабете и раке. В свою очередь, АМФК регулирует экспрессию белка p53. Нарушенная регуляция приводит к последствиям, развивающимся по двум путям – злокачественный рост, либо апоптоз клеток, что является причиной недостаточности бета-клеток, а значит и прогрессирования СД 2 типа [178]. Таким образом, метформин предотвращает апоптоз клеток инсулинового аппарата, по-видимому, через увеличение экспрессии белка p53.

При изучении связи СД 2 типа с модификацией генов выявлено, что у субъектов с СД 2 типа четко выражено снижение активности синтазы оксида азота и белка p53, значительно снижен уровень оксида азота [136]. Результаты этого исследования еще раз доказывают патологическую связь ОНП генов и метаболических нарушений при СД 2 типа. В дальнейшем было неоднократно показано, что снижение уровня белка p53 и полиморфизм TP53 неразрывно связаны с возникновением инсулинорезистентности, нарушенной толерантности к глюкозе и СД 2 типа [95, 160,164,174,178]. Следовательно, эффективность метформина, как препарата, снижающего инсулинорезистентность, может варьировать в зависимости от гаплотипа ОНП rs1042522 белка p53.

1.7. Некоторые плеiotропные эффекты метформина

В многочисленных исследованиях были доказаны как сахароснижающие, так и антиоксидантное свойство препарата, что является одним из важных плеiotропных эффектов, поскольку окислительный стресс играет существенную роль в

патогенезе и прогрессировании СД 2 типа [9,10, 26, 32, 33, 36,55, 87,92]. Была выявлена способность молекулы метформина тормозить образование конечных продуктов гликозилирования (КПГ), связывать альфа-оксоальдегиды метилглиоксаль и глиоксаль, стимулировать антиоксидантную защиту независимо от сахароснижающего эффекта [36,88]. Молекула метформина связывается с МДА (малоновым диальдегидом) вместо молекул таких аминокислот, как лизин, аргинин, цистеин. В результате предотвращается повреждение белковых структур продуктами ПОЛ и ОМБ [24,36,92,97,98,105].

Исследования последних лет убедительно подтвердили, что метформин уменьшает неблагоприятное влияние окислительного стресса на развитие сосудистых осложнений СД [30,56,88]. Метформин снижает индуцированную лептином продукцию АФК и активность протеинкиназы С [92]. Кроме того, доказано, что метформин незначительно, но повышает активность основных антиоксидантов – супероксиддисмутазы, каталазы и глутатиона [100]. Исследования в данной области продолжаются и в настоящее время. Так, в недавнем исследовании было подтверждено снижение уровня маркеров окислительного стресса (конечные продукты гликирования, продукты окисления белков) у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа на фоне терапии метформином в течение 3 месяцев [105]. Таким образом, уменьшение генерации АФК и активация эндогенных антиоксидантных систем могут рассматриваться в качестве одного из вазопротективных эффектов метформина [30,56,140].

Существуют также данные некоторых клеточных экспериментов, которые предполагают, что длительный прием метформина снижает порог стресс-индуцированного старения за счет увеличения чувствительности клеток к онкогенным стимулам, таким как повреждение ДНК [141]. Однако такие исследования немногочисленны и имеют ряд существенных ограничений.

С другой стороны, ряд исследований доказывает, что метформин снижает вероятность возникновения опухолей разных тканей. В том числе и рака поджелудочной железы на генном уровне, путем подавления экспрессии специфического гена SHH (sonic hedgehog) [144]. Также доказан противоопухолевый эффект мет-

формина при лечении рака груди различных типов. При этом механизмы противоопухолевого эффекта могут быть разными, связанными с АМФактивированной–киназой, экспрессией генов или модуляцией ответа клеток.

В одном из исследований было выявлено, что гипергликемия и ожирение приводят к повышенному содержанию белка p53, который в норме является онко-супрессором. Но в данном состоянии преобладание p53 подавляет активность АМФКиназы и SIRT1, что приводит к прогрессированию заболевания. Метформин способен активировать АМФКиназу и SIRT1, реципрокно понижая уровень p53. Также необходимо отметить, что при понижении p53 под действием метформина, как *in vitro*, так и *in vivo* у пациентов не увеличивался, а даже снижался риск развития онкологических заболеваний [141].

Как показывали исследования, как при монотерапии метформином, так и в комбинации с другими препаратами, уровень компенсации гликированного гемоглобина <7,0% достигают от 64% до 75% пациентов с сахарным диабетом 2 типа при условии максимальной приверженности лечению [24]. Однако у 25%-36%, то есть от 1/4 до 1/3 пациентов, не отмечается такой компенсации. В связи с этим, проводятся исследования по поиску ассоций полиморфных генов с резистентностью к применяемым препаратам [11,20,21,54,59,94]. Причина неэффективности и «эффект ускользания» от сахароснижающей терапии метформином на данный момент остается не до конца ясной.

1.8. Резюме

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что эффективность сахароснижающей терапии зависят не только от своевременного начала приема пероральных сахароснижающих препаратов, но и от генетических особенностей организма пациента. Полиморфизмы генов как сами, так и в совокупности с другими факторами влияют на успех фармакологического воздействия, определяют категории пациентов, которые в той или иной степени подвержены действию препарата, обладая так называемым «фенотипом ответа». Задачей

фармакогенетики также является выявление фенотипа неэффективности с целью устранения нерациональной сахароснижающей терапии.

Оценка значения ОНП генов, непосредственно не связанных с фармакокинетикой и фармакодинамикой сахароснижающих препаратов, в частности, метформина, для прогнозирования эффективности терапии ограничивается единичными исследованиями, вызывает особые затруднения, в том числе в интерпретации результатов из-за этнической, гендерной принадлежности и других интерферирующих факторов.

Из рассмотренных данных многочисленных исследований следует вывод, что необходимо критически подходить к обилию информации в области фармакогенетических изысканий для объективного прогнозирования клинических исходов. В связи с этим, следует изучать как ассоциированные непосредственно с СД 2 типа, так и полиморфные гены, формирующие специфический фармакологический ответ, а также другие гены, обуславливающие особенности метаболических процессов, ответственные за плеiotропные эффекты препарата, в частности, его влияние на окислительный стресс.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика и этапы исследования

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.

Для решения поставленных задач обследовано 169 человек, в том числе 89 пациентов с сахарным диабетом 2 типа.

Первичное обследование субъектов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа (89 человек) и лиц из группы сравнения (80 человек) включало в себя: исследование показателей гликемии (гликированного гемоглобина, уровень глюкозы плазмы крови и С-пептида), показателей липидного профиля (ОХ, ТГ, ЛПНП, ЛПОНП, ЛПВП, атерогенный индекс) и показателей системного воспаления (С-реактивный белок, фибриноген), показателей перекисного окисления липидов (МДА, ТК, ДК) и окислительной модификации белков (АДФГ, КДФГ), общей антиоксидантной активности ($1/S$, $tg\alpha 2$) и максимальной интенсивности индуцированной хемилюминисценции (I_{max}), активности антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ), содержание церулоплазмина и гаптоглобина, определение однонуклеотидных полиморфизмов (rs1042522, rs1052133, rs2070744).

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 2).

Таблица 2 – Характеристика групп объектов исследования, (Me[25p;75p])

Показатель	Группа обследованных	
	Основная СД 2 типа (n=89)	Сравнения 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, * - статистически значимое различие, p<0,05.

Второе обследование проводилось через 3 месяца назначенной медикаментозной терапии. Обследовались пациенты с впервые выявленным СД 2 типа.

Принимавшие участие в исследовании пациенты были распределены на группы по генотипу ОНП: rs2070744 гена эндотелиальной синтазы оксида азота (CC; CT; TT), rs 1052133 гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (CC;CG), гена белка p53 (CC;CG;GG) [27].

Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 StatSoft и Microsoft Excel. Проводилась оценка уровня значимости различий между двумя выборками с помощью параметрических и непараметрических критериев [51]. Для расчета отношения шансов использовался сертифицированный калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль» ГенЭксперт (онлайн http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

2.2. Характеристика групп объектов исследования

В исследовании участвовали только лица, отвечающие критериям включения:

1. Верифицированный диагноз сахарный диабет 2 типа давностью не более 1года.
2. Отсутствие ранее проводимой сахароснижающей терапии.
3. Пациенты обоих полов.
4. Возраст от 40 до 70 лет.
5. Гликированный гемоглобин (HbA1c) от 6,5 до 8,0%.
6. Индекс массы тела (ИМТ) до 40 кг/м².
7. Подписанное добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Сахарный диабет 1 типа.
2. Нарушенная толерантность к глюкозе и нарушение гликемии натощак.
3. Наличие тяжелых осложнений СД 2 типа.
4. Нарушенная функция печени, почек и сердечно – сосудистой системы.
5. Хронические заболевания в стадии обострения.
6. Несоответствие критериям включения.

Критерии досрочного прекращения участия в исследовании:

1. Отсутствие приверженности к терапии.
2. Проявление побочных эффектов метформина.
3. Отзыв информированного согласия.

По полу, возрасту, индексу массы тела группы обследованных статистически значимо не отличались друг от друга.

По наличию сопутствующих заболеваний и проводимой терапии группы пациентов также статистически значимо не различались. В основной группе и в группе сравнения у пациентов была артериальная гипертензия I – II ст., риск

IV (18,00 % и 16,25 % соответственно), желчекаменная болезнь (9% и 10% пациентов соответственно).

Препаратом метформина, используемого в исследовании, был выбран Глюкофаж (Nusomed). 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. Форма карты включала персональные данные, срок постановки диагноза, сопутствующие заболевания, назначенное лечение, контаминирующие препараты, результаты лабораторных исследований.

2.3. Характеристика проводимой фармакотерапии

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

Фармакологическое действие – гипогликемическое средство.

Понижает концентрацию глюкозы (натощак и после приема пищи) в крови и уровень гликозилированного гемоглобина, повышает толерантность к глюкозе. Уменьшает интестинальную абсорбцию глюкозы, ее продукцию в печени, потенцирует чувствительность к инсулину периферических тканей (повышается усвоение глюкозы и ее метаболизм). Не изменяет секрецию инсулина бета-клетками островков поджелудочной железы (уровень инсулина, измеряемый натощак, и суточный инсулиновый ответ могут даже понижаться). Нормализует липидный профиль плазмы крови у больных инсулинонезависимым сахарным диабетом: уменьшает содержание триглицеридов, холестерина и ЛПНП (определяемых натощак) и не изменяет уровни липопротеинов других плотностей. Стабилизирует или уменьшает массу тела.

Быстро всасывается из ЖКТ. Абсолютная биодоступность (натощак) составляет 50–60%. Стах в плазме достигается через 2 ч. Прием пищи понижает Стах на 40% и замедляет ее достижение на 35 мин. Равновесная концентрация

метформина в крови достигается в течение 24–48 часов, не превышает 1 мкг/мл. Объем распределения (для однократной дозы 850 мг) составляет (654 ± 358) л. Незначительно связывается с белками плазмы, способен накапливаться в слюнных железах, печени и почках. Выводится почками (преимущественно путем канальцевой секреции) в неизменном виде (90% за сутки).

Показания к применению. Сахарный диабет типа 2 (особенно в случаях, сопровождающихся ожирением) при неэффективности коррекции гипергликемии диетотерапией, в т.ч. в сочетании с препаратами сульфонилмочевины.

Противопоказания. Гиперчувствительность, заболевания почек или ренальная недостаточность (уровень креатинина больше 0,132 ммоль/л у мужчин и 0,123 ммоль/л у женщин), выраженные нарушения функции печени; состояния, сопровождающиеся гипоксией (в т.ч. сердечная и дыхательная недостаточность, острая фаза инфаркта миокарда, острая недостаточность мозгового кровообращения, анемия); дегидратация, инфекционные заболевания, обширные операции и травмы, хронический алкоголизм, острый или хронический метаболический ацидоз, включая диабетический кетоацидоз с комой или без нее, лактацидоз в анамнезе, соблюдение низкокалорийной диеты (менее 1000 ккал/сут), проведение исследований с применением радиоактивных изотопов йода, беременность, кормление грудью.

Ограничения к применению. Детский возраст (эффективность и безопасность применения у детей не определены), пожилой (старше 65 лет) возраст (вследствие замедленного метаболизма необходимо оценить соотношение польза/риск). Не следует назначать людям, выполняющим тяжелую физическую работу (повышен риск развития лактатного ацидоза).

Побочные эффекты. Диарея, метеоризм, лактоацидоз [17].

При проведении настоящего исследования метформин назначали по 850 мг (в 1 таблетке) 2 раза в сутки.

При проведении терапии метформином проводился обязательный контроль комплаентности пациентов, и ее уровень поддерживался в границах 80% -120 % [112].

Контроль проводился как при личном контакте лечащего специалиста - эндокринолога, так и при телефонном контакте с пациентом.

Расчет комплаентности велся по формуле:

$$\text{Комплаентность} = \frac{\text{количество принятых таблеток}}{\text{количество таблеток расчетное}} * 100\%$$

должное к приёму

2.4. Характеристика методов исследований

2.4.1. Лабораторные методы исследования

Для каждого пациента и лиц из группы сравнения была создана и заполнена индивидуальная карта. Форма карты включала персональные данные, срок постановки диагноза, сопутствующие заболевания, назначенное лечение, контаминирующие препараты, результаты лабораторных исследований.

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. Кровь из вены пациентов забирали утром, натощак, до приёма пищи и препаратов, после 12-и часов после последнего приёма пищи.

Гликозилированный гемоглобин (HbA_{1c}) определяли на жидкостном хроматографе Bio-Rad со стандартными наборами (France). Уровень С-пептида оценивали с помощью диагностических иммуноферментных тест-систем «Mercodia 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. Кровь забиралась у пациента натощак, в утренние часы (07.30 - 08.00) Сыворотку крови получали рутинным способом, а плазму - из крови, взятой с гепарином. Для проведения анализа в эритроцитах кровь центрифугировали при

3000 об/мин в течение 15 мин, плазму убирали, эритроциты промывали 3 раза изотоническим раствором хлорида натрия.

Интегральную интенсивность индуцированной хемилюминесценции (I_{\max}) и общую антиоксидантную активность (ОАА) определяли методом индуцированной хемилюминесценции на аппарате БХЛ-07. I_{\max} – максимальная интенсивность свечения, косвенно свидетельствующая об активности радикалообразования, измеряемая в мВ. ОАА измерялась в относ.ед., S – светосумма хемилюминесценции за определенное время, обратно пропорциональна антиоксидантной активности (ОАА) пробы. Данный показатель в относительной степени отражает содержание радикалов, соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления. ОАА – суммарная физико-химическая величина, характеризующая способность данного субстрата тормозить реакции окисления. Измеряли $\tan \alpha$, который отражает напряженность АОС. Чем больше значение тангенса угла, тем эффективнее работает АОС и тем меньше система истощена [6].

Молекулярные продукты ПОЛ плазмы крови (диеновые конъюгаты (ДК), триеновые конъюгаты (ТК), малоновый диальдегид (МДА)) определяли спектрофотометрическим методом. Измеряли в ед. опт.пл/ г.ол. [6].

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 $22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [25]. Измерения проводили на спектрофотометре Genesis 10UV, (Thermospectronic, USA).

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 мето-

да, 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 Hb мин) [6].

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. Анализу подвергали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. В смеси присутствовал интеркалирующий краситель SYBR Green, флуоресценция которого многократно возрастает при встраивании в образующийся двуцепочечный продукт. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллели 1; гетерозигота; гомозигота по аллели 2.

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 НПФ —ЛИТЕХ. 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.

2.4.2. Методы статистической обработки полученных данных

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

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

Характер распределения оценивали при помощи критериев Шапиро - Вилко и Колмогорова – Смирнова. Непараметрические данные описывали в виде медианы, нижнего квартиля (25 процентиль) и верхнего квартиля (75 процентиль) в формате (Me [25p; 75p]).

Для определения различий между двумя зависимыми и независимыми группами использовали критерии Вилкоксона и Манна-Уитни соответственно. При нормальном распределении переменных для определения различий между двумя зависимыми и независимыми группами применяли соответственно парный и непарный t-критерий Стьюдента.

Для оценки статистической значимости количественного содержания качественных показателей использовали параметр χ^2 с поправкой Йетса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05 [51]. Для расчета отношения шансов использовали сертифицированный калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль» ГенЭксперт (онлайн http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОФИЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

3.1. Показатели гликемии, липидного профиля, системного воспаления

Пациенты с впервые выявленным СД 2 типа соответствовали критерию включения (HbA_{1c}). Также важным фактом явилось то, что уровень С –пептида в основной группе и группе сравнения был сопоставим, что свидетельствует о сохранной функции бета-клеток поджелудочной железы у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа (Таблица 3).

Таблица 3 – Показатели гликемического профиля у пациентов с СД 2 типа и группы сравнения, (Ме [25p;75p])

Показатель		СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	p
HbA _{1c} ,%		7,47 [6,90;8,00]	5,10 [4,90;5,35]	< 0,001
С-пептид, нг/мл		2,33 [1,30;3,15]	2,25 [1,90;2,50]	0,981
Вариабель- ность гли- кемии, ммоль/л	натощак	7,95 [6,70;9,11]	4,45[4,25;4,90]	< 0,001
	через 2 ча- са после еды	11,60 [9,80;14,30]	5,53[4,60;7,00]	< 0,001

Примечание: - HbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

По нашим данным, у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа без тяжелых осложнений имеется нарушение липидного профиля, а именно – более низкий уровень антиатерогенной фракции липопротеинов – ЛПВП (на 7%), более высокое содержания триглицеридов (на 78%) и атерогенный индекс (на 60%), чем у лиц группы сравнения. По другим исследованным показателям липидного обмена и показателям системного воспаления и статистически значимых различий

между основной группой и группой сравнения не выявлено (Таблица 4). Это объясняется тем, что группа пациентов с СД 2 типа целенаправленно подбиралась в соответствии с критериями включения без наличия тяжелых сопутствующих заболеваний и осложнений сахарного диабета для максимальной объективизации углеводного обмена и вклада гликемических нарушений в процессы окислительного стресса.

Таблица 4 – Показатели липидного профиля, системного воспаления у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения, (Ме [25p;75p])

Показатель	СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	p
ОХ, ммоль/л	5,70 [4,50;6,30]	4,95 [4,50;5,80]	0,218
ЛПНП, ммоль/л	3,18 [2,60;3,90]	2,95 [2,60;3,20]	0,541
ЛПОНП, ммоль/л	0,94 [0,66;1,25]	0,66 [0,33;1,21]	0,228
ЛПВП, ммоль/л	1,26 [1,08;1,39]	1,35 [1,19;1,49]	0,026
ТГ, ммоль/л	2,23 [1,61;2,90]	1,25 [1,17;2,45]	0,040
АтИн	3,40 [2,96;4,26]	2,12 [1,45;3,02]	0,001
СРБ, мг/л	6,00 [4,00;8,00]	4,00 [3,20;5,00]	0,200
Фибриноген, г/л	3,50 [2,80;4,00]	3,15 [2,95;3,39]	0,170

Примечание: - ОХ – общий холестерин, ЛПНП - липопротеины низкой плотности, ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности, ЛПВП - липопротеины высокой плотности, ТГ – триглицериды, АтИн – атерогенный индекс, СРБ – С –реактивный белок, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

3.2. Показатели окислительного стресса

Как свидетельствуют результаты выполненных исследований, активация СРО присутствует даже при недлительно текущем СД 2 типа при относительно удовлетворительном уровне гликированного гемоглобина. Показатель I_{max} в этой группе больных статистически значимо увеличен на 9%, а общая антиокси-

дантная активность практически не изменена относительно группы сравнения. При этом не было отмечено напряженности антиокислительных процессов, о чем свидетельствует значение $tg\alpha 2$ (Таблица 5).

Таблица 5 - Показатели индуцированной хемилюминисценции у больных СД 2 типа и лиц из группы сравнения, (Ме[25;75])

Показатель	СД 2 типа (n= 89)	Группа сравнения (n=80)	p
I max,mV	1,925 [1,799;2,150]	1,765 [1,700;1,949]	p=0,038
ОАА, отн. ед.	0,063 [0,0475;0,086]	0,064 [0,056;0,126]	p=0,104
$tg\alpha 2$	-60,74[-65,5;-55,5]	-60,25 [-61,75;-57,25] ,	p=0,900

Примечание: - I max – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминисценции, ОАА – общая антиоксидантная активность, $tg\alpha 2$ – тангенс альфа (напряженность ОАА), p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Таким образом, данные позволяют сделать вывод о запуске «порочного круга» окислительных реакций даже при функционировании антиоксидантной системы, и компенсация усиленного ОС не происходит, по-видимому, вследствие истощения запасов АОС, что согласуется с данными других исследований [26,36]. Однако нельзя судить о состоянии АОС только по данным хемилюминисценции, поскольку в борьбу с ОС вовлечены различные ферменты и неферментативная АОС. Как свидетельствуют результаты проведенных исследований, у больных впервые выявленным СД 2 типа, относительно группы сравнения, активность СОД снижена на 18 %, а активность КАТ остается на уровне субъектов без сахарного диабета (Таблица 6).

Таблица 6 – Активность антиоксидантных ферментов у больных СД 2 типа и лиц из группы сравнения, (Me[25;75])

Показатель	СД 2 типа (n= 80)	Группа сравнения (n=80)	p
СОД, ед. акт./мг Нв мин	176,09[156,41; 220,68]	214,55 [170,78;233,34]	0,027
КАТ, ед. акт./мг Нв мин	25,03 [2,99;28,22]	26,22 [20,23;34,37]	0,299

Примечание: - СОД –супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Однако полученные данные свидетельствуют о том, что ОАА у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа остается примерно такой же, как и у лиц без нарушений углеводного обмена. Следовательно, можно предположить, что нагрузку по отражению атак АФК берет на себя неферментативная антиоксидантная система, в частности церулоплазмин, уровень которого у пациентов с СД 2 типа снижен на 39% относительно группы сравнения. Одновременно с этим наблюдается более высокое содержание гаптоглобина в крови пациентов с впервые выявленным СД 2 типа на 31% относительно группы сравнения (Таблица 7).

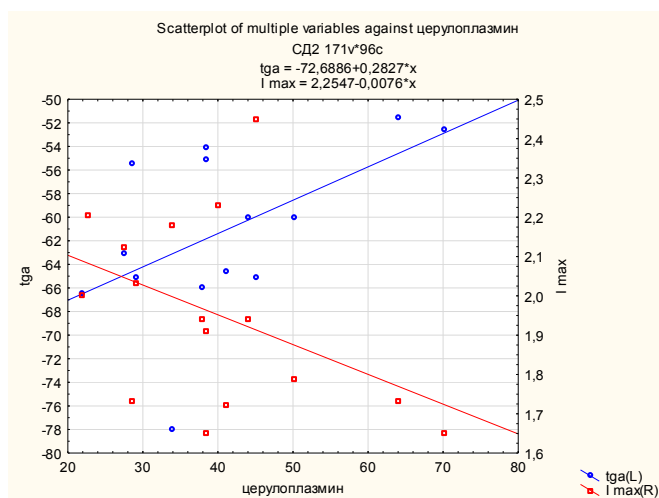
Таблица 7 – Показатели неферментативной антиоксидантной системы у больных СД 2 типа и лиц группы сравнения, (Me[25;75])

Показатель	СД 2 типа (n = 89)	Группа сравнения (n= 80)	p
Церулоплазмин, мг/л	31,16 [22,00;38,00]	50,89 [40,00;67,00]	< 0,001
Гаптоглобин, мг/дл	152,83 [103;260]	116,83 [94;144]	0,009
гаптоглобин/церулоплазмин	4,52[1,21; 8,93]	2,42 [1,28;3,00]	<0,001

Примечание: – p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Состояние неферментативной системы антиоксидантов у пациентов с СД 2 типа свидетельствует о том, что сформировался дисбаланс про- и антиоксидантных реакций. Существенное снижение уровня церулоплазмينا благоприятствует сдвигу равновесия окислительно-восстановительных процессов, а повышение уровня гаптоглобина свидетельствует о, возможно, компенсаторном антиоксидантом действии, а также, по – видимому, об интенсификации окислительных процессов в организме даже на начальной стадии СД 2 типа. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о несостоявшейся компенсации ОС даже при впервые выявленном СД 2 типа. При расчете предложенного О.В. Занозиной коэффициента направленности окислительного процесса [26], как отношения содержания гаптоглобина к церулоплазмину, был сделан вывод об интенсивном ОС у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа по сравнению с группой лиц без нарушений углеводного обмена (Таблица 7).

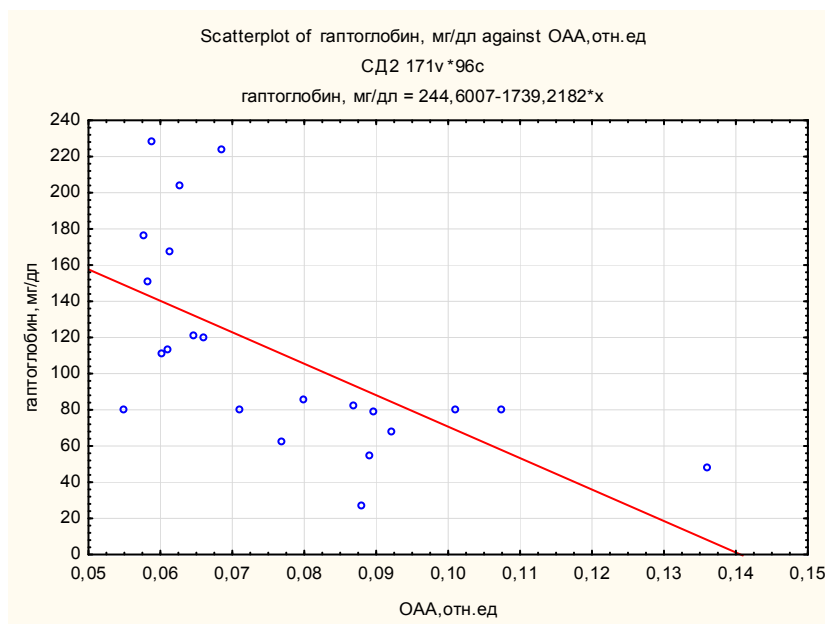
Антиоксидантные свойства церулоплазмينا косвенно могут подтвердить вычисленные нами коэффициенты корреляции, свидетельствующие о зависимости tga_2 от I_{max} и уровня церулоплазмينا ($r=0,76$ $p=0,048$; $r=-0,68$ $p=0,022$ соответственно), справедливые как для лиц группы сравнения, так и для пациентов с СД 2 типа. На рисунке 1 представлена взаимосвязь данных параметров: чем выше интенсивность свечения, тем ниже уровень церулоплазмينا и меньше tga_2 .



Примечание: – I_{max} – максимальная интенсивность свечения, tga_2 – тангенс альфа (напряженность АОС).

Рисунок 1 – Зависимость tga_2 , уровня церулоплазмينا и активности СРО.

В то же время гаптоглобин доказывает свою природу прооксиданта через обратную зависимость – с антиоксидантной активностью ($r = -0,6626$, $p = 0,049$) (Рисунок 2).



Примечание: – ОАА – общая антиоксидантная активность.

Рисунок 2 - Зависимость ОАА от концентрации гаптоглобина.

Состояние неферментативной системы антиоксидантов у пациентов с СД 2 типа свидетельствует о том, что сформировался дисбаланс про- и антиоксидантных реакций. Существенное снижение уровня церулоплазмينا благоприятствует сдвигу равновесия окислительно-восстановительных процессов, а повышение уровня гаптоглобина свидетельствует, возможно, о компенсаторном антиоксидантом действии, а также, по-видимому, об интенсификации воспалительных процессов в организме даже на начальной стадии СД 2 типа. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о несостоявшейся компенсации ОС даже при впервые выявленном СД 2 типа.

Окислительная модификация белков признается в настоящее время одним из ранних маркеров поражений ткани при СРО [22,25]. Анализ результатов исследования показал, что у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа относительно группы сравнения статистически значимо повышено содержание поздних

и ранних маркеров окислительной деструкции белка в покое: АДФГс - на 60%, КДФГс - на 50% (Таблица 8).

Таблица 8 – Содержание молекулярных продуктов ОМБ у больных СД 2 типа и лиц группы сравнения, (Ме [25p;75p])

Показатель	СД 2 типа (n= 89)	Группа сравнения (n= 80)	p
АДФГ-с, отн.ед.	0,0008 [0,0006;0,0010]	0,0005[0,0003;0,0007]	0,032
КДФГ-с, отн.ед.	0,0006 [0,0005;0,0010]	0,0003[0,0001;0,0005]	<0,01

Примечание: - АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные, КДФГс – кетон-динитрофенилгидразоны спонтанные, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

При оценке содержания молекулярных продуктов перекисного окисления липидов оказалось, что содержание ДК и МДА у больных СД 2 типа также статистически значимо превышает содержание аналогичных показателей у лиц группы сравнения (на 73% и в 2 раза соответственно) (Таблица 9).

Таблица 9 – Содержание молекулярных продуктов ОМБ и ПОЛ у больных СД 2 типа и лиц группы сравнения, (Ме [25p;75p])

Показатель	СД 2 типа (n= 89)	Группа сравнения (n= 80)	p
ДК, ед.опт.пл./г о.л.	0,1868 [0,1049;0,2461]	0,1139 [0,9122;0,1445]	0,021
ТК, ед.опт.пл./го.л.	0,0611 [0,0230;0,8031]	0,0599 [0,0219;0,0772]	0,074
МДА, ед.опт.пл./го.л.	0,1848 [0,9874;0,2531]	0,0826 [0,0318;0,1172]	0,001

Примечание: - ДК - диеновые конъюгаты, ТК - триеновые конъюгаты, МДА - малоновый диальдегид, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Согласно теории «памяти липидов», окисленно модифицированные белки инициируют генерацию радикалов, вследствие чего возрастает уровень продуктов ПОЛ [22]. Также известно, что окислительная модификация белков и других биомолекул занимает ключевую позицию при многих патологиях [32, 33]. Таким образом, формируется «порочный круг», при котором усиление липопероксидации приводит к образованию продуктов, инициирующих генерацию радикалов, что, в свою очередь, еще сильнее провоцирует ПОЛ.

Полученные нами данные позволяют предположить наличие этапности развития процесса СРО, а также подтверждают тезис о том, что в спокойном состоянии (без индукторов, которыми являются свободные радикалы) окисленно модифицированные белки являются нейтральными в плане последующего углубления ОС. При дальнейшей генерации радикалов (вследствие гипергликемии, гликозилирования, ослабления антиоксидантной защиты) происходит активация ОМБ, которая, в свою очередь, стимулирует ПОЛ, является дополнительным источником СР, инактивирует антиоксидантные ферменты, что еще сильнее активирует СРО и формирует так называемый «порочный круг СРО». Образовавшиеся на первой стадии диеновые и триеновые соединения распадаются до промежуточных продуктов. Одним из таких является малоновый диальдегид (МДА). Таким образом, МДА является не только маркером интенсивной липопероксидации, но и инициатором образования окисленно модифицированных белков, которые в свою очередь стимулируют накопление продуктов ПОЛ [26, 32, 33]. Ввиду показанных свойств МДА можно считать интегральным показателем процессов свободно-радикального окисления и окислительного стресса в целом. Предложенный нами коэффициент насыщенности ПОЛ как отношения содержания вторичного (интегрального) продукта МДА к сумме первичных отражает насыщенность процессов, как липопероксидации, так и окислительной модификации белков. Анализ коэффициента насыщенности (МДА/ДК+ТК) показал, что у пациентов с СД 2 типа относительно лиц группы сравнения данный коэффициент увеличен в 4,26 раза ($p=0,004$).

Если образование МДА происходит в больших количествах, то показатель превышает таковой у лиц из группы сравнения, и чем больше его значение, тем интенсивнее происходят реакции липопероксидации и взаимодействие МДА с белковыми молекулами с образованием окисленно модифицированных белковых продуктов. Ввиду конечности процессов образования ОМБ, равновесие сдвигается в сторону накопления МДА, а не реакций образования продуктов деструкции белков. Данный факт подтверждается высоким содержанием спонтанных альдегиддинитрофенилгидразонов и кетондинитрофенилгидразонов в образцах крови пациентов с впервые выявленным СД 2 (Таблица 8).

3.3. Генетический «портрет» пациентов

При изучении частоты встречаемости гаплотипов однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (C786T, rs 2070744) выявлено, что генотип СС (гомозигота по аллелю 1) распространен у лиц без нарушений углеводного обмена с частотой, не отличающейся статистически значимо от таковой у пациентов с СД 2 типа. Практически не отличаются частоты встречаемости гетерозигот (СТ) и гомозигот по аллелю 2 (ТТ) у лиц обследованных групп (Таблица 10).

Таблица 10 – Частоты встречаемости гаплотипов полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения

Генотип	СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	χ^2	p	ОШ	
					значение	95%CI
СС	0,133	0,192	0,87	0,65	1,24	0,37 – 4,12
СТ	0,284	0,308			1,42	0,51 – 3,97
ТТ	0,583	0,500			0,63	0,24 – 1,68

Примечание: - ОШ – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Не выявлено статистически значимой разницы и между встречаемостями аллелей С и Т в обследованных группах субъектов (Таблица 11).

Таблица 11 – Частоты встречаемости аллелей полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения

Аллели	СД 2 типа (n=89)	Группа срав- нения (n=80)	χ^2	p	ОШ	
					значение	95%CI
Аллель С	0,416	0,346	0,76	0,38	1,37	0,67 – 2,79
Аллель Т	0,584	0,654			0,73	0,36 – 1,49

Примечание: - ОШ – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Данный факт свидетельствует об отсутствии ассоциации частоты развития СД 2 типа с аллелями С и Т полиморфизма С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота. По гендерному составу, возрасту, индексу массы тела, наличию сопутствующих заболеваний представители гаплотипов СС, СТ и ТТ сопоставимы (Таблица 12).

Таблица 12 – Общая характеристика пациентов гаплотипов полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота у пациентов с СД 2 типа, (Me [25p;75p])

Показатель	Группа обследованных		
	СС (0,133)	СТ (0,284)	ТТ (0,583)
Возраст, лет	55,00 [51,00;57,00]	53,00 [49,00;55,00]	52,50 [50,50;57,50]
Мужчины : Женщины	6:6	12:13	25:27
ИМТ	32,00 [28,00;33,00]	31,00 [25,00;33,00]	32,50 [29,90;34,70]

Примечание: – ИМТ – индекс массы тела.

При исследовании частот встречаемости гаплотипов однонуклеотидного полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (Ser326Cys rs10052133 C977G) установлено, что генотип СС (гомозигота по аллелю 1) и СG (гетерозигота) распространены у лиц без нарушений углеводного обмена практически так же, как и у пациентов с СД 2 типа (Рисунок 3).

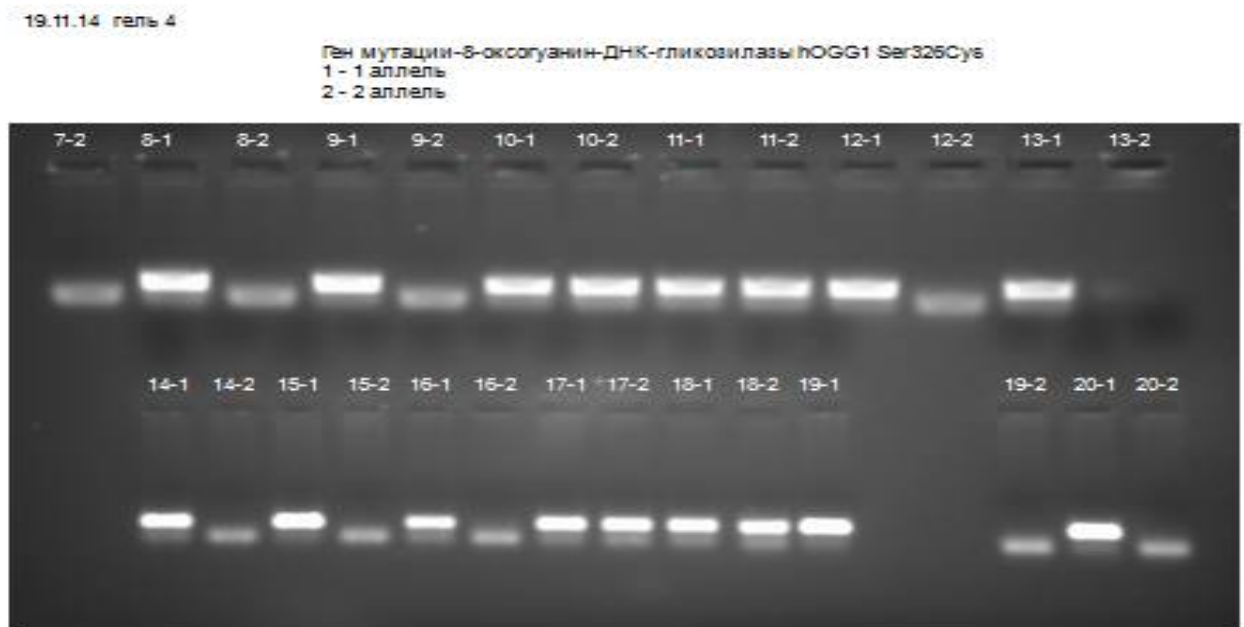


Рисунок 3 – Результаты определения ОНП гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 Ser326Cys в агарозном геле методом ПЦР с электрофорезом

Следует отметить, что представителей генотипа GG среди пациентов с СД 2 типа не выявлено, а в группе сравнения указанный генотип встречался с частотой 0,045, что является подтверждением редкой встречаемости данного гаплотипа (Таблица 13).

Таблица 13 – Частоты встречаемости гаплотипов полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения

Генотип	СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	χ^2	p	ОШ	
					значение	95%CI
CC	0,621	0,625	2,95	0,09	0,98	0,82 – 1,18
CG	0,379	0,330			1,24	1,03 – 1,49
GG	0,000	0,045			0,01	0,00 – 0,17

Примечание: - ОШ – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p - статистическая значимость различий между группами.

Частоты встречаемости аллеля G ОНП rs10052133 среди пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения не отличаются статистически значимо, следовательно, указанный аллель не ассоциирован с развитием СД 2 типа, что согласуется с данными польских ученых, также доказавших отсутствие ассоциации указанного аллеля с частотой развития СД 2 типа у представителей европейской расы [81]. Следует отметить, что в азиатской популяции такая ассоциация, напротив, установлена [86,113] (Таблица 14).

Таблица 14 – Частоты встречаемости аллелей полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения

Аллели	СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	χ^2	p	ОШ	
					значение	95%CI
Аллель С	0,811	0,790	2,63	0,11	1,14	0,97 – 1,33
Аллель G	0,190	0,210			0,88	0,75 – 1,03

Примечание: - ОШ – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p - статистическая значимость различий между группами.

Ассоциаций с развитием СД 2 типа и частотой встречаемости гаплотипов данного полиморфного гена не было выявлено. Также по гендерному составу, возрасту, индексу массы тела, наличию сопутствующих заболеваний представители гаплотипов CC и CG сопоставимы (Таблица 15).

Таблица 15 – Общая характеристика пациентов гаплотипов полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы у пациентов с СД 2 типа, (Me [25p;75p])

Показатель	Группа обследованных	
	CC (0,621)	CG (0,379)
Возраст, лет	52,50 [49,00;53,00]	56,00 [51,50;57,00]
Мужчины : Женщины	22:23	18:16
ИМТ	33,70 [30,00;36,00]	32,00 [30,00;34,00]

Примечание: – ИМТ – индекс массы тела.

Анализ результатов исследования частот встречаемости однонуклеотидного полиморфизма (Pro72Arg rs1042522 C215G) показал, что генотип CC (гомозигота по аллелю 1) гена белка p53 распространен у лиц без нарушений углеводного обмена практически так же, как и у пациентов с СД 2 типа (Рисунок 4).

19.11.14 гель 1

Ген мутации белка p53 - TP53 Pro72Arg
 1 - 1 аллель
 2 - 2 аллель

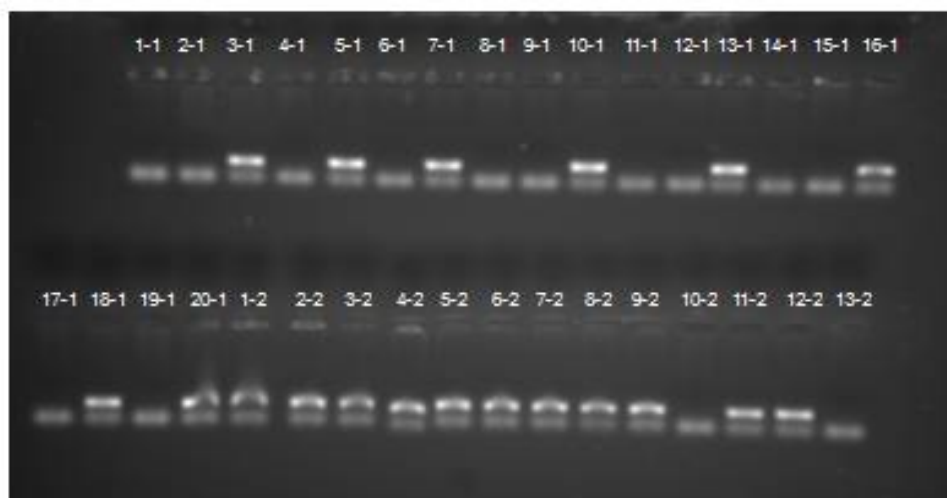


Рисунок 4 – Результаты определения ОНП гена белка p53 Pro72Arg C215G в агарозном геле методом ПЦР с электрофорезом

Существенно не отличается также частота встречаемости гетерозигот (GC) и гомозигот по аллелю 2 (GG) (Таблица 16).

Таблица 16 – Частоты встречаемости гаплотипов полиморфизма гена TP53 у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения

Генотип	СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	χ^2	p	ОШ	
					значение	95%CI
CC	0,149	0,124	2,19	0,33	0,35	0,08 – 1,48
CG	0,362	0,313			1,10	0,49 – 2,46
GG	0,489	0,563			1,26	0,59 -2,71

Примечание: - ОШ – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Частоты встречаемости аллеля С указанного ОНП в основной группе и группе сравнения не отличаются статистически значимо. G- аллель встречается у лиц с СД 2 типа с частотой не отличающейся от таковой среди лиц без нарушений углеводного обмена, что не согласуется с данными других исследований, свидетельствующими о том, что носители G-аллеля имеют более высокий риск развития СД 2 типа [38, 62, 114, 123] (Таблица 17).

Таблица 17 – Частоты встречаемости аллелей полиморфизма гена TP53 у пациентов с СД 2 типа и лиц группы сравнения

Аллели	СД 2 типа (n=89)	Группа сравнения (n=80)	χ^2	p	ОШ	
					значение	95%CI
Аллель С	0,330	0,281	1,33	0,25	1,26	1,10 - 1,44
Аллель G	0,670	0,719			0,79	0,69 – 0,91

Примечание: - ОШ – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p – уровень статистической значимости различий между основной группой и группой сравнения.

Внутри ОНП гена белка p53 представители гаплотипов не отличались по гендерному составу, возрасту, индексу массы тела и сопутствующим заболеваниям (Таблица 18).

Таблица 18 – Общая характеристика пациентов гаплотипов полиморфизма гена TP53 у пациентов с СД 2 типа, (Me [25p;75p])

Показатель	Группа обследованных		
	CC (0,149)	CG (0,362)	GG (0,489)
Возраст, лет	50,00 [49,00;57,00]	53,00 [50,00;55,00]	52,00 [48,00;57,00]
Мужчины : Женщины	6:8	17:15	24:19
ИМТ	31,00 [29,00;33,00]	30,00 [27,00;35,00]	32,00 [30,50;34,00]

Примечание: – ИМТ – индекс массы тела.

3.4. Резюме

У больных с впервые выявленным СД 2 типа при уровне гликированного гемоглобина от 6,5 до 8,0%, неярко выраженных изменениях липидного профиля (более низкий уровень ЛПВП (на 7%), повышенное содержание триглицеридов (на 78%) и атерогенного индекса (на 60%)) и показателей системного воспаления по сравнению с лицами без нарушений углеводного обмена отмечается активация процессов перекисного окисления липидов и белков. Понижены активность СОД (на 18%) и уровень церулоплазмينا (на 39%), а также повышены активность СРО (на 9%) и содержание молекулярных продуктов ПОЛ (МДА - в 2 раза, ДК - на 73%), ОМБ (АДФГс - на 60%, КДФГс - на 50%), гаптоглобина (на 31%) и коэффициента насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)) в 4 раза могут остаться незамеченными, если в процессе терапии достигается и контролируется только целевой уровень гликемии. При этом отсутствие динамического контроля данных показателей может привести к дальнейшему прогрессированию заболевания и развитию осложнений. Генетическое исследование полиморфизмов трех генов (rs2070744, rs 1052133, rs1042522) показало, что частоты встречаемости гаплотипов среди пациентов с СД 2 типа не отличаются от таковых среди лиц без нарушения углеводного обмена. Таким образом, с одной стороны, показано генетическое разнообразие пациентов с впервые выявленным СД 2 типа, которое, с другой стороны, не отличается от такового среди лиц без нарушения углеводного обмена, что свидетельствует об отсутствии ассоциаций изученных ОНП с частотой развития СД 2 типа. Также не было выявлено различий по показателям гендерного соотношения, возраста, индексу массы тела и сопутствующим заболеваниям между представителями гаплотипов внутри одного ОНП у пациентов с впервые выявленным СД 2. Учитывая данные литературы о том, что изученные полиморфизмы связаны с различными звеньями патогенеза СД 2 типа, а также, вероятно, определяют индивидуальный ответ пациента на сахароснижающую терапию, при проведении дальнейших исследований динамика показателей при применении препарата метформин оценивалась в зависимости от генотипа пациента.

ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОТИПОМ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТА МЕТФОРМИН

4.1. Динамика показателей в зависимости от гаплотипа однонуклеотидного полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота

При проведении исследований выявлено, что у представителей гомозиготы по аллелю 1 (СС) – более низкий исходный уровень гликированного гемоглобина по сравнению с аналогичными показателями у двух других гаплотипов данного ОНП. В то же время исходные уровни С-пептида и глюкозы плазмы натощак не отличается у представителей трех гаплотипов (Таблица 19).

В динамике 3 месяцев наблюдения пациентов уровень гликированного гемоглобина и ГПН снижаются статистически значимо во всех подгруппах обследованных.

Обращает на себя внимание, что у представителей гомозиготы по аллелю 1 (СС) и гетерозиготы (СТ) происходит статистически более выраженное снижение уровня гликированного гемоглобина на 1,05% ($p=0,011$) и 0,85 % ($p=0,036$) соответственно, при этом у представителей ТТ гаплотипа Δ HbA_{1c} составляет 0,37% за 3 месяца наблюдений.

У представителей гомозиготы по аллелю 2 (ТТ) уровень С-пептида значимо снижается на 10%, в то время как в подгруппах СС и СТ данный показатель статистически значимо возрастает на 22% и 35% соответственно относительно результатов первого обследования (Таблица 19).

Таблица 19 – 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]# p=0,0347	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, # - уровень статистической значимости различий между исходными показателями у представителей разных гаплотипов, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

По исходному уровню показателей липидного профиля группы в целом сопоставимы. Через 3 месяца применения метформина не отмечается статистически значимых изменений липидного профиля, изначально также не наблюдалось серьезных отклонений липидного профиля пациентов с впервые выявленным СД 2 и уровнем гликированного гемоглобина 6,5-8,0% и отсутствием диабетических осложнений (Таблица 20).

Таблица 20 - Динамика показателей липидного профиля 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)
ОХ, ммоль/л до начала терапии	6,03 [5,10;7,20]	5,90 [4,30;7,00]	5,77 [5,00;6,70]
ОХ, ммоль/л через 3 месяца терапии	6,60 [6,50;8,00]	6,70 [5,60;6,90]	5,68 [5,30;6,40]
ЛПНП, ммоль/л до начала терапии	3,20 [2,90;4,30]	3,40 [2,20;4,30]	3,45 [2,90;4,20]
ЛПНП, ммоль/л через 3 месяца терапии	4,10 [3,80;5,90]	4,30 [3,50;4,50]	3,25 [2,85;4,80]
ЛПОНП, ммоль/л до начала терапии	0,78 [0,60;1,42]	1,21 [0,66;1,54]	1,06 [0,69;1,29]
ЛПОНП, ммоль/л через 3 месяца терапии	0,56 [0,45;1,11]	1,19 [0,62;1,32]	0,91 [0,66;1,25]
ТГ, ммоль/л до начала терапии	2,36 [1,37;3,09]	2,52 [1,43;3,35]	2,46 [1,50;3,21]
ТГ, ммоль/л через 3 месяца терапии	1,21 [0,98;2,41]	2,59 [1,35;2,88]	2,68 [1,98;2,84]
ЛПВП, ммоль/л до начала терапии	1,37 [1,31;1,62]	1,29 [0,94;1,47]	1,16 [1,00;1,26]
ЛПВП, ммоль/л через 3 месяца терапии	1,70 [1,62;1,91]	1,32 [1,11;1,66]	1,14 [1,04;1,17]
АтИн до начала терапии	3,41 [3,23;3,63]	3,91 [3,55;4,70]	4,20 [3,44;4,70]
АтИн через 3 месяца терапии	3,01 [2,46;3,71]	3,04 [2,74;5,04]	4,20 [3,60;5,64]

Примечание: - ОХ – общий холестерин, ЛПНП - липопротеины низкой плотности, ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности, ТГ – триглицериды, ЛПВП - липопротеины высокой плотности, АТИн – атерогенный индекс.

Исходные показатели системного воспаления у представителей разных гаплотипов существенно не отличаются. При этом в динамике 3 месяцев наблюдения в группе гомозигот по аллелю 2 (ТТ) отмечается статистически значимое снижение содержания фибриногена на 11% относительно исходных данных (Таблица 21).

Таблица 21 – Динамика показателей системного воспаления 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)
Фибриноген до начала терапии, г/л	3,90 [3,24;4,00]	3,47 [3,07;4,85]	3,51 [3,30;3,90]
Фибриноген через 3 месяца терапии, г/л	3,61 [3,51;3,71]	3,61 [3,41;4,30]	3,11 [2,99;3,38]* p=0,028
С – реактивный белок до начала терапии, мг/л	8,45[4,50;19,95]	7,50 [5,00;13,00]	6,00 [5,00;8,00]
С – реактивный белок через 3 месяца терапии, мг/л	9,50 [6,00;13,00]	9,85 [6,00;13,75]	5,30 [3,58;13,20]

Примечание: – * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

По всем показателям хемилюминесценции подгруппы исходно также не отличаются. Относительно исходных данных отмечается статистически значимое

снижение показателя I_{\max} в подгруппе СС на 16%, в подгруппе СТ – на 18%, в подгруппе ТТ – на 10%. Отмечается повышение показателя $\text{tg}\alpha_2$ в подгруппе СС на 24%, в подгруппе СТ – на 12%, в подгруппе ТТ – на 11%. Показатель $1/S$ статистически значимо повышается в подгруппах ТТ на 25% и СТ – на 34% относительно результатов первого обследования (Таблица 22).

Таблица 22 – Динамика показателей хемилюминесценции при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Me [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
$\text{tg}\alpha_2$ до начала терапии	-66,00 [-68,00; -63,00]	-71,50 [-81,50; -60,25]	-64,75 [-69,00; -56,00]
$\text{tg}\alpha_2$ 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, $\text{tg}\alpha_2$ – тангенс альфа (напряженность ОАА), * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Гаплотип ТТ имеет более низкий исходный уровень активности СОД, но и статистически значимое увеличение активности указанного фермента в динамике периода наблюдения на 16% ($p=0,009$) (Таблица 23).

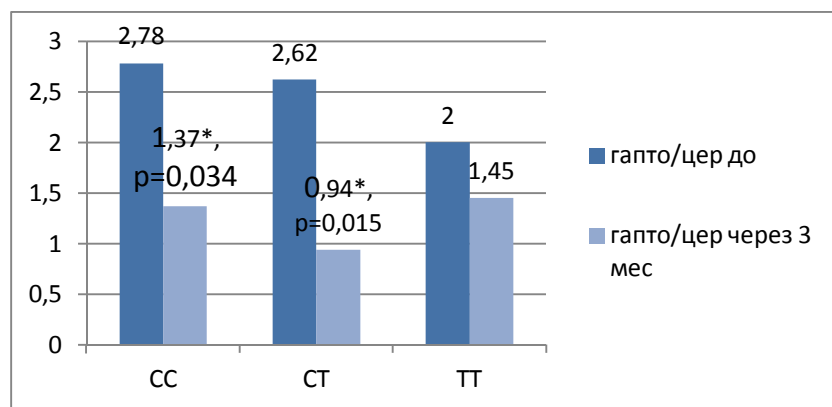
Таблица 23 – Динамика показателей ферментативной и неферментативной АОС при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Ме [25p;75p])

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]
Церулоплазмин до начала терапии, мг/л	40,00 [27,60;70,00]	31,00 [28,50;38,40]	39,85 [33,80;45,00]
Церулоплазмин через 3 месяца терапии, мг/л	58,30 * [36,00;84,00] $p=0,011$	38,50 [35,00;44,00]	44,00 [14,70;46,00]
Гаптоглобин до начала терапии, мг/дл	110,20 [80,00;120,00]	81,17 [44,39;151,85]	80,00 [78,80;84,75]
Гаптоглобин через 3 месяца терапии, мг/дл	80,00 * [72,00;93,00] $p=0,029$	36,00 * [22,00;50,00] $p=0,039$	63,88 [47,77;70,00]

Примечание: - СОД –супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

У представители гаплотипов СС и СТ отмечается статистически значимая динамика роста активности каталазы (на 63% в 2,5 раза соответственно) относительно показателей первого обследования.

Динамика показателей неферментативной АОС у представителей СС гаплотипа при применении метформина значительна и являлась статистически значимой: повышение содержания церулоплазмينا на 45% и снижение гаптоглобина на 27%. В подгруппе СТ гаплотипа наблюдалось значимое снижение гаптоглобина на 55%. Такие изменения в неферментивной 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 и СТ – в 2,5 раза через 3 месяца применения метформина (Рисунок 5).



Примечание: - * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Рисунок 5 – Показатели отношения гаптоглобина к церулоплазмину в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота)

По исследованным показателям ПОЛ представители гаплотипов данного ОНП были сопоставимы. Статистически значимое снижение относительно исходного уровня МДА на 48%, ДК – на 82%, ТК – на 73% в течение 3 месяцев на-

блюдений в подгруппе СС, в подгруппе гетерозигот – уровень МДА и ДК уменьшается статистически значимо на 39% и 64% соответственно. В подгруппе ТТ значимых изменений показателей ПОЛ относительно первого обследования после применения метформина в течение 3 месяцев не обнаружено (Таблица 24).

Таблица 24 – Динамика показателей ПОЛ при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 2070744 (ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота), (Me [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 [0,0044;0,49]

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

Показатели коэффициента МДА/(ДК+ТК) у представителей гаплотипов ОНП гена синтазы оксида азота 3 сопоставимы, однако, снижение этого показате-

ля в течение периода наблюдения статистически значимо только в СС подгруппе на 47% относительно исходного уровня (Таблица 25).

Таблица 25 – Динамика коэффициента 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 (0,283)	ТТ (0,583)
МДА/(ДК+ТК) до начала терапии	0,62 [0,43;0,87]	0,64 [0,36;0,77]	0,81 [0,81;1,53]
МДА/(ДК+ТК) через 3 месяца терапии	0,33 [0,19;1,30] * p=0,004	0,70 [0,26;1,32]	0,73 [0,30;1,29]

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

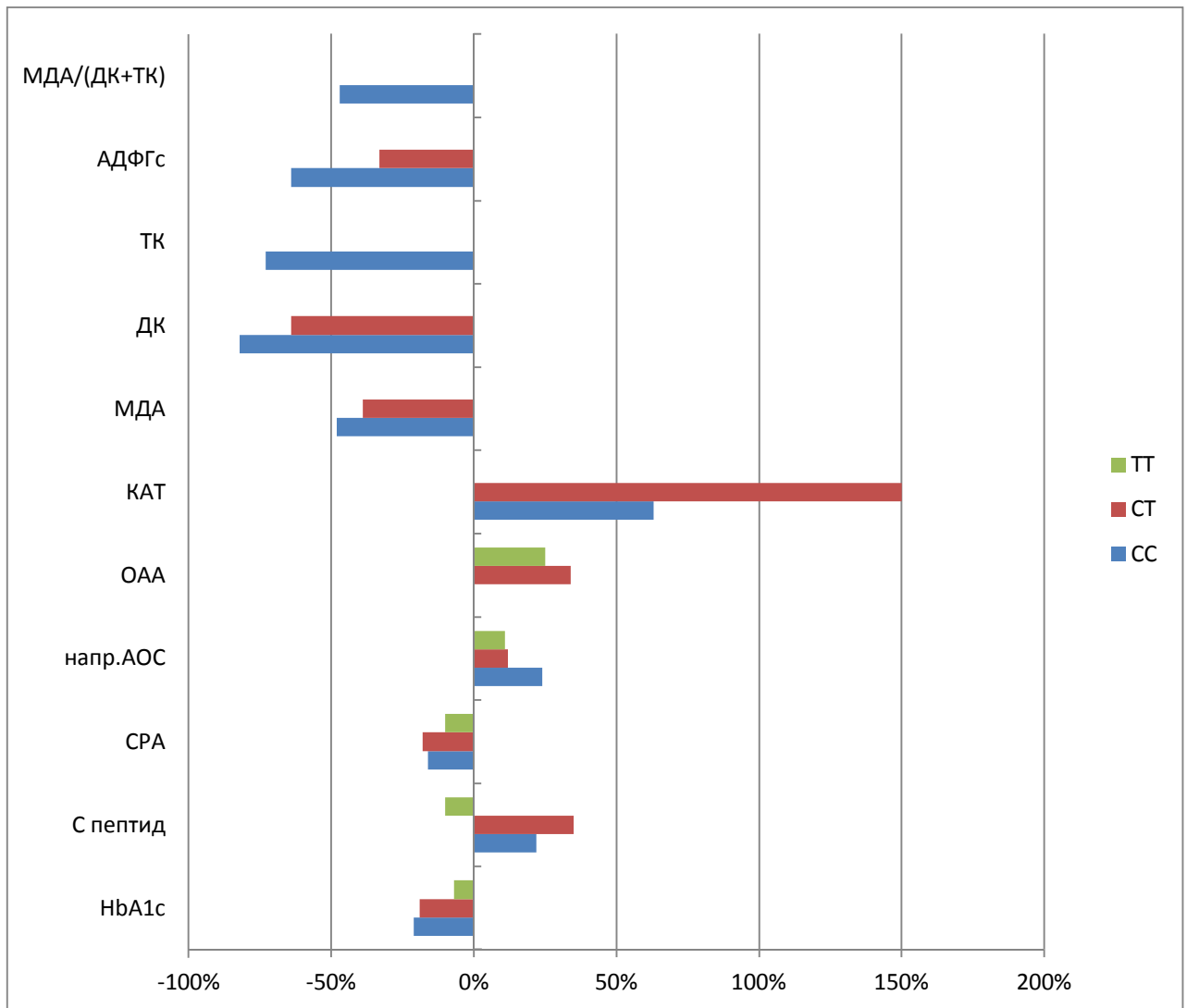
По исходным показателям ОМБ подгруппы с разными гаплотипами не отличаются друг от друга статистически значимо. В подгруппе СС в динамике периода наблюдения отмечено статистически значимое снижение уровня ранних маркеров деструкции белка относительно исходной величины на 64%, а в подгруппе СТ – на 33%. Статистически значимого изменения уровня маркеров поздней деструкции юелков не наблюдалось (Таблица 26).

Таблица 26 – Динамика показателей ОМБ 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)
АДФГс до начала терапии, отн.ед.	0,0011 [0,0009;0,0013]	0,0006 [0,0005;0,0010]	0,0005 [0,0004;0,0010]
АДФГс через 3 месяца терапии, отн.ед.	0,0004 [0,0003;0,0005]* p=0,0005	0,0004 [0,0003;0,0007] p=0,0019	0,0005 [0,0003;0,0008]

Примечание: – АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что исследованные показатели гликемии, окислительного стресса, липидного профиля и системного воспаления принципиально не отличаются друг от друга при фоновом (первичном обследовании), однако наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей, как гликемических, так и показателей окислительного стресса, после 3-х месяцев приёма метформина отмечается у гаплотипов СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (rs2070744) (Рисунок 6).



Примечание: – HbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, СРА (I max) – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, 1/S - ОАА – общая антиоксидантная активность, tgα2 – тангенс альфа (напряженность ОАА), КАТ – каталаза, МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты, АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные.

Рисунок 6 – Статистически значимая динамика некоторых показателей среди гаплотипов ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота.

4.2. Динамика показателей в зависимости от гаплотипа однонуклеотидного полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы

Вследствие того, что в результате генотипирования представителей GG гаплотипа исследуемого ОНП не было выявлено, динамика показателей гликемии,

липидного профиля, системного воспаления и окислительного стресса оценивалась в двух подгруппах гаплотипов CC и CG.

Исходные показатели гликемии у представителей двух подгрупп (гомозиготы по аллелю 1 и гетерозиготы) друг от друга статистически значимо не отличаются.

Снижение показателей гликированного гемоглобина и уровня ГПН наблюдается как в группе гомозиготы ($p=0,014$ и $p=0,006$ соответственно), так и гетерозигот ($p=0,013$ и $p=0,004$ соответственно) (Таблица 27).

Таблица 27 – Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП C977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [25p;75p])

Показатель	Гаплотип (частота)	
	CC (0,621)	CG (0,379)
НbA _{1c} до начала терапии, %	7,30 [6,80;8,00]	7,60 [7,15;8,00]
НbA _{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: – НbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, ГПН – глюкоза плазмы натощак, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

По исходным показателям липидного профиля подгруппы данного ОНП существенно не отличаются (Таблица 28).

Таблица 28 – Динамика показателей липидного профиля при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [25p;75p])

Показатель	Гаплотип (частота)	
	CC (0,621)	CG (0,379)
ОХ, ммоль/л до начала терапии	6,00 [5,40;6,90]	5,70 [5,00;6,30]
ОХ, ммоль/л через 3 месяца терапии	6,45 [5,50;6,85]	6,80 [5,00;8,10]
ЛПНП, ммоль/л до начала терапии	3,90 [2,99;4,40]	3,30 [2,99;4,40]
ЛПНП, ммоль/л через 3 месяца терапии	3,95 [2,80;4,50]	4,65 [3,50;5,00]
ЛПОНП, ммоль/л до начала терапии	1,14 [0,69;1,47]	1,08 [0,74;1,25]
ЛПОНП, ммоль/л через 3 месяца терапии	0,73 [0,56;1,19]	1,25 [0,73;1,46]
ТГ, ммоль/л до начала терапии	2,50 [1,57;3,21]	2,37 [1,43;2,72]
ТГ, ммоль/л через 3 месяца терапии	1,60 [1,21;2,59]* p=0,009	2,68 [1,60;3,18]
ЛПВП, ммоль/л до начала терапии	1,22 [1,15;1,47]	1,24 [1,17;1,35]
ЛПВП, ммоль/л через 3 месяца терапии	1,62 [1,52;1,71]* p=0,049	1,47 [1,12;1,66]
АтИн до начала терапии	3,97 [3,56;4,65]	3,55 [2,75;4,38]
АтИн через 3 месяца терапии	3,02 [2,74;3,71]* p=0,031	3,02 [2,48;6,80]

Примечание: – ОХ – общий холестерин, ЛПНП - липопротеины низкой плотности, ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности, ТГ – триглицериды, ЛПВП - липопротеины высокой плотности, АтИн – атерогенный индекс,* – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

В подгруппе CC через 3 месяца терапии отмечается статистически значимое снижение уровня ТГ на 36% и атерогенного индекса на 24%, а также повышение уровня ЛПВП на 33% относительно исходных значений. В подгруппе гетерозигот

статистически значимой динамики исследуемых показателей липидного обмена не выявлено (Таблица 28).

Статистически значимых различий между различными гаплотипами ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы по показателям системного воспаления при первом обследовании не обнаружено. Во время периода наблюдения изменения всех исследуемых показателей системного воспаления не являлись статистически значимыми у представителей, как СС, так и СG гаплотипов (Таблица 29).

Таблица 29 – Динамика показателей системного воспаления 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)	СG (0,379)
Фибриноген до начала терапии, г/л	3,60 [3,10;4,20]	3,64 [3,25;4,30]
Фибриноген через 3 месяца терапии, г/л	3,54 [3,00;3,80]	3,58 [3,22;6,00]
С – реактивный белок до начала терапии, мг/л	6,00 [5,00;12,00]	6,50 [5,00;10,00]
С – реактивный белок через 3 месяца терапии, мг/л	9,50 [6,00;13,20]	8,20 [6,00;13,70]

По всем исходным показателям хемилюминесценции подгруппы СС и СG сопоставимы. В подгруппе гаплотипа СС в динамике периода наблюдения статистически значимо снижается показатель I_{max} (свободнорадикальная активность) на 11% и повышается показатель $tg\alpha 2$ (напряженность АОС) на 10% относительно результатов первого обследования. В подгруппе СG также регистрируется уменьшение показателя I_{max} и повышение показателя $tg\alpha 2$ на 11% и 25% соответственно относительно исходных величин (Таблица 30).

Таблица 30 – Динамика показателей хемилюминесценции при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [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]
tgα ₂ до начала терапии	-65,25 [-69,00;-56,00]	-67,50 [-84,00;-63]
tgα 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, tgα₂ – тангенс альфа (напряженность ОАА),* – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

При этом различия в динамике показателей I_{max} и tgα₂ при применении препарата метформин в течение 3 месяцев наблюдения у представителей изученных гаплотипов указанного ОНП являются несущественными.

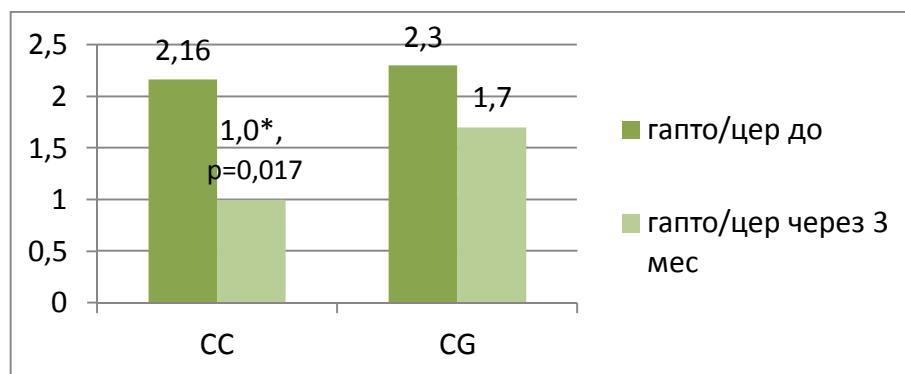
Исходные исследованные показатели ферментативной АОС у представителей CC и CG гаплотипов при ОНП rs1052133 сопоставимы, и их динамика в течение периода наблюдения при применении препарата метформин не является статистически значимой. Показатель неферментативной АОС - уровень церулоплазмина- у представителей гаплотипа CC статистически значимо повышается на 63% относительно исходного уровня через 3 месяца применения метформина (Таблица 31).

Таблица 31 – Динамика показателей ферментативной и неферментативной АОС при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [25p;75p])

Показатель	Гаплотип (частота)	
	CC (0,621)	CG (0,379)
СОД, ед. акт./мг Нв мин до начала терапии	115,14 [83,61;153,43]	117,11 [109,63;149,49]
СОД, ед. акт./мг Нв мин через 3 месяца терапии	123,40 [94,00;140,00]	129,72 [114,54;180,19]
КАТ, ед. акт./мг Нв мин до начала терапии	20,70 [20,80;23,00]	20,20 [11,00;26,64]
КАТ, ед. акт./мг Нв мин через 3 месяца терапии	26,79 [26,73;33,44]	19,00 [9,10;20,52]
Церулоплазмин до начала терапии, мг/л	39,25 [33,80;64,00]	40,00 [28,00;41,2]
Церулоплазмин через 3 месяца терапии, мг/л,	64,00* [38,40;70,00] p=0,009	45,00 [33,90;46,00]
Гаптоглобин до начала терапии, мг/дл	84,75 [80,00;86,57]	92,00 [26,43;98,80]
Гаптоглобин через 3 месяца терапии, мг/дл	70,00 [62,34;80,00]	77,00 [73,85;80,70]

Примечание: – СОД –супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Уменьшение интенсивности свободно-радикальных процессов за счет активации неферментативной антиоксидантной системы, о чем свидетельствует статистически значимое снижение коэффициента гаптоглобин/церулоплазмин, наблюдается у представителей гаплотипов CC практически в 2 раза через 3 месяца применения метформина (Рисунок 7).



Примечание: – * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Рисунок 7 – Показатели отношения гаптоглобина к церулоплазмину в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы).

Исходные коэффициенты насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)) в подгруппах гаплотипов также сопоставимы, и статистически значимой динамики не отмечается. При применении метформина в течение 3 месяцев динамика показателей является несущественной у представителей обоих гаплотипов, что подтверждается отсутствием динамики коэффициента насыщенности ПОЛ (Таблица 32).

Таблица 32– Динамика показателей коэффициента насыщенности ПОЛ при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [25p;75p])

Показатель	Гаплотип (частота)	
	CC (0,621)	CG (0,379)
МДА/(ДК+ТК) до начала терапии	1,18 [0,78;2,30]	1,92 [0,88;2,50]
МДА/(ДК+ТК) через 3 месяца терапии	1,23 [0,50;3,02]	1,84 [0,39;2,58]

Примечание: – МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты.

По исходным показателям ПОЛ подгруппы гаплотипов СС и СG сопоставимы. При применении препарата метформин у представителей гомозигот по аллели 1 (СС) отмечается статистически значимое снижение уровня МДА на 52%, ДК – на 43%, ТК – на 62% относительно показателей первого обследования (Таблица 33).

Таблица 33 – 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)	СG (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, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

По исходным показателям ОМБ подгруппы гаплотипов СС и СG статистически значимо не отличаются друг от друга. При применении метформина в течение 3 месяцев динамика показателей не является статистически значимой у представителей обоих гаплотипов (Таблица 34).

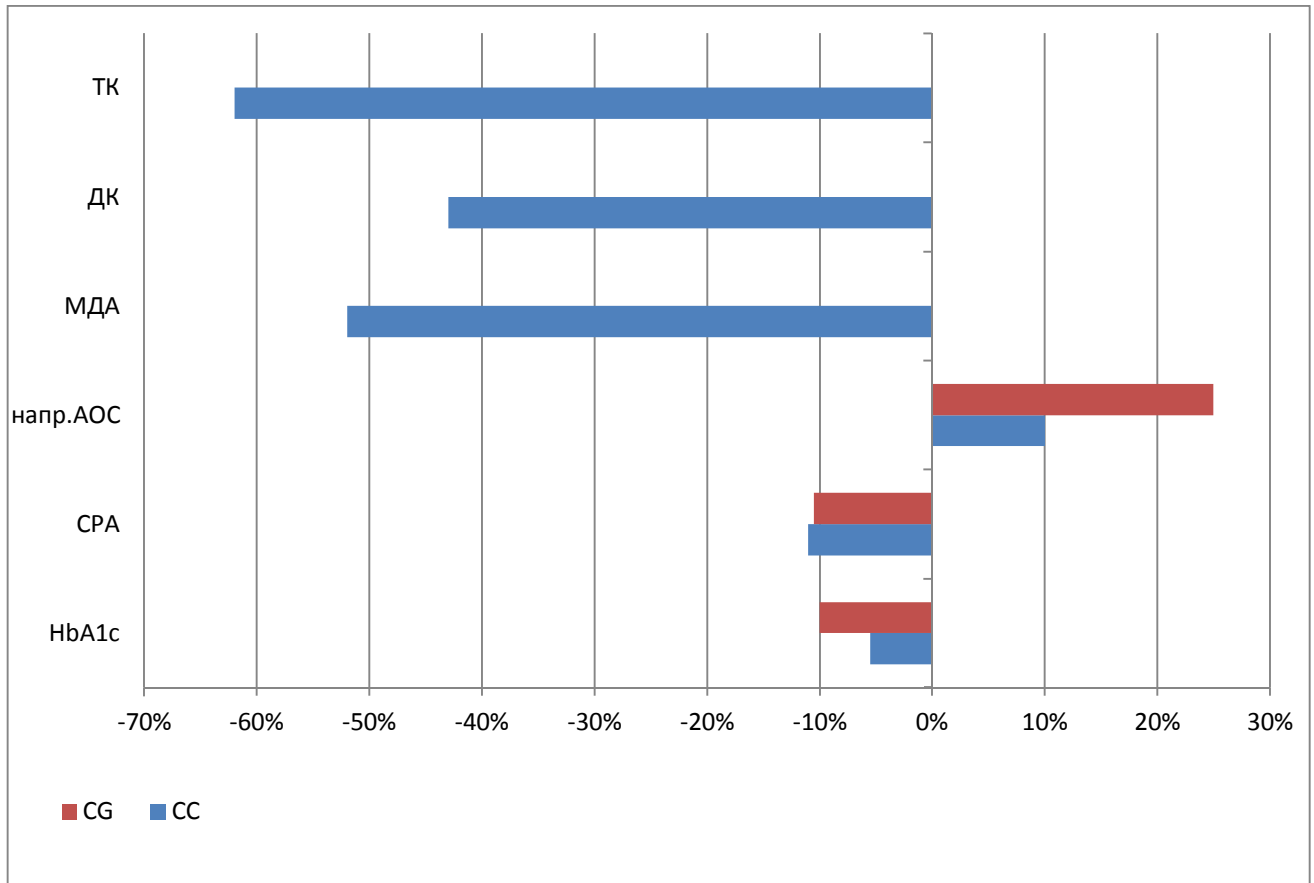
Таблица 34 – Динамика показателей ОМБ при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы), (Me [25p;75p])

Показатель	Гаплотип (частота)	
	CC (0,621)	CG (0,379)
АДФГс до начала терапии, отн.ед.	0,0005 [0,0003;0,0007]	0,0004 [0,0003;0,0009]
АДФГс через 3 месяца терапии, отн.ед.	0,0004 [0,0003;0,0006]	0,0004 [0,0003;0,0005]
КДФГс до начала терапии, отн.ед.	0,0005 [0,0004;0,0007]	0,0003 [0,0003;0,0005]
КДФГс через 3 месяца терапии, отн.ед.	0,0004 [0,0003;0,0006]	0,0004 [0,0003;0,0005]

Примечание: – АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные, КДФГс – кетон-динитрофенилгидразоны спонтанные.

При исследовании исходных показателей гликемии, окислительного стресса, липидного профиля и системного подгруппы гаплотипов ОНП гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы не было выявлено принципиальных различий.

Таким образом, наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей, как гликемических, так и показателей окислительного стресса в процессе 3 месяцев применения метформина отмечается у гаплотипа CC полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133) (Рисунок 8).



Примечание: - HbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, СРА (I max) – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, 1/S - ОАА – общая антиоксидантная активность, tgα2 – тангенс альфа (напряженность ОАА), МДА - малоновый диальдегид, ДК - диеновые конъюгаты, ТК - диеновые конъюгаты, АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные.

Рисунок 8- Статистически значимая динамика некоторых показателей среди гаплотипов ОНП С977G гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы.

4.3. Динамика показателей в зависимости от гаплотипа однонуклеотидного полиморфизма гена белка p53

Исходные исследуемые показатели гликемии представителей всех трех подгрупп гаплотипов ОНП гена белка p53 (С215G Pro72Arg) не отличаются статистически значимо. Динамика снижения относительно исходных показателей уровня гликогемоглобина является значимой, а также и более существенной в подгруппе СС (Таблица 35).

Таблица 35 – Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg), (Ме [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, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

По исходным показателям липидного профиля подгруппы гаплотипов не отличаются друг от друга. Через 3 месяца применения препарата метформин отмечается статистически значимое снижение уровня ТГ в подгруппе GG: на 26% относительно показателя первого обследования (p=0,046) (Таблица 36).

Таблица 36 – Динамика показателей липидного профиля 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)
ОХ до начала терапии, ммоль/л	6,00 [5,79;7,20]	5,60 [5,00;6,60]	5,80 [5,50;6,90]
ОХ через 3 месяца терапии, ммоль/л	6,21 [5,88;8,00]	6,40 [5,00;6,80]	7,00 [5,63;8,80]
ЛПНП до начала терапии, ммоль/л	4,00 [3,50;5,00]	3,50 [3,30;4,30]	3,40 [2,90;4,40]
ЛПНП через 3 месяца терапии, ммоль/л	3,95 [2,80;2,20]	4,10 [2,60;4,30]	3,65 [3,18;5,45]
ЛПОНП до начала терапии, ммоль/л	1,03 [0,72;1,28]	1,11 [0,66;1,47]	1,16 [0,69;1,44]
ЛПОНП через 3 месяца терапии, ммоль/л	0,82 [0,64;1,33]	0,93 [0,73;1,19]	0,98 [0,49;1,25]
ТГ до начала терапии, ммоль/л	2,18 [1,33;2,78]	2,42 [1,43;3,21]	2,55 [1,78;3,18]
ТГ через 3 месяца терапии, ммоль/л	2,40 [1,23;3,00]	2,60 [1,60;3,01]	1,88 [1,08;2,69]* p=0,046
ЛПВП л до начала терапии, ммоль/л	1,23 [1,18;1,66]	1,22 [1,17;1,45]	1,20 [1,05;1,37]
ЛПВП через 3 месяца терапии, ммоль/л	1,40 [1,22;1,50]	1,32 [1,12;1,71]	1,62 [1,17;1,68]

Примечание: – ОХ – общий холестерин, ЛПНП - липопротеины низкой плотности, ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности, ТГ – триглицериды, ЛПВП - липопротеины высокой плотности, АtИн – атерогенный

индекс,* – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

По показателям системного воспаления подгруппы гаплотипов ОНП гена белка p53 сопоставимы. Статистически значимое снижение уровня С-реактивного белка на 42% относительно исходных данных через 3 месяца применения метформина наблюдается в подгруппе гетерозигот (Таблица 37).

Таблица 37 – Динамика показателей системного воспаления 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)
Фибриноген до начала терапии, г/л	4,00 [2,90;5,60]	3,40 [3,10;4,00]	3,51 [3,20;3,98]
Фибриноген через 3 месяца терапии, г/л	3,63 [2,74;5,80]	3,39 [3,00;3,80]	3,54 [3,38;3,58]
С – реактивный белок до начала терапии, мг/л	9,80 [7,60;23,00]	12,50 [6,00;29,90]	5,55 [5,00;6,00]
С – реактивный белок через 3 месяца терапии, мг/л	8,50 [8,00;11,75]	7,00 [6,00;9,60]* p=0,048	8,65 [3,94;13,35]

Примечание: – * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Представители разных гаплотипов ОНП белка p53 имеют сопоставимую свободнорадикальную активность (I_{max}). При этом в подгруппе гаплотипа CC через 3 месяца применения метформина показатель I_{max} (CРА) снижается на 14% (в подгруппах CG и GG соответственно на 13% и 12%) относительно исходных данных. Кроме того, у представителей гаплотипов CC и GG происходит увеличение

показателя 1/S (ОАА) на 24% и 32% соответственно, а также $tg\alpha 2$ (напряженность АОС) на 25% и 19% соответственно, а гаплотипа CG – только повышение $tg\alpha 2$ на 22% по сравнению с результатами первого обследования (Таблица 38).

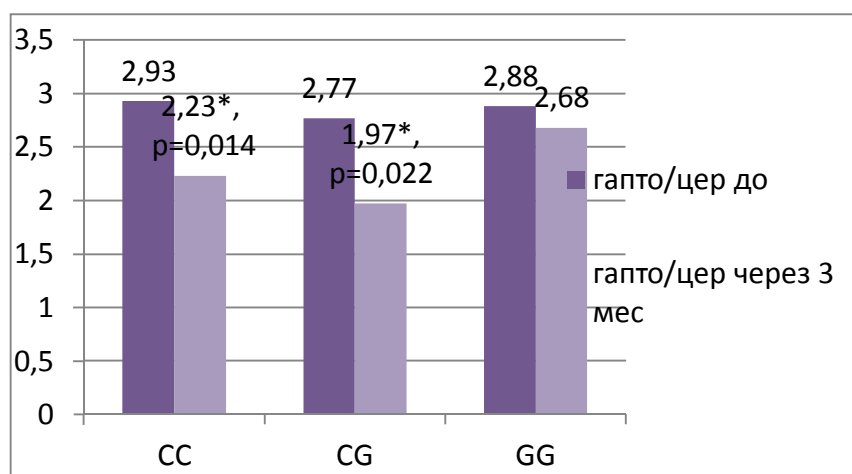
Таблица 38 – Динамика показателей хемилюминесценции при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg), (Me [25p;75p])

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
$tg\alpha 2$ до начала терапии	-68,00 [-80,00;-57,00]	-63,75 [-66,00;-60,00]	-66,25 [-81,00;-55,5]
$tg\alpha 2$ 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, $tg\alpha 2$ – тангенс альфа (напряженность ОАА), * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Вместе с тем, различия в динамике показателей $I \max$, ОАА и $tg\alpha 2$ после 3-х месяцев применения метформина у представителей трех гаплотипов ОНП гена белка p53 не является статистически значимой.

За счет статистически значимого повышения уровня церулоплазмينا в подгруппах CC и CG (на 17% и 26% соответственно) гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg) отмечено статистически значимое снижение отношение гаптоглобин/церулоплазмин у предстаивтелей этих гаплотипов (на 24% и 29%) при применении метформина (Рисунок 9).



Примечание: – * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Рисунок 9 – Показатели отношения гаптоглобина к церулоплазмину в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg).

По исходным показателям представители гаплотипа CC отличаются статистически значимо низкой активностью СОД, нов периоде наблюдения показатель статистически значимо возрастает на 24% относительно первоначальных данных (Таблица 39).

Таблица 39 – Динамика показателей ферментативной и неферментативной АОС 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)
СОД до начала терапии, ед. акт./мг Нв мин	157,40 [108,57;182,70]# p=0,012	176,56 [114,00;235,00]	186,85 [180,10;194,85]
СОД через 3 месяца терапии, ед. акт./мг Нв мин	194,60 [185,12;197,90] * p=0,045	167,44 [113,50;192,00]	214,56 [170,79;233,34]
КАТ до начала терапии, ед. акт./мг Нв мин	32,05 [19,36;36,90]	23,28 [14,00;26,60]	23,51[20,23;32,5]
КАТ через 3 месяца терапии, ед. акт./мг Нв мин	29,35 [23,00;39,70]	22,20 [11,00;30,50]	27,30 [13,60;35,80]
Церулоплазмин до начала терапии, мг/л	38,40 [27,60;50,00]	41,40 [29,20;45,00]	40,00 [36,15;52,60]
Церулоплазмин через 3 месяца терапии, мг/дл	45,00 * [22,70;55,00] p=0,045	52,50* [36,35;62,50] p=0,026	45,50 [38,40;64,00]
Гаптоглобин до начала терапии, мг/дл	112,70 [81,00;115,06]	114,50 [93,14;123,70]	115,00 [78,12;138,75]
Гаптоглобин через 3 месяца терапии, мг/дл	100,24 [94,00;115,50]	103,42 [94,15;116,53]	122,00 [73,17;177,28]

Примечание: – СОД –супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, # - уровень статистической значимости различий между исходными показателями у представителей разных гаплотипов, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

Представители подгруппы гетерозигот полиморфизма C215G отличаются статистически значимо по исходному высокому уровню ДК ($p=0,005$). Через 3 месяца применения метформина у представителей гаплотипа CC снижается уровень МДА и ТК (соответственно на 62 и 72%), CG и GG – лишь МДА (на 54% и 62% соответственно) относительно исходных данных (Таблица 40).

Таблица 40 – Динамика показателей ПОЛ 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)
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, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

При этом выраженность снижения уровня МДА сопоставима во всех подгруппах.

Исходный показатель коэффициента насыщенности ПОЛ у представителей гаплотипов существенно не отличается. Динамика снижения данного коэффициента относительно первоначальных данных отмечается во всех подгруппах, но достигает статистической значимости в подгруппе гомозигот по аллелю С на 48% (Таблица 41).

Таблица 41 – Динамика показателей коэффициента ПОЛ 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)
МДА/(ДК+ТК) до начала терапии	1,41 [0,85;2,18]	0,66 [0,42;0,77]	0,96 [0,66;1,39]
МДА/(ДК+ТК) через 3 месяца терапии	0,73 [0,38;1,99]* p=0,004	0,56 [0,33;1,08]	0,65 [0,26;0,94]

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

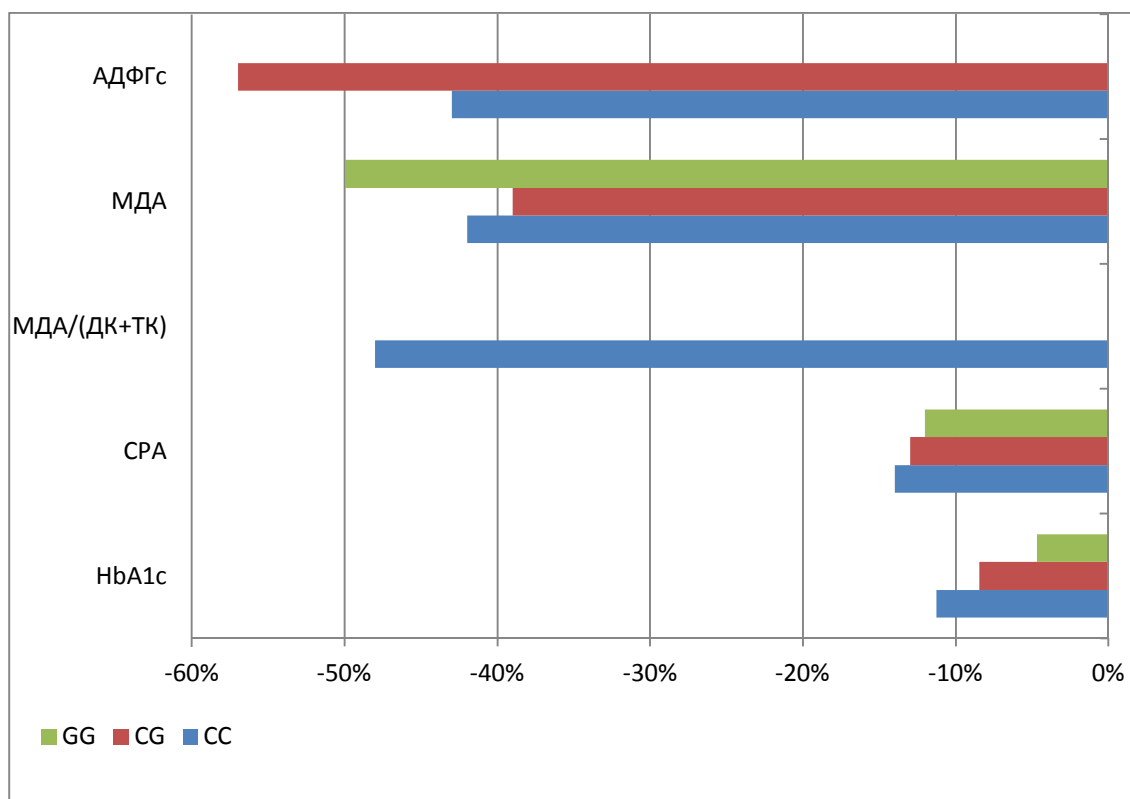
По исходным данным ОМБ представители подгрупп гаплотипов сопоставимы. Однако при применении препарата метформин в течение 3 месяцев в подгруппе гетерозигот (CG) отмечается статистически значимое снижение содержания продуктов ранней деструкции белка (АДФГс) относительно исходного уровня на 57% и на 43% в подгруппе гомозигот по 1 аллелю. Статистически значимая динамика маркеров поздней деструкции не наблюдалась (Таблица 42).

Таблица 42 – Динамика показателей ОМБ 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)
АДФГс до начала терапии, отн.ед.	0,0007 [0,0003;0,0009]	0,0007 [0,0004;0,0011]	0,0006 [0,0004;0,0010]
АДФГс через 3 месяца терапии, отн.ед.	0,0004 [0,0003;0,0008]* p=0,009	0,0003 [0,0003;0,0007]* p=0,048	0,0005 [0,0003;0,0008]

Примечание: – АДФГс- альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные, * – уровень статистической значимости различий между показателями до и через 3 месяца терапии.

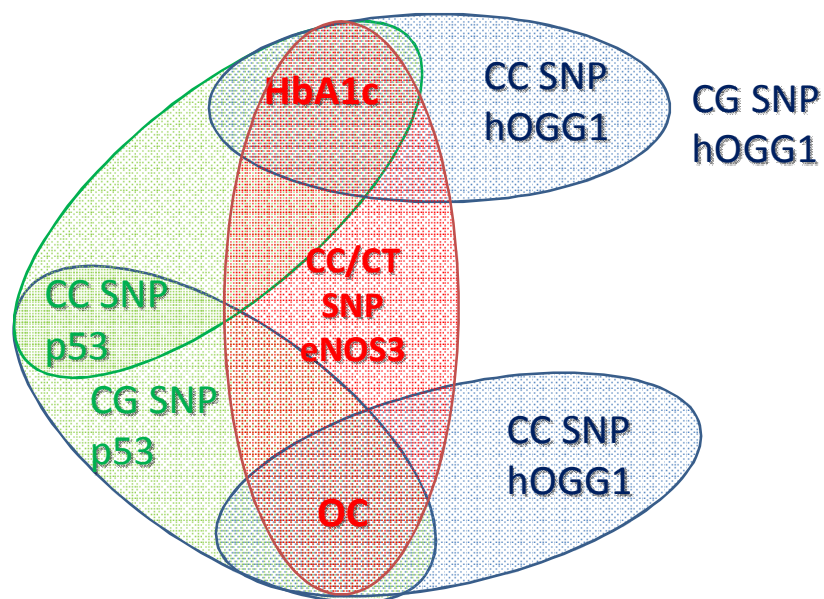
При исследовании исходных гликемических показателей, показателей окислительного стресса, липидного профиля и системного воспаления не было выявлено принципиальных различий между группами гаплотипов ОНП гена белка p53. После 3 месяцев терапии метформином статистически значимая динамика исследованных гликемических показателей отмечалась у гаплотипа CC полиморфизма гена белка p53 (rs 1042522), а ограничение окислительного стресса при применении метформина наблюдается у представителей как CC, так и CG гаплотипов (Рисунок 10).



Примечание: – HbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, СРА (I max) – максимальная интенсивность индуцированной хемилюминесценции, МДА - малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты, ТК – триеновые конъюгаты, АДФГс-альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные.

Рисунок 10 – Статистически значимая динамика некоторых показателей среди гаплотипов ОНП С215G гена белка р53.

Изучение динамики показателей среди гаплотипов трех полиморфных генов было сделано заключение, что именно полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота С786Т явился самым значимым маркером как сахароснижающей эффективности, так и способности ограничивать стресс у препарата метформин (Рисунок 11). Таким образом, наличие гаплотипов СС и СТ полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота С786Т прогнозируют продолжительную терапию метформином у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа и уровнем гликированного гемоглобина 6,5-8,0%.



Примечание: – HbA_{1c},% - гликированный гемоглобин, ОС – окислительный стресс, SNP (ОНП) – однонуклеотидный полиморфизм, hOGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, eNOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота, p53 – белок p53, CC, CT, CG –соответствующие гаплотипы.

Рисунок 11 – Статистически значимая динамика гликемических показателей и показателей окислительного стресса среди гаплотипов ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота,ОНП С977G гена 8 – оксогуанин-ДНК-гликозилазы и ОНП С215G гена белка p53.

4.4. Резюме

При изучении выбранных показателей у представителей разных гаплотипов ОНП С786Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота установлено, что у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с гаплотипом СС отмечается более низкий исходный уровень гликированного гемоглобина. Через 3 месяца применения препарата метформин у пациентов всех гаплотипов регистрируется статистически значимое значимое снижение уровня гликированного гемоглобина, ГПН, а повышение содержания С – пептида – только в подгруппах СС

и СТ, тогда как в подгруппе ТТ отмечается снижение данного показателя. Динамика интегрального показателя гликемии, как HbA_{1c} является более выраженной у представителей СС и СТ гаплотипов по сравнению с аналогичным показателем у гаплотипа ТТ. Исходные показатели хемилюминесценции у представителей трех гаплотипов существенно не отличаются. Через 3 месяца приёма препарата метформин у пациентов всех гаплотипов снижается показатель I_{max} , повышается $tg\alpha_2$, но только в подгруппах ТТ и СТ статистически значимо возрастает ОАА (1/S). Представители ТТ гаплотипа обладают более низкой исходной активностью СОД в отличие от других гаплотипов, но через 3 месяца применения метформина активность данного фермента статистически значимо возрастает лишь в этой подгруппе. Однако активность каталазы значимо увеличивается в подгруппах СС и СТ. Динамика показателей неферментативной АОС у представителей СС гаплотипа ОНП С786Т эндотелиальной синтазы оксида азота при применении метформина значительна и являлась статистически значимой: повышение содержания церулоплазмина на 45% и снижение гаптоглобина на 27%. В подгруппе СТ гаплотипа наблюдалось значимое снижение гаптоглобина на 55%. Такие изменения в неферментивной 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 и СТ – в 2,5 раза через 3 месяца применения метформина. Представители разных гаплотипов ОНП синтазы оксида азота 3 сопоставимы по исходным показателям ПОЛ. Через 3 месяца применения метформина уровень МДА и ДК снижается у пациентов с СС и СТ гаплитипами, уровень ТК – только с СС-гаплотипом. Показатели коэффициента МДА/(ДК+ТК) у представителей гаплотипов ОНП гена синтазы оксида азота 3 сопоставимы, однако, снижение этого показателя в течение периода наблюдения статистически значимо только в СС подгруппе на 47% относительно исходного уровня. По исходным показателям ОМБ подгруппы с разными гаплотипами не отличаются друг от друга статистически значимо. В подгруппе СС в динамике периода наблюдения отмечено стати-

стически значимое снижение уровня ранних маркеров деструкции белка относительно исходной величины на 64%, а в подгруппе СТ – на 33% .

При изучении показателей у представителей разных гаплотипов ОНП С977G гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы установлено, что у пациентов с впервые СД 2 типа с разным гаплотипом исходные показатели гликемии, липидного профиля, системного воспаления и окислительного стресса существенно не отличаются. Через 3 месяца применения метформина в подгруппах гаплотипов СС и СG значимо снижается уровень гликированного гемоглобина и ГПН. Кроме того, у гетерозиготных пациентов отмечается повышение уровня С-пептида. В течение периода наблюдения содержание ЛПВП увеличивается, а ТГ и атерогенный индекс снижаются у представителей СС гаплотипа. Исходные интегральные показатели ОС сопоставимы у обеих подгрупп гаплотипов полиморфного гена. Снижение показателя I_{max} (СРА) и повышение $tg\alpha 2$ (напряженность АОС) в процессе применения метформина в течение 3 месяцев регистрируется у представителей двух исследованных гаплотипов без существенных различий между ними. Показатель неферментативной АОС - уровень церулоплазмин а - у представителей гаплотипа СС 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы статистически значимо повышается на 63% относительно исходного уровня через 3 месяца применения метформина. Уменьшение интенсивности свободно-радикальных процессов за счет активации неферментативной антиоксидантной системы, о чем свидетельствует статистически значимое снижение коэффициента гаптоглобин/церулоплазмин, наблюдается у представителей гаплотипов СС практически в 2 раза через 3 месяца применения метформина. Статистически значимое снижение содержания всех исследованных молекулярных продуктов ПОЛ отмечается только в подгруппе СС, вместе с тем, показатель насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)) сопоставим у всех гаплотипов, и динамика незначительна, что также подтверждается отсутствием динамики показателей ОМБ.

При изучении показателей у представителей разных гаплотипов ОНП С215G гена белка р53 установлено, что у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с разным гаплотипом исходные показатели гликемии,

окислительного стресса, системного воспаления и липидного профиля значимо не отличаются. Через три месяца применения препарата метформин уровень гликированного гемоглобина и ГПН значимо снижается в подгруппах представителей всех изученных гаплотипов, но динамика более выражена в CC подгруппе. Снижение уровня ТГ регистрируется в GG, а уровня С-реактивного белка – в CG подгруппе гаплотипа. Показатель I_{max} (CРА) значимо уменьшается, а tga_2 значимо возрастает во всех исследованных подгруппах гаплотипов, при этом показатель $1/S$ (ОАА) увеличивается только в подгруппах гомозигот. Данный факт обусловлен, по-видимому тем, что активность СОД значимо возрастает у представителей гомозигот по аллелю С, а у гетерозиготных пациентов, напротив, значимо снижается. За счет статистически значимого повышения уровня церулоплазмينا в подгруппах CC и CG (на 17% и 26% соответственно) гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg) отмечено статистически значимое снижение отношение гаптоглобин/церулоплазмин у предстаивтелей этих гаплотипов при применении метформина. Кроме того, в подгруппе CC существенно снижается не только уровень МДА, как и в остальных подгруппах, но и триеновых конъюгатов. Вместе с тем, стоит отметить тот факт, что уровень раннего маркера деструкции белка (АДФГс) уменьшается существенно в подгруппах CC и CG, что также отражается на статистически значимом снижении коэффициента насыщенности ПОЛ на 48% (в подгруппе CC).

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 значимое изменение липидного профиля (повышение содержания триглицеридов на 78%, $p=0,04$) и атерогенного индекса на 60%, $p=0,001$), что свидетельствует о взаимосвязи глюко- и липотоксичности. У пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа подтверждена интенсификация окислительного стресса и снижение антиоксидантной активности: отмечена сниженная активность СОД (на 18%, $p=0,027$) и уровень церулоплазмينا (на 39%, $p<0,001$), что не способствует полноценному ограничению окислительного стресса у данной категории больных. Об этом свидетельствуют также повышенная активность СРО на 9% ($p=0,038$), статистически значимое повышение содержания молекулярных продуктов ПОЛ (МДА - в 2 раза, $p=0,001$; ДК - на 73%, $p=0,021$) и ОМБ (АДФГс - на 60%, $p=0,032$; КДФГс - на 50%, $p<0,01$), гаптоглобина (на 31%, $p=0,007$), двукратное увеличение коэффициента гаптоглобин/церулоплазмин и 4-х кратное увеличение по сравнению с лицами без сахарного диабета коэффициента насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)). Результаты проведенного обследования подтверждают данные других исследователей и свидетельствуют о том, что в основе прогрессирования сахарного диабета и осложнений лежит индуцированный даже небольшой гипергликемией окислительный стресс. Следовательно, сахароснижающие препараты, которые применяются в терапии этих больных, должны, безусловно, обладать способностью ограничивать перекисное окисление липидов и окислительную модификацию белков. Метформин – идеальный кандидат как для коррекции гликемии (препарат первой линии при впервые выявленном сахарном диабете, уровня компенсации гликированного гемоглобина $<7,0\%$ достигают от 64% до 75% пациентов с сахарным диабетом 2 типа при условии максимальной приверженности лечению так и для коррекции окислительного стресса) [24]. Однако у 25%-36%, то есть от $\frac{1}{4}$ до $\frac{1}{3}$ пациентов, не отмечается такой компенсации. В связи с этим, проводятся исследования по поиску ассоциаций полиморфных ге-

нов с резистентностью к применяемым препаратам. Причины неэффективности и «эффект ускользания» от сахароснижающей терапии метформином на данный момент остаются не до конца ясными. Оценка значения ОНП генов, непосредственно не связанных с фармакокинетикой и фармакодинамикой сахароснижающих препаратов, в частности, метформина, для прогнозирования эффективности терапии ограничивается единичными исследованиями, вызывает особые затруднения, в том числе и в интерпретации результатов из-за этнической, гендерной принадлежности и других интерферирующих факторов.

Генетическое исследование полиморфизмов трех генов (rs2070744, rs1052133, rs1042522) показало, что частоты встречаемости гаплотипов среди пациентов с СД 2 типа не отличаются от таковых среди лиц без нарушения углеводного обмена. Таким образом, с одной стороны, показано генетическое разнообразие пациентов с впервые выявленным СД 2 типа, которое, с другой стороны, не отличается от такового среди лиц без нарушения углеводного обмена, что свидетельствует об отсутствии ассоциаций изученных ОНП с частотой развития СД 2 типа. Также не было выявлено различий по показателям гендерного соотношения, возраста, индексу массы тела и сопутствующим заболеваниям между представителями гаплотипов внутри одного ОНП у пациентов с впервые выявленным СД 2. Однако, учитывая данные литературы о том, что изученные полиморфизмы связаны с различными звеньями патогенеза СД 2 типа, а также, вероятно, определяют индивидуальный ответ пациента на сахароснижающую терапию, при проведении дальнейших исследований динамика показателей при применении препарата метформин оценивалась в зависимости от генотипа пациента.

Через 3 месяца применения препарата метформин у пациентов всех гаплотипов ОНП C786T эндотелиальной синтазы оксида азота регистрируется статистически значимое снижение уровня гликированного гемоглобина ($p < 0,05$), ГПН ($p < 0,05$), а повышение содержания C – пептида отмечается только в подгруппах CC и CT ($p = 0,027$ и $p = 0,042$ соответственно), тогда как в подгруппе TT отмечается снижение данного показателя ($p = 0,041$). Исходные показатели хемилюминесценции у представителей трех гаплотипов существенно не отличаются. После 3-х

месяцев приёма метформина у пациентов всех гаплотипов снижается показатель $\text{tg}\alpha 2$, при этом более значимо в подгруппе СС ($p=0,033$), повышается $\text{tg}\alpha 2$ ($p<0,05$). Однако активность каталазы значимо увеличивается в подгруппах СС и СТ ($p=0,044$ и $p=0,049$ соответственно). При этом у представителей СС гаплотипа ОНП С786Т эндотелиальной синтазы оксида азота отмечено 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%. Такие изменения в неферментивной 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 и СТ – в 2,5 раза через 3 месяца применения метформина. Наибольшая положительная динамика в виде уменьшения МДА отмечалась в СС и СТ подгруппах ($p=0,0003$ и $p=0,0005$ соответственно) и ДК в СС и СТ подгруппах ($p=0,003$ и $p=0,016$ соответственно). Снижение уровня ТК отмечалось только в СС подгруппе и было статистически значимым ($p=0,0001$). Коэффициент МДА/(ДК+ТК) статистически значимо снизился только в СС подгруппе на 47% ($p=0,004$) относительно исходного уровня. Под влиянием метформина в подгруппе СС отмечено статистически значимое снижение уровня ранних маркеров деструкции белка относительно исходной величины на 64%, а в подгруппе СТ – на 33%. Таким образом, 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), следовательно, наличие данных гаплотипов могут прогнозировать эффективность препарата метформин как в коррекции гликемии, так и окислительного стресса, играющего ведущую роль в прогрессировании заболевания и его осложнений.

При изучении показателей у представителей разных гаплотипов ОНП С977G гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы установлено, что у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с разным гаплотипом исходные показатели гликемии, липидного профиля, системного воспаления и окислительного

стресса существенно не отличаются. Через 3 месяца применения метформина в подгруппах гаплотипов CC и CG значительно снижается уровень гликированного гемоглобина ($p=0,014$ и $p=0,013$ соответственно) и ГПН ($p=0,006$ и $p=0,004$ соответственно). Статистически значимые изменения после 3-х месяцев применения метформина имели место только у больных с гаплотипом CC ОНП данного гена: увеличение ЛПВП ($p=0,049$), снижение ТГ ($p=0,009$) и атерогенного индекса ($p=0,031$). Исходные интегральные показатели ОС сопоставимы у обеих подгрупп гаплотипов полиморфного гена. Статистически значимое снижение показателя I_{max} (CРА) и повышение $tg\alpha 2$ (напряженность АОС) в процессе применения метформина в течение 3 месяцев регистрируется у представителей двух исследованных гаплотипов без существенных различий между ними ($p>0,05$), при этом уровень церулоплазмина - у представителей гаплотипа CC 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы статистически значимо повышается на 63% ($p=0,009$). Уменьшение интенсивности свободно-радикальных процессов происходит за счет активации неферментативной антиоксидантной системы, о чем свидетельствует статистически значимое снижение коэффициента гаптоглобин/церулоплазмин. У представителей гаплотипов CC снижение коэффициента отмечается практически в 2 раза. Статистически значимое снижение содержания всех исследованных молекулярных продуктов ПОЛ отмечается только в подгруппе CC (для МДА $p=0,011$; для ДК $p=0,004$; для ТК $p=0,003$), вместе с тем, показатель насыщенности ПОЛ (МДА/(ДК+ТК)) сопоставим у всех гаплотипов, и динамика незначительна, что также подтверждается отсутствием динамики показателей ОМБ. Следовательно, через три месяца применения препарата метформин наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей отмечается у пациентов с гаплотипом CC полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (rs 1052133). Можно предполагать, что наличие данного гаплотипа прогнозирует сахароснижающую и гиполипидемическую эффективность препарата метформин, что способствует ограничению процессам перекисного окисления липидов у больных с впервые выявленным сахарным диабетом.

При изучении показателей у представителей разных гаплотипов ОНП C215G гена белка p53 установлено, что у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа с разным гаплотипом исходные показатели гликемии, окислительного стресса, системного воспаления и липидного профиля значимо не отличаются. Через три месяца применения препарата метформин уровень гликированного гемоглобина и ГПН значимо снижается в подгруппах представителей всех изученных гаплотипов, но динамика более выражена в CC подгруппе ($p=0,022$ и $p=0,019$ соответственно). Снижение уровня ТГ регистрируется в GG подгруппе ($p=0,046$), а уровня С-реактивного белка – в CG подгруппе гаплотипа ($p=0,048$). Показатель I_{max} значимо уменьшается, а $tg\alpha 2$ значимо возрастает во всех исследованных подгруппах гаплотипов, при этом показатель $1/S$ (ОАА) увеличивается только в подгруппах гомозигот ($p=0,002$). Данный факт обусловлен, по-видимому, увеличением активности СОД ($p=0,045$). За счет статистически значимого повышения уровня церулоплазмينا в подгруппах CC и CG (на 17% и 26% соответственно) гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg) отмечено статистически значимое снижение отношение гаптоглобин/церулоплазмин у представителей этих гаплотипов при применении метформина ($p=0,014$ и $p=0,022$ соответственно), что свидетельствует о роли неферментативной антиоксидантной защиты в коррекции окислительного стресса. В подгруппе CC существенно снижается не только уровень МДА ($p=0,002$), как и в остальных подгруппах CG и GG ($p=0,003$ и $p=0,009$ соответственно), но и триеновых конъюгатов ($p=0,002$). Стоит отметить тот факт, что уровень раннего маркера деструкции белка (АДФГс) уменьшается существенно в подгруппах CC ($p=0,009$) и CG ($p=0,048$), что также отражается на статистически значимом снижении коэффициента насыщенности ПОЛ в 2 раза (в подгруппе CC, $p=0,004$). Таким образом, через три месяца применения препарата метформин наиболее выраженная динамика большинства исследованных показателей отмечается у пациентов с гаплотипами CC и CG полиморфизма гена белка p53 (rs1042522). Доказано, что при наличии указанных гаплотипов значения изученных показателей в процессе монотерапии метформинном 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. Частоты встречаемости гаплотипов изученным полиморфных генов (эндотелиальная синтаза оксида азота, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, белок p53) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа существенно не отличается от таковых 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 p53 (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 p53 (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 персонифицированной 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 (rs1052133) 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 СОКРАЩЕНИЙ

АДФГ и	альдегид-динитрофенилгидразоны индуцированные
АДФГс	альдегид-динитрофенилгидразоны спонтанные
АЛАТ	аланинаминотрансфераза
АСАТ	аспартатаминотрансфераза
АОС	антиоксидантная система
АтИн	атерогенный индекс
ДК	диеновые конъюгаты
ИМТ	индекс массы тела
КАТ	каталаза
КПНГ	конечные продукты неферментативного гликозилирования
КДФГи	кетон-динитрофенилгидразоны индуцированные
КДФГс	кетон-динитрофенилгидразоны спонтанные
ЛПВП	липопротеины высокой плотности
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
мтДНК	митохондриальная ДНК
МДА	малоновый диальдегид
ОАА	общая антиоксидантная активность (1/S)
ОМБ	окислительная модификация белков
ОНП	однонуклеотидный полиморфизм
ОС	окислительный стресс
ОХ	общий холестерин
ОШ	отношение шансов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СД 2 типа	сахарный диабет 2 типа
СОД	супероксиддисмутаза
СРА	Свободнорадикальная активность
СРО	свободнорадикальное окисление

ТГ	триглицериды
ТК	триеновые конъюгаты
eNOS	эндотелиальная синтаза оксида азота
HbA _{1c}	гликозилированный гемоглобин
hOGG1	человеческая оксогуанин – ДНК- гликозилаза 1
I _{max}	максимальная интенсивность индуцированной хемиллюминесценции
NO	оксид азота
rs	референсный сиквенс человека
S	светосумма
tgα ₂	тангенс альфа 2(напряженность АОС)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой// издание шестое. - М.:ФГБУ ЭНЦ, 2013. - 120 с.
2. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом/ Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой// издание седьмое. - М.:ФГБУ ЭНЦ, 2014. - 112 с.
3. Александров, А.А. Метформин – «миледи» сахарного диабета / А. А. Александров // Русский медицинский журнал. - 2012. - №: 14. - С. 666-670.
4. Аметов, А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. – М.: ГЭО-ТАР-Медиа. - 2011. – С. 1115 – 119.
5. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения.- Спб.: Наука.-2003.- 468 с.
6. Арутюнян, А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. – СПб.: Фолиант, 2000. – 104 с.
7. Ассоциация полиморфных маркеров rs7903146 гена 1СГ712и rs1801282 гена PPARG (Pro12Ala) с сахарным диабетом 2 типа в Новосибирской области / И.А. Бондарь [и др.] // Сахарный диабет. – 2013. - № 4. – С. 17-22.
8. Ассоциация полиморфного локуса rs11212617 гена АТМ с ответом на терапию метформином у больных сахарным диабетом 2 типа в Новосибирской области / О.Ю. Шабельникова, И.А. Бондарь, М.Л. Филиппенко, Е.А. Соколова // Сборник тезисов VII Всероссийского диабетологического конгресса. ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздрава России; ОО Российская Ассоциация Эндокринологов; Министерство здравоохранения Российской Федерации. Москва, 2015. – С.48.
9. Балаболкин, М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М. И. Балаболкин // Сахарный диабет . - 2002. - № 4.- С. 5-16.

10. Балаболкин, М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М. И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В. М. Креминская. – М.: Медицина, 2005. - 512 с.
11. Бондарь, И.А. Метформин в лечении сахарного диабета 2 типа: новые данные об известном препарате / И.А. Бондарь, В.В. Климонтов // Эффективная фармакотерапия в эндокринологии. – 2010. - №1. – С.14-18.
12. Бондарь, И.А., Генетические основы сахарного диабета 2 типа / И.А. Бондарь, О.Ю. Шабельникова // Сахарный диабет. – 2013. - № 4. – С. 11–16.
13. Взаимосвязь полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы, eNOSинтазы и развития диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом I типа / И.А. Бондарь, М.Л. Филиппенко, И.П. Рогова, Е.Н. Воронина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.- 2006. - №1(47). – С.103-108.
14. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С.341 – 388.
15. Владимиров, Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. / Ю.А. Владимиров// Соросовский образовательный журнал . -1999.- №6.- С. 25-32.
16. Воронина, Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // Фарматека. – 2009. - №6. – С. 28-31.
17. Вышковский Г.Л. Электронная версия справочника РЛС 2014 года выпуск 22 М.: Группа компаний РЛС, 2014. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
18. Генетика моногенных форм сахарного диабета / Л.И. Зильберман [и др.] // Сахарный диабет. – 2011. - №1. – С. 20-27.
19. Генетика окислительного стресса: Монография / Е.П. Гуськов [и др.]. – Ростов-на-Дону: СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009.– 156 с.
20. Генетическая оценка конститутивной чувствительности к метформину онкологических больных, страдающих и не страдающих диабетом / Л. М. Берштейн, Д. А. Васильев, А. Г. Иевлева, Е. Н. Имянитов // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59, № 6. - С. 714-719.

21. Гормонально-метаболические и генетические маркеры чувствительности к метформину при диабете и раке: предсказание и реальность / Л.М. Берштейн [и др.] // Сахарный диабет. – 2014. - № 1. – С. 21–28.
22. Губский, Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю.И.Губский, И.Ф.Беленичев, С.В.Павлов и др.// Совр. пробл. токсикол. — 2005. — № 3. — С.20-26.
23. Дедов, И.И. Значение результатов полногеномных исследований для первичной профилактики сахарного диабета 2 типа и его осложнений. Персонализированный подход. / И.И. Дедов, О.М. Смирнова, И.В. Кононенко// Сахарный диабет.-2014. - №2. - С.10–19.
24. Демидова, Т.Ю. Метформин: новые преимущества в свете доказательной медицины / Т.Ю Демидова, И.Н. Дроздова // Эффективная фармакотерапия. Эндокринология.-2015. - №3(28). – С. 32-36.
25. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения/ Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, Г.Е. Поротов //Вопросы медицинской химии. 1995. Т.41. №1. С. 24-26.
26. Занозина, О. В. Роль окислительного стресса в развитии и прогрессировании поздних осложнений сахарного диабета 2 типа. Возможности антиоксидантной терапии : дис. ... докт. мед. наук : (14.01.04) / Занозина Ольга Владимировна.- Нижний Новгород, 2010.- 326 с.
27. Зорина, В.В. Основы полимеразной цепной реакции. – М.: 2012. – 80 с.
28. Конторщикова, К.Н. Перекисное окисление липидов при коррекции гипоксических состояний физико-химическими факторами: Автореф. дис. докт. биол. наук СПб, 1992. - 30 с.
29. Конторщикова К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии. - Н. Новгород, 2000, - 23 с.
30. Кравчук, Е.Н. Применение метформина при сочетании ишемической болезни сердца и сахарного диабета 2 типа: механизмы действия и клиническая эффек-

- тивность / Е.Н. Кравчук, М.М. Галагудза // Сахарный диабет. – 2013. - №1. - С.5–14.
31. Краевой, С.А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей / С.А. Краевой, Н.А. Колтовой / Открытая капля. - Москва, 2013 С. 21-24. - 2 т.
32. Ланкин, В.З. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин. – Новосибирск: АРТА, 2008. -284 с.
33. Ланкин, В.З. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2 / В.З. Ланкин, А.К.Тихазе, Е. М. Кумскова // Кардиологический вестник . -2008. - Т.3, № 1. – С. 60 – 67.
34. Ляйфер, А.И. Система перекисного окисления липоидов-антиоксидантная защита и роль ее нарушений в патогенезе сахарного диабета и ангиопатий / А. И. Ляйфер, М. Н. Солун //Пробл. эндокринологии. – 1993. - №1. – С. 57 – 59.
35. Минина, В. И. Вклад полиморфизма генов ферментов репарации ДНК в хромосомный мутагенез в лимфоцитах крови человека (обзор литературы) / В.И. Минина // Вестник КемГУ.- 2013.- № 1 (53).- С. 34 – 38.
36. Недосугова, Л. В. Окислительный стресс при сахарном диабете типа 2 и возможности его медикаментозной коррекции: дис. ...докт. мед. наук: (14.00.03); (03.00.04) / Недосугова Людмила Викторовна. – Москва, 2006. – 375 с.
37. Носиков В.В. Генетика сахарного диабета типа 1 / Геномика — медицине. Научное издание / Под ред. академика РАМН В.И. Иванова и академика РАН Л.Л. Киселева. М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. - С. 281 - 311.
38. Носиков В.В. Геномика сахарного диабета типа 1 и его поздних осложнений / В.В. Носиков // Молекулярная биология. -2004. –Т.38,№ 1. — С. 150 – 164 .
39. Носиков В.В. Молекулярная генетика сахарного диабета типа 1: достижения и перспективы / В.В. Носиков, Ю.А. Серегин // Молекулярная биология. — 2008. – Т. 42, №5.- С. 867-879..
40. Однонуклеотидные полиморфизмы как маркёры индивидуальной реакции на хроническое радиационное воздействие / К.В. Уткин [и др.] // Ядерная и радиационная безопасность. – 2011. - № 4(62) - С. 44-50.

41. Опыт применения стандартизованного подхода к практическому использованию фармакогенетического тестирования (изучение полиморфизмов CYP2C9 и VKORC1) для персонализации дозирования варфарина / И.М. Антонов [и др.] // Клиническая фармакология и фармакоэкономика,- 2009. - №. 2.- С. 69-70.
42. Отсутствие ассоциации полиморфных локусов rs5219 гена KCNJ11 и rs757110 гена ABCC8 с долгосрочным ответом на терапию препаратами сульфонилмочевины в Новосибирской области / И.А. Бондарь, М.Л. Филипенко, О.Ю. Шабельникова, Е.А. Соколова // Сахарный диабет. - 2015. Т. 18, № 1.- С. 42-47.
43. Патент RU 2226276 С2 МПК 7 G01N33/48. «Способ интегральной оценки окислительного стресса при неотложных состояниях» /Абакумов М.М. и др.; Патентообладатель Московский городской научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. - №2002105650/15; заявл., 05.03.2002; опубл. 27.03.2004
44. Патент RU 2 436 101 G01N 33/573 (2006.01). «Способ диагностики нарушений метаболизма в организме в условиях окислительного стресса»/ Басов А.А. и др.; Патентообладатель ГОУ ВПО КГМУ - №2010126241/15: заявл. 25.06.2010; опубл. 10.12.2011.- Бюл. № 34.-20 с.
45. Патент RU2121680 С1 МПК 6 G01N33/50. «Способ диагностики осложненной химиолучевой терапии у онкологических больных»/ Легеза В.И. и др.; Патентообладатель Нижегородская государственная медицинская академия. Артеменко А. Г, Конторщикова К. Н - №93056063/14; заявл. 21.12.1993; опубл. 10.11.1998
46. Патент RU 2456601 С1 МПК G01N33/49 (2006.01). «Способ оценки течения раневого процесса при синдроме диабетической стопы»/ Намоконов Е.В. и др.; Патентообладатель ГБОУ ВПО ЗабГУ, ГБОУ ВПО ЧГМА РФ - №2010150054/15; заявл. 06.12.2010; опубл. 20.07.2012.- Бюл.- № 20 – 7с.
47. Патент RU 2 524 667 С1 МПК G01N 33/52 (2006.01). «Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях» / Фомина М.А. и др. Патентообладатель ГБОУ ВПО РГМУ им. Академика И.П. Павлова - №:2013102618/15; заявл. 21.01.2013; опубл. 27.07.2014.- Бюл. № 21. – 9 с.

48. Патент RU 2478958 C1 МПК G01N33/48, G01N33/49 . «Способ диагностики декомпенсации сахарного диабета 2 типа / Щербатюк Т.Г., Занозина О.В., Клинцева Е.С., Занозина Ю.А., Потехина Ю.П.Патентообладатель ГБОУ ВПО «НиЖ-ГМА» Минздравсоцразвития России - № 2012100928/15; заявл. 11.01.2012; опубл. 10.04.2013
49. Полиморфизм t-786с промотора гена эндотелиальной NO-синтазы: связь с эффективностью тромболитической терапии у пациентов с острым инфарктом миокарда / А.Н. Пархоменко, С.Н. Кожухов, Я.М. Лутай [и др.] // Укр. Мед. часопис. - 2008. - №4 (66) – С. 20-23.
50. Полиморфизм генов ферментов репарации ДНК у больных раком лёгкого / Ю. А. Журавлёва [и др.] // Сибирский онкологический журнал.- 2012. Приложение 1.0.- С. 68.
51. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. - М.:- МедиаСфера, 2006. – 312с.
52. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007-2012 годы» / под. ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой . - Москва .- 2012. - 144 с.
53. Романюк, О. П. Полиморфизм генов эксцизионной репарации XPD, XRCC 1 и hOGG1 у населения республики Беларусь и его влияние на канцерогенез / О.П. Романюк // Экологическая генетика. - 2013.- Т.11, № 4 - С. 45-63.
54. Середенин, С.Б. Генетико-биохимическое развитие проблемы индивидуальной чувствительности к лекарственным средствам / С.Б. Середенин, Е.А. Вальдман // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т.6,№2. – С. 57-59.
55. Смирнова, О. М. Свободно – радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете / О. М. Смирнова, Т. В. Никонова. – М.: 2003. – 40с.

56. Смирнова, О.М. Место метформина в современном лечении и профилактике сахарного диабета 2 типа / О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. - №3. - С. 83-90.
57. Сорокина, Ю.А. Полиморфизм гена эндотелиальной синтазы азота и сахарный диабет 2 типа / Ю.А. Сорокина, Л.В. Ловцова // Архивъ внутренней медицины. – 2014. - №6 . - С. 34 - 37.
58. 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).
59. Степанов, В. А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонафицированная медицина / В.А. Степанов // Acta Natura. - 2010 .- Т. 2, № 4 (7). - С. 18 - 34.
60. Тихомирова, Ю.Р. Показатели липидного обмена и окислительной модификации белков при метаболических нарушениях / Ю.Р. Тихомирова, К.Н. Конторщикова // Биорадикалы и антиоксиданты. 2015. Т. 2. № 1 (2). С. 62-66.
61. Тодоров, И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологии, процессе старения и апоптозе / И.Н. Тодоров // Рос. Хим.ж.Ж. Рос.хим.об-ва им. Д. Т. Менделеева. – 2007. – Т.2, № 1.- С. 93-106.
62. Хромосомные aberrации и полиморфизм генов эксцизионной репарации у работников СХК с онкологическими заболеваниями / Г. Н. Мансурова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Приложение № 1.
63. Часовских, Н.Ю. Молекулярные механизмы апоптоза при окислительном стрессе. Автореферат кандидатской мед.наук (14.00.16), (03.00.25)/ Н.Ю. Часовских.-Томск, 2009.-45 с.
64. Часовских, Н.Ю. Апоптоз и окислительный стресс / Н.Ю. Часовских, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий. - Томск: Печатная мануфактура, 2009. – 140 с.

65. Чумаков, П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. - 2007. - № 47. - С. 3–52.
66. Шабалин, В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина. - М.,2001.- 303 с.
67. Яшин, А. Высокоэффективная жидкостная хроматография маркеров окислительного стресса / А.Яшин, Я.Яшин// Аналитика. - 2011. №10 - С. 34-43.
68. A common 5'-UTR variant in MATE2-K is associated with poor response to metformin / J.H. Choi [et al.] // Clin Pharmacol Ther. – 2011. – Vol. 90(5). –P. 674-684. doi: 10.1038/clpt.2011.165.
69. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes / L. Monnier [et al.] // JAMA. – 2006. – Vol. 295. – P. 1681 – 1687.
70. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance / Minamino T. [et al.] // Nature Med. – 2009. – Vol. 15(9). – P. 1082-1087.
71. A gene–gene interaction between polymorphisms in the OCT2 and MATE1 genes influences the renal clearance of metformin / M. M. Christensen [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. – 2013. – Vol. 23(10). – P. 526–534.
72. A Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent / D. Roy, M. Perreault, A. Marette // AJP-Endocrinology and Metabolism. - 1998.- Vol. 274(4). - E692-E699.
73. Adimoolam, S. P53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair / S. Adimoolam, J.M. Ford // DNA Repair. – 2003. – Vol. 2, № 9. – P. 947–954
74. Alteration of mitochondrial function and insulin sensitivity in primary mouse skeletal muscle cells isolated from transgenic and knockout mice: role of OGG1 / L.V. Yuzefovych [et al.] // Endocrinology. – 2013. – Vol. 154(8). – p. 2640-2649. doi: 10.1210/en.2013-1076.
75. AluYb8 insertion in the MUTYH gene is related to increased 8-OHdG in genomic DNA and could be a risk factor for type 2 diabetes in a Chinese population /

- Chen H. [et al.] // *Mol Cell Endocrinol.* – 2011. – Vol. 332(1-2) . – P. 301-305. doi: 10.1016/j.mce.2010.11.021.
76. Alvarado-Vásquez, N. Reduced NO synthesis and eNOS mRNA expression in endothelial cells from newborns with a strong family history of type 2 diabetes/ N. Alvarado-Vásquez // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2007. – Vol. 10. - P. 559-566.
77. American Heart Association: Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE and VA diabetes trials; a position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association / J. S.Skyler, R.Bergental, R. O. Bonow [et al.] // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 187-192.
78. Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin / Dutra F. [et al] // *Chem Res Toxicol.* 2005.- Vol. 18(4). – P. 755-760.
79. Amiri, A.A. Haptoglobin polymorphism in individuals with type 2 diabetic microangiopathy / A.A. Amiri // *North American Journal of Medical Sciences.* 2013. – Vol. 5(9). – P. 529–535.
80. Association between polymorphisms in RAPGEF1, TP53, NRF1 and type 2 diabetes in Chinese Han population / Qu L. [et al.] // *Diabetes Research and Clinical Practice.* – 2011. – Vol. 91(2):171-176. doi: 10.1016/j.diabres.2010.11.019.
81. Association between polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and hOGG1 and type 2 diabetes mellitus in the Polish population / J.Kasznicki [et al.] // *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej.*- 2009.-Vol. 119(3). – P. 122-128.
82. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy / I. Ezzidi [et al.] // *J Diabetes Complications.* – 2008. – Vol. 22(5). – P. 331-338. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2007.11.011
83. Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients / L. Tarasova [et al.] // *Pharmacogenet Genomics.* – 2012. – Vol. 22(9). – P. 659-666. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283561666.

84. Association of the genetic variants of endothelial nitric oxide synthase gene with angiographically defined coronary artery disease and myocardial infarction in South Indian patients with type 2 diabetes mellitus / P. Narne [et al.] // *J Diabetes Complications*. – 2013. – Vol. 27(3). – P. 255-261. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.009
85. Association of the Ser326Cys polymorphism in the OGG1 gene with type 2 DM / M. Daimon [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2009 . – Vol. 386(1) . –P. 26-29. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.119.
86. Associations between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and increased body mass index and fasting glucose level in the Japanese general population / M. Hara, K. Nakamura, H. Nanri [et al.] // *Journal of Epidemiology*. – 2014. – Vol. 24(5). – Vol. 379-384
87. Baynes, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes / J. W. Baynes // *Diabetes*. – 1991. –Vol.40. – P. 405 – 412.
88. Bestermann, W.H. Jr . The ADMA-Metformin Hypothesis: Linking the Cardiovascular Consequences of the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes / W.H. Jr Bestermann // *Cardiorenal Med*. – 2011. – Vol. 1(4). – P. 211-219.
89. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // *Nature*. – 2001. – Vol.414. – P.813 – 820.
90. Chacko, S.K. Increased ceruloplasmin and fibrinogen in type 2 diabetes corresponds to decreased anti-oxidant activity in a preliminary tertiary South Indian hospital study/ S.K. Chacko, R. Cheluvappa // *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.- 2010. – Vol. 118(1). – P. 64-67.
91. Copper and ceruloplasmin levels in relation to total thiols and GST in type 2 diabetes mellitus patients / A. Sarhar [et al] // *Indian J Clin Biochem*. 2010. – Vol. 25(1). – P. 74-76
92. Chakraborty, A. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients / A. Chakraborty, S. Chowdhury, M. Bhattacharyya // *Diabetes Res Clin Pract*.-2011. – Vol. 93(1). – P. 56–62. doi: 10.1016/j.diabres.2010.11.030

93. Chandel, N.S. Mitochondria as signaling organelles / N.S. Chandel // *BMC Biology*. – 2014. – P. 12:34. doi:10.1186/1741-7007-12-34
94. Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program / K.A. Jablonski [et al.] // *Diabetes*.- 2009.- Vol. 59(10) . – P. 2672-2681. doi: 10.2337/db10-0543.
95. Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes / Gaulton K.J. [et al.] // *Diabetes*. -2008. – Vol. 57(11) . – P. 3136-3144. doi: 10.2337/db07-1731.
96. Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience / W. B. Kannel [et al.] // *Amer Heart J*. – 1990. – Vol. 120. – P. 672-676.
97. Decreased in vivo oxidative stress and decreased platelet activation following metformin treatment in newly diagnosed type 2 diabetic subjects / G. Formoso [et al.] // *Diabetes Metab. Res. Rev*. – 2008. – Vol. 24. – P. 231 – 237.
98. DeFronzo R.A. Metformin– The Gold Standard: A Scientific Handbook / ed. C.J. Bailey, J.W. Campbell, J.C. Chan et al. 2007. - P. 37.
99. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes / P. Gaede [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 2008. – Vol. 358. - P.580-591., Holman R. R., Paul S. K.,
100. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes / D. Pavlović [et al.] // *Diabetes Obes Metab*. – 2000. – Vol. 2(4). – P. 251–256.
101. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action / Y. Shu [et al.] // *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117(5) . – P. 1422-1431.
102. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics / Y. Shu [et al.] // *Clin Pharmacol Ther*.- 2008. – Vol. 83(2). – P. 273-280.
103. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin / Y. Chen [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. – 2009. – Vol. 19(7). – P. 497-504. doi: 10.1097/FPC.0b013e32832cc7e9.
104. Effect of metformin on insulin-resistant endothelial cell function / H. Chen, J. Li, O. Yang // *Oncology Letters*. - 2015. – Vol. 9. – P. 1149-1153.

105. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized clinical trial / A. Esteghamati [et al.] // *Clin Nutr.* – 2013. – Vol. 32(2). – P. 179-185. doi: 10.1016/j.clnu.2012.08.006.
106. Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets / S. Piro [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2012. – Vol. 35(5). – P. 504-510. doi: 10.3275/7866.
107. Effects of Rosiglitazone, Glyburide, and Metformin on β -Cell Function and Insulin Sensitivity in ADOPT / S.E. Kahn [et al.] // *Diabetes.* – 2011. - Vol. 60(5). – P. 1552-1560.
108. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy / I. Ezzidi [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2008. – Vol. 68(4). - P. 542-546.
109. eNOS phosphorylation on serine 1176 affects insulin sensitivity and adiposity / S. Kashiwaga, D N. Atochina, Q. Lia [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. - № 431(2). – P. 284–290. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.110
110. eNOS polymorphism associated with metabolic syndrome in children and adolescents / J.A. Miranda, V.A. Belo, D.C. Souza-Costa // *Mol Cell Biochem.* – 2013. – Vol. 372 (1-2). – P. 155-160. doi: 10.1007/s11010-012-1456-y.
111. Esposito, K. When metformin fails in type 2 diabetes mellitus / K . Esposito, G. Bellastella, D. Giugliano // *Arch Intern Med.* – 2011. – Vol. 171(4). – P. 365–366.
112. Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective / Jin J., Sklar G.E., Sen Oh V.M. [et al.] // *Therapeutics and Clinical Risk Management.* – 2008. – Vol.4(1). – P. 269–286.
113. Functional polymorphism of hOGG1 gene is associated with type 2 diabetes mellitus in Chinese population / C. Sun [et al.] // *Mol Cell Endocrinol.* – 2010.-Vol. 325(1-2). – P. 128-34. doi: 0.1016/j.mce.2010.05.005.

114. Gene polymorphisms in patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy / H. Demova [et al.] // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2012. – Vol. 7(2). – P. 210-218. doi: 10.2478/s11535-012-0003-x
115. Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3 / L. Chen [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2013. – Vol. 13(2). – P. 110-120. doi: 10.1038/tpj.2011.60.
116. Genetic variants in multidrug and toxic compound extrusion-1, hMATE1, alter transport function / Y. Chen [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2009. – Vol. 9(2). – P. 127–136.
117. Genetic variants in transcription factors are associated with the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin / S. Goswami [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 96(3). – P. 370-379. doi: 10.1038/clpt.2014.109. Epub 2014 May 22.
118. Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin / I.S. Song [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 84(5). – P. 559–562.
119. Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus / M.L. Becker [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2009. - Vol. 9(4). – P. 242-247. doi: 10.1038/tpj.2009.
120. Genetic variation in the multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: a preliminary study / M.L. Becker [et al.] // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58(3).–P.745–749.
121. Góth, L. Acatalasemia and diabetes mellitus / L. Góth, T. Nagy // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* -2012. – Vol. 525(2). – P. 195-200. doi: 10.1016/j.abb.2012.02.005.
122. Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy / L.S. Matsa [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(7):e70523. doi: 10.1371/journal.pone.0070523. Print 2013.
123. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo / Asleh [et al.] // *Circ Res.* – 2005. – Vol.96. – P. 435–441.

124. Hatoum, D. Recent Advances in the Use of Metformin: Can Treating Diabetes Prevent Breast Cancer? / D. Hatoum, E.M. McGowan // *BioMed Research International*. – 2015.- Article ID 548436. – [электронный ресурс]. – режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/548436>.
125. Henstridge, D. C. Chaperoning to the metabolic party: The emerging therapeutic role of heat-shock proteins in obesity and type 2 diabetes / D. C. Henstridge, M. Whitham, M. A. Febbraio // *Molecular Metabolism*. – 2014. - №3. – P. 781-793.
126. Heritability of variation in glycaemic response to metformin: a genome-wide complex trait analysis / K. Zhou [et al.] // *The Lancet. Diabetes and Endocrinology*. – 2014. – Vol.2(6). – P.481-487. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70050-6.
127. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients / K. Toyama [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. – 2010. – Vol. 20(2). –P. 135-138. doi: 10.1097/FPC.0b013e328335639f.
128. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program / M. Federici [et al.] // *Diabetes*. – Vol. 50. – P. 1290 – 1301.
129. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin / E. Shikata [et al.] // *J Hum Genet*. – 2007. – Vol. 52(2). – P. 117-122.
130. Hypothesis: the «metabolic memory», the new challenge of diabetes / Garcia Soriano F. [et al.] // *Diabet Med*. – 2007. – Vol. 24. – P. 582 – 586.
131. Identification and characterization of novel polymorphisms in the basal promoter of the human transporter, MATE1 / Ha Choi [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics*. - 2009. – Vol. 19(10). – P. 770–780.
132. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population / J.H. Kang [et al.] // *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*- 2007. – Vol. 35(4). – P. 667–675.

133. Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity / M. Kajiwara [et al.] // *J Hum Genet.* – 2009. – Vol.54(1). – P. 40-46. doi: 10.1038/jhg.2008.1.
134. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry / K. Malmberg [et al.] // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102. – P. 1014-1019.
135. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes / A. Patel [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – 358. – P. 2560-2572.
136. Is there a role of p53 codon 72 polymorphism in the susceptibility to type 2 diabetes in overweight subjects? A study in patients with cardiovascular diseases/ Gloria-Bottini F. [et al.] // *Diabetes Research and Clinical Practice.* - 2011. – Vol. 91(3):e64-7. doi: 10.1016/j.diabres.2010.11.031
137. Lack of association between matrix metalloproteinase-9 and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in Turkish population. / Alp E. [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2009. – Vol. 28(7). – P. 343-350.
138. Leeuwen van N. Exome variation affects metformin treatment response. Materials of 50th EASD Annual Meeting, Vienna, Austria, 15-19 September 2014 / N.van Leeuwen // *Diabetologia.* – 2014. - Vol. 57, Suppl. 1
139. Luo, Z. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth / Z. Luo, M. Zang, W.Guo // *Future Oncology.* – 2010. – Vol. 6(3). – Vol. 457-470. doi: 10.2217/fon.09.174.
140. Metformin Inhibits Vascular Calcification in Female Rat Aortic Smooth Muscle Cells via the AMPK-eNOS/NO Pathway / X. Cao [et al.] // *Endocrinology.* - 2013. – Vol. 154. – P. 3680–3689.
141. Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1 / A. Gnanapragasam [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* - 2014. – Vol. 171. – P. 523–535.

142. Metformin pharmacogenomics: biomarkers to mechanisms / L. Wang, R. Weinshilboum // *Diabetes*. – 2014. – Vol. 63(8). – P. 2609-2610. doi: 10.2337/db14-0609.
143. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes./ P. Beisswenger [et al.] // *Diabetes*. – 1999.- P. 198–202.
144. Metformin suppresses sonic hedgehog expression in pancreatic cancer cells./ M. Nakamura [et al.] // *Anticancer Res*. – 2014. – Vol. 34(4). – P. 1765-1769.
145. Mortality from coronary heart disease in subject with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction / S. M. Haffner [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 1998. – Vol. 339. – P. 229-234.,
146. Nitric oxide donors rescue diabetic nephropathy through oxidative-stress-and nitrosative-stress-mediated Wnt signaling pathways / Y.C. Hsu // *J Diabetes Investig*. – 2015. –Vol. 6(1). – P. 24-34. doi: 10.1111/jdi.12244.
147. Nitric oxide system and diabetic nephropathy / B.S. Dellamea [et al.] // *Diabetol Metab Syndr*. – 2014.- Vol.6(1):17. doi: 10.1186/1758-5996-6-17.
148. Obesity, insulin resistance, and skeletal muscle nitric oxide synthase / R.M. Kraus [et al.] // *Journal of Applied Physiology (1985)*. – 2012. – Vol. 113(5). – P. 758-765. doi: 10.1152/jappphysiol.01018.2011.
149. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine / J.Z. Wang [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. – 2008. – Vol.18(7). – P. 637-645. doi: 10.1097/FPC.0b013e328302cd41.
150. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of type 2 Diabetes/ J. Evans [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2002. – Vol. 23, N. 5. – P.599 – 622..
151. Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus / L. Pácal [et al.] // *Archives of Physiology and Biochemistry*. – 2011. – Vol. 117, № 4. – P. 222-230.
152. Pharmacogenetics meets metabolomics: discovery of tryptophan as a new endogenous OCT2 substrate related to metformin disposition / I.S. Song [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(5):e36637. doi: 10.1371/journal.pone.0036637

153. Pharmacogenetics of oral antidiabetic treatment / Z. Schroner [et al.] // Bratisl Lek Listy. – 2011 . – Vol. 112(8). – P. 441-446.
154. Pharmacogenomic association between a variant in SLC47A1 gene and therapeutic response to metformin in Type 2 diabetes / I. Tkac [et al.] // Diabetes Obes. Metab. – 2013. – Vol. 15(2). – P. 189–191.
155. Pollak, M. Potential applications for biguanides in oncology / M. Pollak // J Clin Invest. - 2013. – Vol. 123. – P. 3693–3700.
156. Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function / M.K. Leabman // Pharmacogenetics. – 2002. - 12(5). – P. 395–405.
157. Preemptive genotyping for personalized medicine: design of the right drug, right dose, right time-using genomic data to individualize treatment protocol / S.J. Bielinski [et al.] // Mayo Clin Proc. – 2014. – Vol. 89. – P. 25–33.
158. Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: a GoDARTS study / K. Zhou [et al.] // Diabetes. – 2009.-Vol. 58(6). – P. 1434-1439. doi: 10.2337/db08-0896.
159. Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin / L. Chen [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. - 2010. – Vol. 20(11). – P. 687–699.
160. Serum levels of p53 and cytochrome c in subjects with type 2 diabetes and impaired glucose tolerance / Y. Dincer [et al.] // Clin Invest Med.- 2009. –Vol. 32(4) . - E266-270.
161. Sivitz, W. I. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities / W. I. Sivitz, M. A. Yorek //Antioxidants and Redox Signaling. - 2010. – Vol. 12(4). – P. 537–577. doi: 10.1089/ars.2009.2531
162. Soubrier, F. Nitric Oxide Synthase Genes: Candidate Genes Among Many Others / F. Soubrier // Hypertension. – 1999. – Vol. 33. – P. 924-926.
163. Stratified medicine for the use of antidiabetic medication in treatment of type II diabetes and cancer: where do we go from here? (Review) / A. Emami-Riedmaier [et al.] // J Intern Med. - 2015. –Vol. 277. – P. 235–247.

164. Studies of the association of Arg72Pro of tumor suppressor protein p53 with type 2 diabetes in a combined analysis of 55,521 Europeans/ K.S. Burgdorf // PLoS One. – 2011. – Vol. 20, № 6:e15813. doi: 10.1371/journal.pone.0015813 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3024396/> (дата обращения 20.11.2013).
165. T(-786) C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with insulin resistance in patients with ischemic or non ischemic cardiomyopathy / C. Vecoli [et al.] // BMC Med Genet. – 2012. – Vol. 13:92. doi: 10.1186/1471-2350-13-920015813 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/13/92> (дата обращения 11.09.2013).
166. T-786 C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm / M. Nakayama [et al.] // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 2864–2870.
167. Tallapragada, D.S. Long standing partnership between insulin resistance and endothelial dysfunction: Role of metabolic memory / D.S. Tallapragada, P.A. Karpe, K. Tikoo // Br J Pharmacol. - 2015 Mar 30. doi: 10.1111/bph.13145. [Epub ahead of print] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13145/abstract;jsessionid=7983D3A716A231ED25190FF25BCF28BC.f01t03> (дата обращения 08.07.2015).
168. The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin / S.L. Stocker [et al.] // Clin Pharmacol Ther. – 2013. – Vol. 93(2). – P. 186-194. doi: 10.1038/clpt.2012.210.
169. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin / M. V. Tzvetkov [et al.] // Clin Pharmacol Ther. - 2009. – Vol. (3). – P. 299-306. doi: 10.1038/clpt.2009.92.
170. The hOGG1 Ser326Cys gene polymorphism is associated with decreased insulin sensitivity in subjects with normal glucose tolerance / C.L. Wang, M.C. Hsieh, S.C. Hsin // Journal of Human Genetics. – 2006. – Vol. 51(2). – P. 124-128. Epub 2005 Dec 7.

171. The impact of diabetes-related complications on healthcare costs: new results from the UKPDS (UKPDS 84) / M.L. Alva [et al.] // *Diabetic Medicine*. – 2015. – Vol. 32(4). – P. 459–466.
172. The influence of natural dicarbonils on the antioxidant enzymes activity in vitro and in vivo. / Lankin V.Z. [et al.] // *Biomed Khim.* - 2012. – Vol. 58(6). – P. 727-736.
173. The NOS3 T-786C (rs2070744) Gene Polymorphism in Patients of Uzbek Nationality with Chronic Heart Failure /Ch. A. Abdullayeva [et a.l] // *International Journal of BioMedicine*. – 2014. – Vol. 4(4) (Suppl 1). – P. 12-14.
174. The p53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism is associated with the degree of insulin resistance in type 2 diabetic subjects: a cross-sectional study / A.R. Bonfigli [et al.] // *Acta Diabetologia*.- 2013. – Vol. 50(3). –P. 429-436. doi: 10.1007/s00592-012-0450-x.
175. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c / M. M. Christensen [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. - 2011. – Vol. 21(12). – P. 837-850. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834c0010.
176. Thomas, M.C. Glycemic exposure, glycemic control, and metabolic karma in diabetic complications / M.C. Thomas // *Advances in Chronic Kidney Disease*. – 2014. – Vol. 21(3). – P. 311-317. doi: 10.1053/j.ackd.2014.03.004.
177. Todd, J.N. An update on the pharmacogenomics of metformin: progress, problems and potential / J.N. Todd, J.C. Florenz // *Pharmacogenomics*. 2014. – Vol. 15(4). – P. 529-539. doi: 10.2217/pgs.14.21.
178. Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in β cells / S. Tornovsky-Babeay [et al.] // *Cell metabolism*. – 2014. – Vol. 19, № 1. – P. 109-121.
179. Ukkola, O. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus / O. Ukkola // *Journal of Internal Medicine*. -2001. – Vol.249(5). – P. 451-459.

180. Variants of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with components of metabolic syndrome in an Arab population / K.M. Alkharfy, N.M. Al-Daghri, O.S. Al-Attas [et al.] // *Endocr J.* - 2012. – Vol.59 (3). – P. 253-263. Epub 2012 Jan 12.
181. White, J. Efficacy and safety of incretin based therapies: clinical trial data / J. White // *J. Amer. Pharm. Assoc.* – 2009. – Vol. 49. – Suppl. 1. – S. 30-40.
182. Zaccardi, F. Glycemic risk factors of diabetic vascular complications: the role of glycemic variability / F. Zaccardi, D. Pitocco, G. Ghirlanda // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2009. – Vol. 25. – P. 199 – 207.
183. Zolk, O. Disposition of metformin: variability due to polymorphisms of organic cation transporters / O. Zolk // *Ann Med.* – 2012. – Vol. 44(2). – P. 119-129. doi: 10.3109/07853890.2010.549144.